

## LIPASE BIJI-BIJIAN DAN KARAKTERISTIKNYA

### SEED LIPASES AND ITS CHARACTERIZATION

*Rofiqotus Sholeha and Rudiana Agustini\**

*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences*

*Universitas Negeri Surabaya*

*Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Telp. 031-8298761*

*\* Corresponding author, email: rudianaagustini@unesa.ac.id*

**Abstrak.** *Kebutuhan enzim sebagai biokatalis dalam bidang industri saat ini sangat tinggi. Jenis enzim yang bermacam-macam dan dari berbagai sumber telah banyak diteliti dan dikembangkan. Salah satu jenis enzim yang terus diteliti dan dikembangkan adalah lipase. Lipase adalah enzim golongan hidrolase yang mengkatalisis proses hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Lipase dapat ditemukan dalam berbagai sumber seperti pada mikroorganisme, hewan dan tumbuhan. Lipase banyak digunakan pada industri makanan, detergen, minyak, biodiesel dan farmasi. Artikel ini memaparkan beberapa aspek utama pada lipase yang berasal dari biji seperti reaksi-reaksi yang dikatalisis, karakteristik (suhu, pH, aktivator dan inhibitor), mekanisme katalisis oleh lipase serta contoh lipase biji yang telah diteliti karakteristiknya. Lipase ditemukan pada biji yang berkecambah yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses mobilisasi lipid. Lipase memiliki kemampuan mengatalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi, asidolisis, alkoholisis dan aminolisis dengan efisien dan stabil. Lipase dapat diklasifikasikan menjadi 3 golongan didasarkan pada kemampuannya dalam mensintesis ikatan ester yaitu lipase non spesifik, lipase spesifik 1,3 dan lipase spesifik asam lemak. Mekanisme katalisis oleh lipase melibatkan serangan nukleofilik pertama dari serin pada karbon karbonil ikatan ester menghasilkan enzim asil kovalen sebagai perantara dan melepaskan alkohol. Karakteristik biji-bijian yang telah diteliti karakteristik jenis lipase yang dihasilkan contohnya adalah African bean seed (*Pentaclethra macrophylla* Benth), Durian seed germination (*Durio zibethinus* L.), dan Biji karet (*Hevea brasiliensis*).*

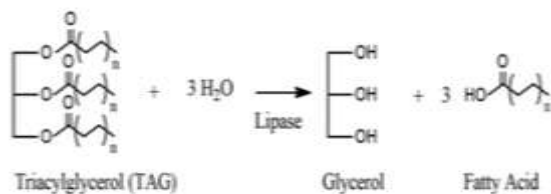
**Kata kunci :** *Lipase biji, karakteristik, mekanisme reaksi*

**Abstract.** *The need for enzymes as biocatalysts in industry is currently very high. Various types of enzymes and from various sources have been widely researched and developed. One type of enzyme that is being researched and developed is lipase. Lipase is a hydrolase group enzyme that catalyzes the hydrolysis of triglycerides into glycerol and free fatty acids. Lipases can be found in various sources such as in microorganisms, animals and plants. Lipase is widely used in the food, detergent, oil, biodiesel and pharmaceutical industries. This article describes some of the main aspects of lipase derived from seeds such as catalyzed reactions, characteristics (temperature, pH, activator and inhibitor), the mechanism of catalysis by lipases and examples of seed lipases that have been investigated for their characteristics. Lipase is found in germinated seeds which functions as a catalyst in the lipid mobilization process. Lipase has the ability to catalyze hydrolysis, esterification, transesterification, acidolysis, alcoholysis and aminolysis reactions efficiently and stably. Lipases can be classified into 3 groups based on their ability to synthesize ester bonds, namely non-specific lipases, 1,3-specific lipases and fatty acid-specific lipases. The mechanism of catalysis by lipase involves the first nucleophilic attack of serine on the ester-bond carbonyl carbon producing covalent acyl enzymes as intermediates and releasing the alcohol. The characteristics of the grains that have been studied are the characteristics of the type of lipase produced, for example, African bean seeds (*Pentaclethra macrophylla* Benth), Durian seed germination (*Durio zibethinus* L.), and rubber seeds (*Hevea brasiliensis*).*

**Keywords :** *Seed lipase, characteristics, reaction mechanism*

## PENDAHULUAN

Lipase (triacylglycerol hydrolases, E.C. 3.1.1.3) adalah enzim golongan hidrolase yang mengkatalisis proses hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Reaksi umum hidrolisis triasilgliserol oleh enzim lipase ditunjukkan dengan Gambar 1. Selain itu, lipase juga mengkatalisis proses transesterifikasi ester lain serta proses sintesis ester [1].



Gambar 1. Reaksi umum hidrolisis oleh enzim lipase

Kemampuan lipase untuk melakukan transformasi kimia yang sangat spesifik (biotransformasi) membuatnya semakin populer di industri makanan, deterjen, kimia, dan farmasi [1].

Lipase bekerja pada bagian antar-muka organik-air untuk mengkatalisis proses hidrolisis ikatan ester karboksilat dan melepaskan asam lemak dan alkohol organik apabila lipase berada di lingkungan dengan jumlah air yang cukup [2].

Lipase yang berada pada lingkungan dengan jumlah air terbatas akan menyebabkan reaksi balik (esterifikasi) atau bahkan terjadi transesterifikasi yang merupakan pertukaran kelompok antara ester dan asam (asidolisis), antara ester dan alkohol (alkoholisis) atau antara dua ester (interesterifikasi) [3].

Kemampuan enzim lipase sebagai katalis dalam reaksi esterifikasi telah dilakukan menggunakan enzim lipase yang telah terimobilisasi (*Novozyme*). Lipase berperan sebagai biokatalis dalam pembuatan biosurfaktan karbohidrat ester. Lipase mengkatalisis proses esterifikasi asam plamat dan fruktosa sebagai bahan utama pembuatan surfaktan karbohidrat ester tersebut. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa untuk mendapat hasil optimum dari karbohidrat ester diperlukan jumlah enzyme sebanyak 12% dari asam palmitat [4].

Lipase sebagai biokatalis dalam reaksi asidolisis dibuktikan dalam pembuatan lipid terstruktur dengan menggunakan lipase dari dedak

padi [5]. Lipase mengatalisis reaksi asidolisis dari bahan utama yaitu, minyak ikan tuna dan asam laurat. Penelitian ini menunjukkan bahwa lipase bekerja optimum pada suhu 50 °C, konsentrasi enzim 10% dan konsentrasi substrat 1:10 dengan lama waktu reaksi 12 jam.

Lipase memiliki kemampuan mengatalisis reaksi-reaksi tersebut dengan efisien, stabil dan serbaguna sehingga membuat lipase sangat menarik untuk digunakan secara komersial. Selain itu, proses katalisis lipase juga tidak memerlukan kofaktor serta dapat dengan mudah diimobilisasi pada matriks yang berbeda [6].

### Sifat-Sifat Lipase

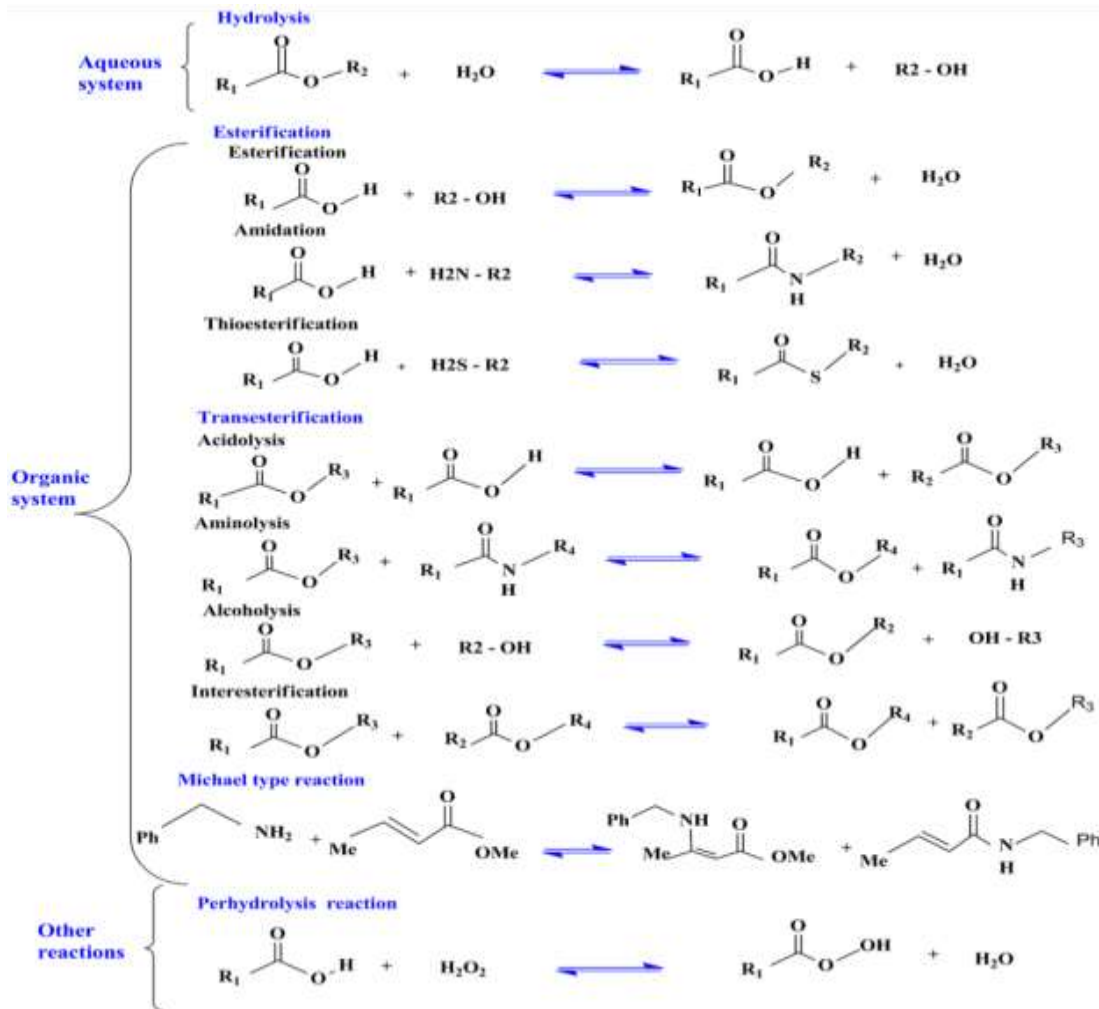
Lipase memiliki sifat-sifat yang sama seperti enzim lainnya. Lipase merupakan protein kompleks yang berfungsi sebagai biokatalisator. Fungsi enzim sebagai biokatalisator yaitu mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi sehingga reaksi dapat berlangsung lebih cepat pada suhu atau kondisi normal. Setiap enzim memiliki spesifitas terhadap substratnya. sifat khas inilah yang menjadi ciri khusus yang dimiliki oleh enzim. Beberapa sifat khas dari lipase adalah sebagai berikut.

#### 1. Biokatalisator

Lipase berfungsi sebagai katalisator dalam hidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Para peneliti telah banyak menggunakan lipase sebagai biokatalisator. Lipase dapat mengatalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi dan reaksi perhidrolisis. Reaksi-reaksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.

Salah satu contoh penggunaan lipase sebagai biokatalis adalah penggunaan lipase dari kecambah biji jarak pagar untuk mengoptimalkan kondisi reaksi degradasi enzimatik phorbolester yang terjadi pada bungkil jarak pagar. Kondisi yang dioptimalkan pada penelitian ini adalah waktu reaksi, rasio volume buffer terhadap bungkil jarak pagar, dan rasio enzim terhadap bungkil jarak pagar. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa kondisi optimum dicapai pada waktu reaksi 29,33 jam, rasio volume buffer : bungkil jarak pagar yaitu 51,11 : 6 (ml/g) dan rasio enzim terhadap bungkil jarak pagar adalah 30,10 : 5 (U/g). Hasil penelitian tersebut

menunjukkan bahwa penggunaan lipase efektif dalam degradasi phorbol ester [7].



Gambar 2. Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh lipase

## 2. Bersifat Termolabil

Lipase termasuk sebagai protein yang membuat aktivitasnya sangat bergantung pada suhu. Lipase memerlukan kondisi suhu yang cocok untuk dapat menghasilkan produk katalisis yang optimal. Suhu yang terlalu tinggi dapat merusak struktur protein lipase yang disebut dengan denaturasi [8].

Penelitian tentang suhu optimum pada bakteri lipolitik yang diisolasi dari minyak yang terkontaminasi tanah telah dilakukan oleh Sirisha dkk [9]. Penelitian tersebut menggunakan minyak kelapa sawit sebagai substrat. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan enzim lipase yang diisolasi

memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 37 °C.

Penelitian lainnya dilakukan dengan menggunakan lipase yang diisolasi dari biji alpukat [10]. Substrat yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah minyak zaitun. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa lipase dari biji alpukat tersebut memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 35 °C.

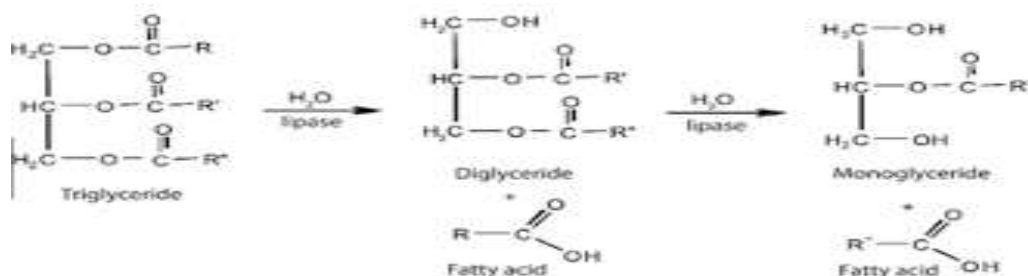
## 3. Bekerja secara spesifik dan selektif.

Enzim tertentu hanya dapat mengadakan pengubahan pada zat tertentu pula. Lipase memiliki sifat spesifik yang khas mengenai kemampuannya untuk menghidrolisis lemak

menjadi asam lemak dan gliserol yaitu regioselektivitas. Lipase memiliki kemampuan selektivitas yang kuat dalam menghidrolisis substrat pada molekul gliserol yang terikat pada gugus asil nomer 1 dan 3 (sn-1,3) pada triasilgliserol.

Gambar 3 menunjukkan hidrolisis triasilgliserol oleh lipase dimana lipase cenderung untuk menghidrolisis gugus asil nomer 1 terlebih

dahulu menghasilkan digliserida dan asam lemak bebas. Jika hidrolisis dilanjutkan kembali maka lipase akan cenderung untuk menghidrolisis gugus asil nomer 3 yang akan menghasilkan monogliserol dan asam lemak bebas. Pengetahuan tentang regioselektivitas lipase sangat penting untuk mengetahui nutrisi dan sifat lemak sehingga dapat dimanipulasi dengan mengubah konstituen rantai asil pada posisi spesifik [11].



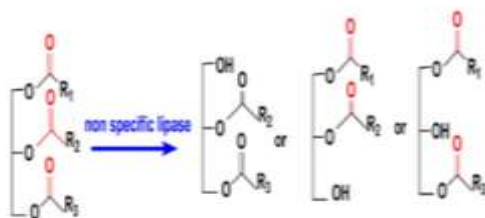
Gambar 3. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan lipase sn-1 dan sn-3

### Klasifikasi Lipase

Lipase dapat diklasifikasikan menjadi 3 golongan didasarkan pada kemampuannya dalam mensintesis ikatan ester. Tiga golongan tersebut dijelaskan sebagai berikut :

#### 1. Lipase Non Spesifik

Lipase non spesifik mengkatalisis hidrolisis triasilgliserol lengkap menjadi asam lemak dan gliserol secara acak. Lipase memiliki kemampuan yang sama dalam menghidrolisis gugus asil pada nomer 1, 2 atau 3. Gambar 4 menunjukkan bahwa triasilgliserol lengkap yang dihidrolisis oleh lipase non spesifik memiliki 3 produk yang kemungkinan terbentuk. [12]



Gambar 4. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan lipase non-spesifik

#### 2. Lipase Spesifik 1,3

Berbeda dengan lipase non spesifik, lipase spesifik 1,3 menghidrolisis triasilgliserol pada gugus asil nomer 1 dan 3. Produk-produk yang dihasilkan dari hidrolisis triasilgliserol oleh lipase spesifik 1,3 ini adalah 2-monoasilgliserol dan 1,2-diasilgliserol atau 2,3-diasilgliserol [12]. Reaksi hidrolisis dari lipase spesifik 1,3 ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan lipase spesifik 1,3

#### 3. Lipase Spesifik Asam Lemak

Kelompok ketiga merupakan lipase yang memutus asam lemak terutama pada tipe asam lemak spesifik dari molekul gliserida. Lipase ini menghidrolisis ester asam lemak yang terletak di posisi mana saja pada triasilgliserol [13].

## Sumber Lipase

### 1. Lipase dari Hewan

Svendsen [14] mengelompokkan enzim lipase berdasarkan sumbernya yaitu: lipase pada sistem pencernaan, lipase yang terdapat pada jaringan seperti hati, paru-paru dan ginjal serta lipase dalam air susu. Dalam proses industri lipase hewan yang digunakan adalah lipase pankreas dan pregastric yang berasal dari babi (fosfolipase A2).

Lipase dalam industri digunakan untuk memproduksi zat pengemulsi dan antijamur dalam makanan lysophosphatidylcholine atau makanan lysolecithin. Kelemahan dari lipase yang berasal dari hewan ini adalah harganya yang mahal [2].

### 2. Lipase dari Mikroorganisme

Lipase yang berasal dari mikroorganisme dibagi menjadi lipase yang berasal dari yang berasal dari bakteri, kapang dan khamir. Lipase mikroba sebagian besar merupakan jenis ekstraseluler dan produksinya sangat dipengaruhi oleh komposisi medium. Untuk biaya produksi yang lebih rendah dapat digunakan limbah argoindustri sebagai pakan [15].

Lipase bakteri biasanya dipengaruhi oleh kondisi gizi, seperti sumber karbon, lipid, nitrogen dan garam anorganik [16]. Spesies yang paling banyak digunakan untuk produksi lipase bakteri *Pseudomonas* dan *Burkholderia* karena aktivitas enzim yang tinggi pada berbagai suhu dan nilai pH serta enansioselektivitas tinggi [17].

Selanjutnya lipase dari jamur berasal dari jamur yang dapat tumbuh di beberapa habitat, termasuk biji, minyak nabati bekas, tanah yang terkontaminasi minyak, serta makanan dan produk susu yang rusak [1].

Genera yang paling banyak dikutip untuk produksi lipase adalah *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* dan *Fusarium* [18]. Jamur berfilamen juga dianggap sebagai sumber lipase ekstraseluler terbaik untuk produksi industri skala besar di antara semua

organisme yang digunakan sebagai sumber lipase [19].

### 3. Lipase dari Tanaman

Mukherjee dan Hills [20] mengelompokkan enzim lipase dari tanaman menjadi lipase triasilgliserol, asilhidrolase, fosfolipase dan lisofosfolipase. Lipase tanaman telah diisolasi dari daun, minyak, batang, getah dan biji tanaman dan sereal yang mengandung minyak [21]. Bagian tanaman dan tingkat pemurnian yang diinginkan menentukan metode yang paling tepat untuk menyiapkan biokatalis dari biomassa tanaman [22].

Perbedaan penggunaan lipase tanaman didokumentasikan dengan baik, meskipun ada kebutuhan untuk studi lebih lanjut tentang aplikasi dalam produksi asam lemak terkonsentrasi dari minyak nabati dan reaksi biotransformasi [21]. Berdasarkan uraian di atas maka pada Tabel 1 ditunjukkan beberapa contoh spesies yang telah diteliti dapat menghasilkan lipase.

Enzim ini sangat menarik karena kemudahan pemurnian, biaya rendah dan keanekaragaman [23]. Namun, spesifikasi substrat unik lipase tanaman untuk aplikasi industri belum sepenuhnya ditentukan karena kurangnya penelitian tentang produksi optimal lipase tanaman [24]. Meskipun lipase dari mikroba telah ditemukan, penggunaan enzim ini masih terbatas karena biaya produksi yang cukup tinggi sehingga pencarian sumber-sumber lipase lainnya sangat diperlukan. Saat ini, lipase biji mendapat perhatian untuk digunakan sebagai biokatalis. Enzim ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan enzim lipase yang berasal dari hewan dan mikroba yaitu spesifitas, ketersediaan dan kemudahan pemurnian dan biaya yang rendah [25].

Tabel 1. Sumber Lipase

Sumber	Nama Spesies	Referensi
Hewan	<i>Porcine pancreatine lipase</i>	[26]
	<i>Hexaplex trunculus</i>	[27]
	<i>Litopenaus vannamei</i>	[28]
Bakteri	<i>Burkholderia ubonensis</i>	[29]

<b>Fungal</b>	<i>Staphylococcus warneri</i>	[30]
	<i>Bacillus sp.</i>	[31]
	<i>Serratia marcescens</i>	[32]
	<i>Enterococcus faecium</i>	[33]
	<i>Acinetobacter sp.</i>	[34]
	<i>Trichoderma harzianum</i>	[35]
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	[36]
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	[37]
	<i>Candida cylindracea</i>	[38]
	<i>Talaromyces thermophilus</i>	[39]
<b>Tumbuhan</b>	<i>Geotrichum candidum</i>	[40]
	<i>Botryosphaeria arabis</i>	[41]
	<i>Coffea Arabica</i>	[42]
	<i>Avena Sativa</i>	[43]
	<i>Jatropha curcas</i>	[24]
	<i>Cucurbita moschata</i>	[44]

### Lipase Biji

Biji yang sedang berkecambah memiliki kandungan minyak di dalamnya dan mobilisasi asam lemak yang disimpan tersebut sangat penting untuk memasok energi dan karbon untuk pertumbuhan embrionik. Enzim lipolitik akan mengkatalisis mobilisasi lipid tersebut dan selanjutnya akan dikendalikan selama dan setelah periode perkecambahan [45].

Minyak pada biji terdapat pada dua bagian yaitu pada sekam atau tegument dan kernel. Sekam merupakan lapisan eksternal benih yang menutupi kernel. Kernel memiliki dua bagian yaitu embrio yang akan membentuk tanaman baru ketika benih berkecambah dan endosperma yang berfungsi menyimpan nutrisi cadangan untuk digunakan tanaman pada tahap pertama pengembangan.

Biji-bijian mengandung protein, pati atau triasilgliserol yang berguna sebagai sumber cadangan energi. Tiga cadangan nutrisi utama tersebut dalam mobilisasinya dihidrolisis secara khusus oleh protease, amylase dan lipase. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa lipase memiliki aktivitas tertingginya selama masa perkecambahan [46].

Triasilgliserol terdapat sekitar 20% hingga 50% dari berat kering biji yang tersimpan pada oleosom atau badan minyak. Pada periode perkecambahan, triasilgliserol tersebut digunakan dalam produksi

energi untuk sintesis gula, asam amino (Asparagin, aspartat, glutamine dan glutamate) dan rantai karbon yang diperlukan untuk pertumbuhan embrio [45].

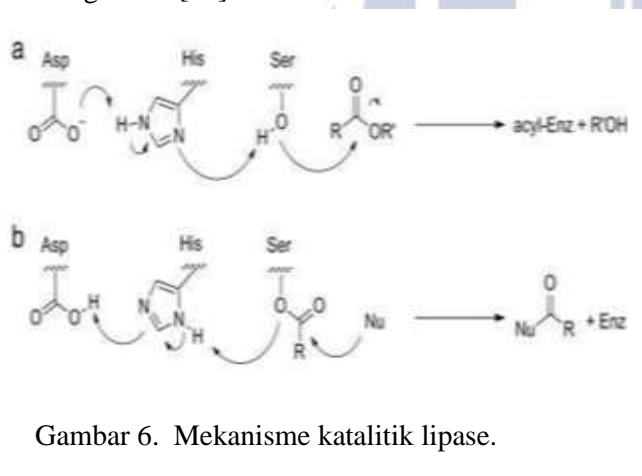
Hasil dari berbagai penelitian terhadap lipase biji menunjukkan bahwa aktivitas lipolitik hanya dapat ditemukan pada biji yang berkecambah sedangkan pada biji yang tidak berkecambah tidak dapat diamati aktivitas lipolitik [47]. Dzulkarnain dkk [48] melakukan isolasi lipase dari kecambah biji durian dan menentukan kondisi kerja optimum (pH, suhu dan konsentrasi substrat) lipase yang dihasilkan. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak zaitun. aktivitas lipase diketahui dengan menggunakan metode titrimetri. Hasil dari penelitian tersebut didapatkan bahwa lipase yang dihasilkan dari biji durian bekerja optimum pada pH 7, suhu 60 °C dan konsentrasi substrat 1% v/v.

Waktu perkecambahan juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim lipase. Hal ini dijelaskan pada penelitian yang menggunakan sampel kecambah biji kesambi yang berusia 5, 7, 9, 11 dan 13 hari yang lipasnya diisolasi dan diuji aktivitas hidrolitiknya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kecambah pada usia 13 hari memiliki aktivitas hidrolitik yang optimum yaitu sebesar 41,33 U/ml. Selain itu, hasil dari penelitian ini juga menunjukkan

bahwa kecambah biji kesambi yang berusia 11 hari memiliki aktivitas spesifik yang paling tinggi yaitu 69,20 U/gr sehingga dapat digunakan sebagai sumber lipase [49].

### Mekanisme Katalitik Lipase

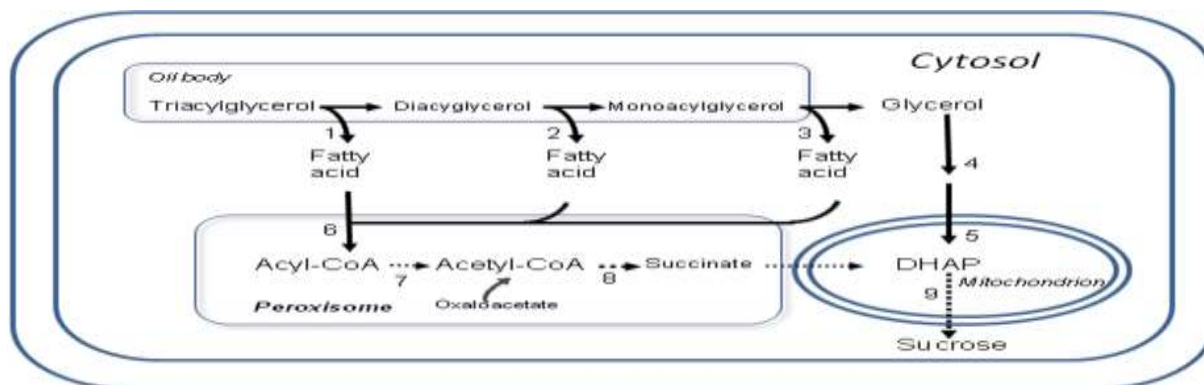
Hidrolisis ester menjadi asam lemak dan triasilgliserol oleh lipase tentunya melewati suatu rangkaian reaksi yang tergabung menjadi sebuah mekanisme hidrolisis oleh lipase. Hidrolisis ester oleh lipase ini melibatkan serangan nukleofilik pertama dari serin pada karbon karbonil ikatan ester, menghasilkan enzim asil kovalen sebagai perantara dan melepaskan alkohol. Gambar 6 menunjukkan bahwa diasilgliserol akan dilepaskan setelah membentuk gugus hidroksil dalam molekul triasilgliserol [50].



Gambar 6. Mekanisme katalitik lipase.

Serangan nukleofilik pertama akan distabilkan oleh residu lain dari sisi aktif yaitu histidin dan asam aspartat. Selanjutnya, serangan nukleofilik kedua terjadi ketika air menghidrolisis perantara asil-enzim yang akan membentuk asam karboksilat. Banyak senyawa yang berbeda dapat bertindak sebagai donor asil. Banyak senyawa nukleofilik selain air yang dapat melakukan peran yang sama dan memecah perantara asil-enzim [51].

Gambar 7 menunjukkan proses hidrolisis triasilgliserol dari biji yang membebaskan asam lemak dan gliserol melalui kerja satu atau lebih lipase. Gliserol yang terbentuk difosforilasi dan mengalami glikogenesis setelah dikonversi menjadi dihidroksiaseton fosfat (DHAP) [52]. Asam lemak bebas diangkut ke dalam peroksisom, di mana asam tersebut diaktifkan menjadi acetyl-CoA dan memulai oksidasi  $\beta$ . Asetil-CoA yang diproduksi oleh  $\beta$ -oksidasi memasuki siklus glioksilat dan kemudian mengambil bagian dalam glikogenesis untuk menghasilkan gula yang dibutuhkan oleh embrio sebagai sumber energi selama perkecambahan [45]. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada biji yang sedang berkecambah terdapat aktivitas enzim lipase yang tinggi sehingga biji-bijian yang sedang berkecambah dapat dijadikan sebagai sumber lipase yang dapat digunakan untuk mengkatalisis proses hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas yang diperlukan oleh industry.



Gambar 7. Skema proses hidrolisis triasilgliserol pada biji

### Aktivitas enzim

Aktivitas enzim adalah besarnya kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi penguraian sumber karbon. Aktivitas enzim dinyatakan dengan unit/mL menit. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan 1 $\mu$ mol karbon diubah menjadi 1 $\mu$ mol produk per menit pada kondisi tertentu sehingga pengertian aktivitas enzim lipase adalah jumlah yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1 $\mu$ mol ikatan per menit pada kondisi pengujian tertentu.

#### 1. Cara penentuan aktivitas lipase

##### a. Metode Titrimetri

Metode Titrimetri adalah metode penentuan aktivitas lipase dengan menggunakan larutan basa (KOH atau NaOH) sebagai titran serta phenolphthalein sebagai indikator. Campuran etanol-aseton (1:1) ditambahkan pada larutan untuk menghentikan reaksi. Aktivitas lipase dengan menggunakan metode titrimetri dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas Lipase} = \frac{(V_s - V_{bl}) \times [\text{Titran}] \times 1000}{V_{\text{enzim}} \times t}$$

Keterangan :

$V_s$  : Volume titran yang digunakan untuk titrasi sampel (mL)

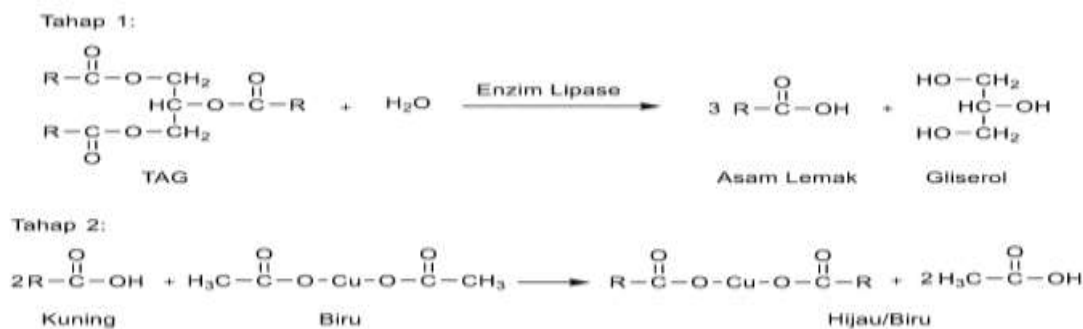
$V_b$  : Volume titran yang digunakan untuk titrasi blanko (mL)

1000 : nilai konversi dari mmol kedalam satuan  $\mu$ mol

t: waktu inkubasi (menit)

##### b. Metode Spektrofotometri

Penentuan aktivitas lipase dengan menggunakan spektrofotometri perlu penambahan reagen tembaga (II) asetat dan diuji pada panjang gelombang 715 nm. Prinsip reaksinya adalah asam lemak yang dihasilkan dari hidrolisis triasilgliserol akan membentuk senyawa kompleks berwarna biru dengan  $\text{Cu}^{2+}$  dari tembaga (II) asetat yang dapat diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 715 nm. Reaksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Prinsip reaksi penentuan aktivitas lipase dengan metode spektrofotometri [53].

Beberapa contoh metode penentuan aktivitas lipase yang digunakan pada biji dari spesies berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Metode Penentuan Aktivitas Lipase Pada Beberapa Spesies

Spesies	Metode	Referensi
<i>Persea Americana mill</i>	Metode titrimetri	[10]
<i>Jatropha curcas L.</i>	Metode spektrofotometri	[24]

Spesies	Metode	Referensi
<i>Theobroma cacao L.</i>	Metode spektrofotometri	[54]
<i>Hevea brasiliensis</i>	Metode titrimetri	[55]
<i>Durio zibethinus L.</i>	Metode titrimetri	[48]
<i>Schleira oleosa L.</i>	Metode titrimetri	[49]



<i>Dendrocalamus p</i> <i>er</i>	Metode titrimetri	[56]
<i>Pentaclethra</i> <i>macrophylla</i>	Metode spektrofotome tri	[57]

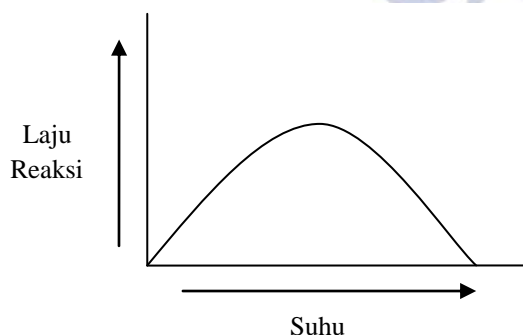
## 2. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Aktivitas katalitik enzim bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Hal tersebut juga berlaku pada lipase yang juga merupakan salah satu jenis enzim. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah pH, suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, senyawa activator dan inhibitor [58].

### a. Suhu

Enzim memerlukan jumlah kalor tertentu untuk dapat aktif dalam melakukan proses katalisis. Aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan kenaikan suhu. Aktivitas enzim akan mengalami kenaikan sebanyak dua kali pada setiap peningkatan 10 °C di atas suhu minimum. Peningkatan aktivitas enzim akan terhenti ketika mencapai suhu optimum. Hal ini dikarenakan pada suhu optimum struktur ikatan dalam enzim akan melemah [59].

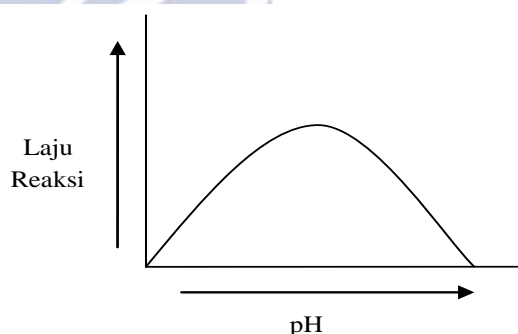
Suhu maksimum akan membuat struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka yang mengakibatkan kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun sehingga aktivitas enzim juga akan menurun [8]. Grafik hubungan antara peningkatan suhu dengan kecepatan laju reaksi dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Pengaruh suhu terhadap laju reaksi

### b. pH

Interaksi ionik yang terjadi didalam strukturnya akan menstabilkan enzim dan memungkinkan enzim untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya. Proton dapat dengan mudah berikatan dengan enzim karena enzim yang merupakan protein yang tersusun atas asam-asam amino. Proton dapat terikat di bagian gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lain [60]. . Gugus fungsional yang berperan dalam katalisis suatu reaksi oleh enzim adalah rantai asam amino basa dan asam amino asam. Aktivitas katalitik enzim akan maksimum jika enzim bekerja pada pH optimum. Perubahan pH akan menyebabkan protein penyusun enzim terdenaturasi karena adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim [61]. Grafik hubungan antara peningkatan pH dengan kecepatan laju reaksi ditunjukkan pada Gambar 10.



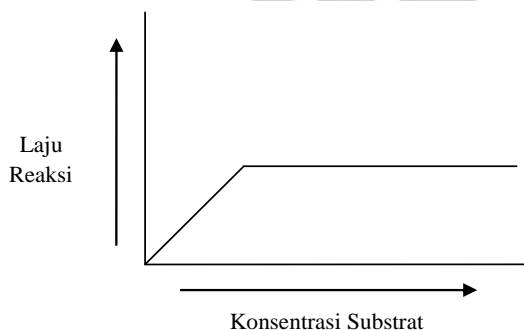
Gambar 10. Pengaruh pH terhadap laju reaksi

### c. Konsentrasi Substrat dan Enzim

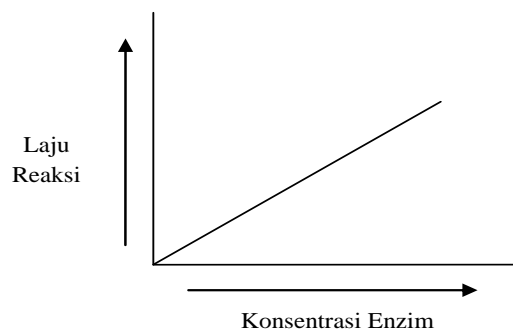
Faktor berikutnya yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Enzim tidak akan mencapai konversi maksimum karena terbatasnya substrat yang direaksikan. Kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan adanya peningkatan konsentrasi substrat karena banyaknya substrat yang terikat pada enzim. Namun, penambahan konsentrasi pada titik-titik jenuh tidak dapat lagi meningkatkan kecepatan laju reaksi. Hal ini sesuai dengan hukum Michaelis-Menten yaitu kecepatan reaksi akan terus meningkat seiring dengan penambahan substrat hingga mencapai titik batas dimana enzim jenuh dengan substrat [59]. Grafik hubungan

antara penambahan konsentrasi substrat dengan kecepatan laju reaksi dapat dilihat pada Gambar 11.

Konsentrasi enzim yang digunakan juga sangat mempengaruhi kecepatan laju reaksi yang berlangsung. Penambahan konsentrasi enzim akan meningkatkan laju reaksi karena akan semakin banyak sisi aktif yang akan ditempati oleh substrat membentuk produk. Hal tersebut akan mengakibatkan produk akan lebih cepat terbentuk [59]. Grafik hubungan antara penambahan konsentrasi enzim terhadap laju reaksi ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 11. Pengaruh konsentrasi substrat pada laju reaksi



Gambar 12. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi

#### d. Aktivator dan Inhibitor

Enzim dapat juga membutuhkan komponen lain agar dapat berfungsi secara maksimal sebagai katalis. Komponen pendukung ini disebut dengan kofaktor. Jenis-jenis kofaktor dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu : koenzim, gugus prostetik dan activator. Pada umumnya aktivator merupakan ion-ion logam yang dapat terikat atau mudah terlepas dari enzim. Beberapa contoh aktivator logam adalah  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , atau  $Zn^{2+}$  [58].

Enzim akan bekerja dengan cara pembentukan kompleks enzim-substrat dalam suatu reaksi. Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat terjadi apabila terjadi penghambatan saat penggabungan substrat pada sisi aktif enzim. Hambatan tersebut terjadi karena adanya molekul atau ion yang disebut inhibitor [58].

Berdasarkan uraian di atas maka pada Tabel 3 ditunjukkan karakteristik lipase yang meliputi pH optimum, suhu optimum, aktivator dan inhibitor dari beberapa spesies.

Tabel 3. Karakteristik lipase

Sumber Lipase	pH optimum	Suhu optimum	Aktivator	Inhibitor	Substrat	Posisi spesifik	Referensi
African bean seed ( <i>Pentaclet hra</i> )	7,0	30 °C	$Ca^{2+}$	EDTA	Minyak kelapa	-	[62]

<i>macrophylla Benth)</i>							
<b>Durian seed germination (<i>Durio zibethinus</i> L.)</b>	7,0	60 °C	-	-	Minyak zaitun	-	[48]
<b>Barbados nut (<i>Jatropha curcas</i> L.)</b>	7,5	37 °C	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Minyak zaitun	-	[63]
<b>Lupin seed (<i>Lupinus luteus</i> L.)</b>	5,0	45 °C	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>	-	Minyak lupin	Sn-1 Sn-2	[64]
<b>French peanut (<i>Panchira aquatic bombacaceae</i>)</b>	8,0	40 °C	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup>	p-nitrofenil asetat	-	[25]
<b>Almond seed (<i>Amygdalus communis</i> L.)</b>	8,5	65 °C	Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Minyak kedelai	-	[65]
<b>Laurel seed (<i>Laurus nobilis</i> L.)</b>	8,0	50 °C	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	-	Minyak laurel	-	[66]
<b>Bamboo Shoots Betung (<i>Dendrocalamusasper</i>)</b>	7,0	30 °C	-	-	Minyak kelapa	-	[56]
<b>Wheat seed (<i>Triticum aestivum</i> L.)</b>	8,0	37 °C	-	-	Triolein	-	[67]
<b>Oat seed</b>	9,0	65 - 75 °C	Ca <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	p-	-	[68]

(Avena fatua)					nitrofenil palmitat		
Coconut seed (Cocos nucifera Linn)	8,5	30 - 40 °C	-	-	Minyak zaitun	Sn-1 Sn-3	[69]
Biji karet (Hevea brasiliensis)	7,0	40 °C.	-	-	Minyak kelapa sawit	-	[55]
Biji Alpkat (Persea americana Mill)	6	35 °C	-	-	Minyak zaitun	-	[10]

## KESIMPULAN

Lipase merupakan salah satu biokatalis yang dibutuhkan saat ini karena kemampuannya dalam mempercepat berbagai reaksi. Artikel-artikel lain yang menunjukkan tentang isolasi lipase dari berbagai biji telah banyak yang diterbitkan. Eksplorasi tentang sumber lipase dari biji-bijian harus dilakukan secara berkelanjutan dengan disertai penentuan karakteristik dari tiap lipase biji. Hasil dari berbagai penelitian tersebut memungkinkan untuk mendapatkan lipase yang diperoleh secara mudah dan murah.

## REFERENCES

1. Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. 2011. Overview of Fungal Lipase : A Review. *Application Biochemistry Biotechnology* , 486-520.
2. Borelli, G., and Trono, D. 2015. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Uses as Biocatalysts for Industrial Application. *Int. J. Mol. Sci* , 20774-20840.
3. Freire, G. D. M. and Castilho, F. L. 2008 Lipases in Biocatalysis. In: Bon et al. (org). *Enzymes in biotechnology: Production, Application and Market*. Rio de Janeiro, Interciencia
4. Ginting, H.A., Zuhrina , M., Tjahjono, H., Denny, S.S. 2017. Sintesis Biosurfaktan Karbohidrat Ester dari Asam Palmitat dan Fruktosa Menggunakan Enzim Lipase Terimobilisasi. *Jurnal Teknik Kimia USU*, Vol.6. No.2
5. Wahyuningsih, Edy, S. dan R.T.D. Wisnu Broto. 2018. Biokatalisator Lipase Dedak Padi Untuk Proses Asidolisis Minyak Tuna Dan Asam Laurat. *Metana*, 14(1) :11-14
6. Molinari, F., Romano, D., Villa, R., and Clark, J. (2011) *Comprehensive Biotechnology. In Production of Fine Chemicals by (Bio)Transformation of Agro-Food Byproducts and Wastes*, 2nd ed. Burlington, MA, USA: Academic Press
7. Wardhani, A.K., Chusnul, H., Pudji, H. 2016. Enzymatic Phorbol Esters Degradation using The Germinated Jatropha Curcas Seed Lipase As Biocatalysts: Optimization Process Conditions By Respon Surface Methodology. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*, 11(3): 346-353

8. Lehninger, A. L. 1997. Dasar-Dasar Biokimia. Jilid I (Edisi Revisi). Erlangga, Jakarta
9. Sirisha, E., Rajasekar, N. and Lakshmi Narasu, M. 2010. Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research*. 4 (5): 249-252.
10. Sya'bani, N., Astuti, W., dan Pratiwi, D. R. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Lipase dari Kecambah Biji Alpukat. *Jurnal Atomik*, 209-212.
11. Chandler, I. 2001. Determining The Regioselectivity Of Immobilized Lipase In tryacylglycerol Acidolysis Reaction. *JAOCS*, 737-742
12. Albayati, S.H., Malihe, M., Siti, N.H.I., Mohd, S., Mohammad, A., Adam, L.T., Fairolniza, Noor, D., Raja, N.Z. 2020. Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. *Catalysts*
13. Barros, M., Fleuri, L.F. and Macedo, G.A. 2010. Seed Lipases : Sources, Application, and Properties – A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol 27, No.01. pp. 15-29
14. Svendsen, A. 1994. Sequence Comparison Within the Lipase Family. *Lipases, Their structure, Biochemistry and Application*, 15.
15. Bose, A. and Keharia, H. 2013. Production, Characterization And Applications Of Organic Solvent Tolerant Lipase By Pseudomonas Aeruginosa AAU2. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2(3): 255–266.
16. Liew, Y.X., Chan, Y.J., Show, P.L., Manickam, S., and Chong, M.F. 2015. Optimization Of Alkaline Lipase Production From Burkholderia Cepacia Through Submerged Fermentation. *Chem. Eng. Trans.*, 45:1675–1680.
17. Gupta, N., Sahai, V., and Gupta, R. 2007. Alkaline Lipase From A Novel Strain Burkholderia Multivorans: Statistical Medium Optimi- Zation And Production In A Bioreactor. *Process Biochem*, 42(4):518–526.
18. Colla, L.M., Primaz, A.L., Benedetti, S., Loss, R.A., de Lima, M., and Reinehr, C.O. 2016. Surface Response Methodology For The Optimization Of Lipase Production Under Submerged Fermentation By filamentous Fungi. *Braz. J. Microbiol.*, 47(2): 461–467.
19. Basheer, S.M., Chellappan, S., Beena, P.S., Sukumaran, R.K., Elyas, K.K., and Chandrasekaran, M. 2011. Lipase From Marine Aspergillus Awamori BTMFW032: Production, Partial Purification And Application In Oil Effluent Treatment. *N. Biotechnol.*, 28(6):627–638.
20. Mukherjee, K.D and M.J. Hill. 1994. *Lipase From Plants*. Cambridge: Cambridge University Press
21. Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., and Fernández-Lafuente, R., 2013. Characterization Of The Catalytic Properties Of Lipases From Plant Seeds For The Production Of Concentrated Fatty Acids From Different Vegetable Oils. *Ind. Crop. Prod.*, 49: 462–470.
22. Moussavou Mounquengui, R.W., Brunshwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., and Blin, J. 2013. Are Plant Lipases A Promising Alter- Native To Catalyze Transesterification For Biodiesel Production? *Prog. Energy Combust. Sci.*, 39(5): 441–456.
23. De Sousa, J.S., Cavalcanti-Oliveira, E.D.A., Aranda, D.A.G., and Freire, D.M.G. 2010 Application Of Lipase From The Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) To A New Hybrid (Enzyme/Chemical) Hydroester- Ification Process For Biodiesel Production. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 65(1–4): 133–137.
24. Hidayat, C., Hastuti, P., Utazmi, S., Wardhani, A.K., and Pradipta, D.S. 2014. Enhancing Indigenous Lipase Activity Of Germinated *Jatropha Curcas* L. Seeds For The Enzymatic Degradation Of Phorbol Ester. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 3(3): 71–76.

25. Polizelli, P. P. Tiera, M. J. and Bonilla-Rodriguez, G. O. 2008. Effect of Surfactants and Polyethylene Glycol on the Activity and Stability of a Lipase from Oilseeds of *Pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, No. 8, 749
26. Zhou, Y.-J., Hu, C.-L., Wang, N., Zhang, W.-W., and Yu, X.-Q. 2013. Purification Of Porcine Pancreatic Lipase By Aqueous Two-Phase Systems Of Polyethylene Glycol And Potassium Phosphate. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 926: 77–82.
27. Zarai, Z., Ali, M.B., Fendri, A., Louati, H., Mejdoub, H., and Gargouri, Y. 2012. Purification And Biochemical Properties Of *Hexaplex trunculus* Digestive Lipase. *Process Biochem*, 47(12):2434–2439.
28. Rivera-Perez, C., Del Toro, M.D.L.A.N., and Garcia-Careno, F. 2011. Purification And Characterization Of An Intracellular Lipase From Pleopods Of Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 158(1): 99–105.
29. Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., and Yan, Y. 2016. A New Extracellular Thermo-Solvent-Stable Lipase From *Burkholderia Ubonensis* SL-4: Identification, Characterization And Application For Bio- Diesel Production. *J. Mol. Catal. B Enzyme*. 126: 76–89.
30. Volpato, G., Filice, M., Ayub, M.A.Z., Guisan, J.M., and Palomo, J.M. 2010. Single-step Purification Of Different Lipases From *Staphylococcus warneri*. *J. Chromatogr. A.*, 1217(4): 473–478.
31. Sharma, D., Kumbhar, B.K., Verma, A.K., and Tewari, L. 2014. Optimization of Critical Growth Parameters For Enhancing Extracellular Lipase Production By Alkalophilic *Bacillus* sp. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 3(4): 205–211.
32. Shakila Begam, M., Stanly Pradeep, F., and Pradeep, B.V. 2012. Production, Purification, Characterization And Applications Of Lipase From *Serratia marcescens* MBB05. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 237–245.
33. Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P.M., and Narayan, B. 2016. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/Phosphate Aqueous-Two Phase System (ATPS) And Its Biochemical Characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 6: 19–27.
34. Gururaj, P., Ramalingam, S., Nandhini Devi, G., and Gautam, P. 2016. Process Optimization For Production And Purification Of A Thermostable, Organic Solvent Tolerant Lipase From *Acinetobacter* sp. AU07. *Braz. J. Microbiol.*, 47(3): 647–657.
35. Toscano, L., Montero, G., Cervantes, L., Stoytcheva, M., Gochev, V., and Beltran, M. 2013. Production and Partial Characterization Of Extracellular Lipase from *Trichoderma harzianum* by Solid-State Fermentation. *Biotechnol. Biotec. Eq.*, 27(3): 3776–3781.
36. Taskin, M., Ucar, M.H., Unver, Y., Kara, A.A., Ozdemir, M., and Ortucu, S. 2016. Lipase Production With Free And Immobilized Cells Of Cold-Adapted Yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 8: 97–103.
37. Smaniotto, A., Skovronski, A., Rigo, E., Tsai, S.M., Durrer, A., and Foltran, L.L. 2014. Concentration, Characterization And Application Of Lipases From *Sporidiobolus pararoseus* Strain. *Braz. J. Microbiol.*, 45(1): 294–301.
38. Salihu, A., Alam, M.Z., AbdulKarim, M.I., and Salleh, H.M. 2011. Effect Of Process Parameters On Lipase Production by *Candida cylindracea* in Stirred Tank Bioreactor Using Renewable Palm Oil Mill Effluent

- Based Medium. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 72(3-4): 187-192.
39. Romdhan, I.-B.-B., Fendri, A., Frikha, F., Gargouri, A., and Belghith, H. 2012. Purification, Physico-Chemical And Kinetic Properties Of The Deglycosylated *Talaromyces thermophilus* lipase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 51(5): 892-900.
  40. Ramos, E.Z., Junior, R.H.M., de Castro, P.F., Tardioli, P.W., Mendes, A.A., and Fernandez-Lafuente, R. 2015. Production and Immobilization of *Geotrichum candidum* Lipase Via Physical Adsorption On Eco-Friendly Support: Characterization Of The Catalytic Properties in Hydrolysis and Esterification Reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 118: 43-51.
  41. Andrade, M.M., Barbosa, A.M., Bofinger, M.R., Dekker, R.F., Messias, J.M., and Guedes, C.L. 2013. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, And Application For Biodiesel Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170(7): 1792-1806.
  42. Patui, S., Clincon, L., Peresson, C., Zancani, M., Conte, L., and Del Terra, L. 2014. Lipase Activity and Antioxidant Capacity in Coffee (*Coffea arabica* L.) Seeds During Germination. *Plant Sci.*, 219-220:19-25.
  43. Jung, H. and Moon, S. 2013. Purification, Distribution, And Characterization Activity of Lipase From Oat Seeds (*Avena sativa* L.). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 56(6): 639-645.
  44. Amid, M., Manap, M.Y., Hussin, M., and Mustafa, S. 2015. A Novel Aqueous Two Phase System Composed Of Surfactant And Xylitol For The Purification Of Lipase From Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Seeds And Recycling Of Phase Components. *Mol.*, 20(6): 11184-11201.
  45. Quettier, A. L. and Eastmond, P. J. 2009. Storage Oil Hydrolysis During Early Seedling Growth. *Plant Physiology and Biochemistry* : 485
  46. Paques, F. W. and Macedo, G. A. 2006. Vegetable Latex Lipases: Properties and Industrial Applications: A Review. *Quimica Nova*, 29, No. 1, 93
  47. Villeneuve, P. 2003. Plant Lipases and Their Applications in Oils and Fats Modification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, No. 6, 308
  48. Dzulkarnain, Winni, A., Saibun, S. 2018. Isolasi Dan Penentuan Kondisi Kerja Optimum Lipase Dari Perkecambahan Biji Durian (*Durio zibethinus* L.). *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unmul*.
  49. Hendrik, G., Mellissa, E.S.L., dan Merpiseldin, N. 2020. Aktivitas Hidrolisis Ekstrak Kasar Lipase dari Kecambah Biji Kesambi (*Schleira oleosa* L) dengan Variasi Waktu Perkecambahan. *Sciscitatio*. Vol.1. No.2. Hal: 94-100
  50. Miranda ASD, Miranda L, Souza RD. 2015. Lipases : Valuable Catalysts for Dynamic Kinetic Resolutions. *Biotechnol Adv.* 33(5):372-393
  51. Adlercreutz P. 2013. Immobilisation and Application of Lipases in Organic Media. *Chem Soc Rev.* 42(15):6406-6436.
  52. Quettier, A. L., Shaw, E. and Eastmond, P. J. 2008. Sugar dependents Encodes a Mitochondrial FAD dependent Glyceol-3-phosphate Dehydrogenase, Which is Required for Glycerol Catabolism and Post-germinative Seedling Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148, No. 1, 519
  53. Yuneta R; Saputra S.R, 2010, Pengaruh Suhu Pada Lipase Dari Bakteri *Bacillus Subtilis*, *Prosiding Kimia FMIPA*, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya
  54. Hutasoit, N., Putu, T.I., I Dewa, G.M.P. 2016. Optimasi pH dan Suhu Pada Aktivitas Enzim Lipase dari Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Berkapang.

- Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. Vol.5, No.2
55. Amalia, R., Bulan, R., dan Sebayang, F. 2013. Penentuan pH Dan Suhu Optimum Untuk Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Lipase Dari Kecambah Biji Karet (*Hevea brasiliensis*) Terhadap Hidrolisis PKO (Palm Kernel Oil). *Jurnal Sainia Kimia* , 10-15.
56. Prasetyo, A., Winni, A., dan Chairul, S. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Lipase dari Rebung Bambu Betung (*Dendrocalamus asper*). *Jurnal Kimia FMIPA Unmul*. Vol.15, No. 1
57. Emmanuel, U.C., Nduka, C., Maduka, H.C.C., Okpogba, A.N., Ogueche, P.N. 2019. Determination of Lipase Activities and Lipid Peroxidation Level of Fermented Oil Bean Seeds (*Ugba, Pentaclethra macrophylla*), Cator Oil Seeds (*Ogiri, Ricinus communis*) and Millet Seeds (*Kunu, Eleusine coracana*). *American Journal of Food Science and Technology*. Vol.7, No.5, pp. 157-160
58. Hames D, Hooper N. 2005. *Biochemistry* 3th. New York: Taylor and Francis
59. Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
60. Nelson, D.L., dan Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. Ed ke4. New York: Worth Publisher
61. Baehaki, A., Tati N., Maggy T.S.,. 2005. Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen Ikan *Aeromonas hydrophilla*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 8(2):60-72.
62. Enujiugha, V. N., Thani, F. A., Sanni, T. M., and Abigor, R. D. 2004. Lipase Activity In Dormant Seeds of the African Oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Food Chemistry* 88 , 405-410.
63. Abigor, R. D., Uadia, P. O., Foglia, T. A., Haas, M. J., Scott, K. and Savary, B. J. 2002. Partial Purification and Properties of Lipase From Germinating Seeds of *Jatropha curcas*. L. *Journal of the American Oil chemist's Society*. 79, No. 11, 1123
64. Borek, S., Ratajczak, W., Ratajczak, L. 2006. Ultrastructural and Enzymatic Research on the Role of Sucrose in Mobilization Storage Lipids in Germinating Yellow Lupine Seeds. *Plant Science*, 170, No. 3, 441
65. Yesiloglu, Y. and Baskurt, L. 2008. Partial Purification and Characterization of Almond Seed Lipase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38, No.4
66. Isbilir, S. S., Ozcan, M. H. and Yagar, H. 2008. Some Biochemical Properties of Lipase from Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.) Seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, No. 3, 227.
67. Korneeva, O. S., Popova, T. N., Kaprochikov, V. S. and Montina, E. A. 2008. Identification of Catalytically Active Groups of Wheat (*Triticum aestivum*) Germ Lipase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, No. 4, 349
68. Mohamed, M., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A. and Fahmy, A. S. 2000. Distribution of Lipases in the Gramineae. Partial Purification and Characterization of Esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, 73, No. 3, 227
69. Ejedegba, B. O., Onyeneke, E. C. and Oviasogie, P. O. 2007. Characteristics of Lipase Isolated from Coconut (*Cocos nucifera* linn) Seed Under Different Nutrient Treatments. *African Journal of Biotechnology*, 6, No. 6, 723