

**PENGARUH TWEEN 80 TERHADAP PRODUKSI LIPASE
OLEH *Aspergillus niger* 6516
MELALUI *SOLID STATE FERMENTATION***

SKRIPSI

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)**



**Disusun oleh :
Gara Handhito
NIM : 31081157**

**FAKULTAS BIOTEKNOLOGI
UNIVERSITAS KRISTEN DUTA WACANA
YOGYAKARTA
2012**

Skripsi yang Berjudul

**PENGARUH TWEEN 80 TERHADAP PRODUKSI LIPASE
OLEH *Aspergillus niger* 6516
MENGUNAKAN SOLID STATE FERMENTATION**

Yang disusun oleh:

GARA HANDHITO

NIM : 31081157

Telah dipertahankan di depan Sidang Penguji

Pada Tanggal : 24 September 2012

Skripsi tersebut telah diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Yogyakarta, 24 September 2012

Universitas Kristen Duta Wacana

Fakultas Bioteknologi



Pembimbing,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Guntoro', is written over a faint circular stamp.

(Dr. rer. nat. Guntoro)

Dekan,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kisworo', is written over a faint circular stamp.

(Drs. Kisworo, M.Sc.)



UNIVERSITAS KRISTEN DUTA WACANA
FAKULTAS BIOTEKNOLOGI

PROGRAM STUDI : BIOLOGI

Kompetensi : • Bioteknologi Lingkungan • Bioteknologi Industri • Bioteknologi Kesehatan

Jl. Dr. Wahidin S. 5-25, Yogyakarta 55224 Indonesia

Phone : (0274) 563929 (Ext. 459) Fax. : (0274) 513235

BERITA ACARA
UJIAN SKRIPSI & PENDADARAN

Nomor : 787/C.06/Bio/UKDW/IX/2012

Pada hari ini : Selasa 24 September 2012

Bertempat di Universitas Kristen Duta Wacana Jl. Dr. Wahidin 5 – 25 Yogyakarta

TELAH DISELENGGARAKAN UJIAN SKRIPSI

Nama Mahasiswa : Gara Handito
Nomor Mahasiswa : 31081157
Program Studi/Jurusan : BIOLOGI
Fakultas : BIOTEKNOLOGI
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS KRISTEN DUTA WACANA

Judul Skripsi : Pengaruh Tween 80 terhadap Produksi Lipase oleh *Aspergillus niger* 6516 melalui Solid-State Fermentation

Saudara tersebut dinyatakan : LULUS / TIDAK LULUS

Dengan nilai : _____

Catatan : _____

SUSUNAN TIM PENGUJI

No.	NAMA	Jabatan dlm Tim	Jabatan Akademik	Tanda Tangan
1.	Dr. Langkah Sembiring, M.Sc	Ketua/Anggota	Lektor Kepala	
2.	Dr. Guntoro	Anggota		
3.	Dra. Aniek Prasetyaningsih .M.Si	Anggota		

Berita Acara ini dibuat dengan sesungguhnya untuk dapat dipergunakan seperlunya

Mengetahui Dekan,

Drs. Kisworo, M.Sc
Kw.ynt.pdr

Yogyakarta, 24 September 2012

Ketua Tim Penguji

Dr. Langkah Sembiring, M.Sc

QADW-2241-BO-11.11.005

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Gara Handhito

NIM : 31081157

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 24 September 2012



Gara Handhito

**Takut akan Tuhan adalah permulaan pengetahuan,
tetapi orang bodoh menghina hikmat dan didikan.**

(Amsal 1: 7)



*Ku persembahkan untuk keluarga tercinta,
Bapak, Ibu, Mbak Titin, Mbak Lilin, dan Mas Yohan*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan pada Bapa di sorga, atas hikmat, kebijaksanaan, bimbingan, dan penyertaan selama ini, hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Skripsi ini merupakan sebagian persyaratan untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta. Terwujudnya skripsi ini, dari tahap penelitian hingga penulisan, tidak lepas dari bantuan banyak pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan banyak terima kasih kepada:

Dr. rer. nat. Guntoro

Selaku Dosen Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, serta dosen pembimbing, yang dengan sabar membimbing dan mendorong semangat penulis selama penelitian hingga penulisan

Dr. Langkah Sembiring, M.Sc.

Selaku Dosen Penguji I, untuk dukungan dan saran yang diberikan

Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si.

Selaku Dosen Penguji II, untuk masukan dan perhatiannya

Bapak, Ibu, Mbak Titin, Mbak Lilin, dan Mas Yohan

Atas curahan dukungan dan kasih sayang dalam keluarga

Yang tercinta: Yohana Vira Pramudita Baskoro Putri

Thank you for loving me ♥

Redy, Lita, Dior, Bang Teno, Tatok, Rissa, Obet, Joshua, Josephine, dan Ruth
Teman-teman kontrakan 388 yang telah berbagi suka dan duka, serta Alakene Band
sebagai wadah bermusik dan berkarya

Mas Hari dan semua laboran Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta

Wacana

Untuk saran dan bantuan yang telah diberikan

Mbak Yanti dan Mas Yamto

Atas informasi dan keramahannya

Voni, Bibin, dan Tiwi

Teman-teman sekerja lab Mikrobiologi yang telah membagikan keceriaan selama
penelitian

Daniar, Tyan, Sari, dan Yuesef

Atas masa-masa yang indah selama bermusik dan berkarya di Incube

Pihak-pihak lain yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu dalam penyelesaian studi dan skripsi.

Akhir kata, semoga skripsi yang jauh dari sempurna ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Yogyakarta, 24 September 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
BERITA ACARA UJIAN SKRIPSI & PENDADARAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN MOTTO & PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Kebutuhan Energi di Indonesia.....	6
B. Biodiesel sebagai Energi Alternatif Terbarukan.....	7
C. Produksi Biodiesel.....	8
1. Katalis Kimia.....	9
2. Katalis Biologis.....	11
D. Lipase.....	12
E. <i>Aspergillus niger</i> sebagai Penghasil Lipase.....	14
F. Solid State Fermentation.....	15
G. Nutrisi bagi Mikroorganisme Penghasil Lipase.....	16
1. Sumber Karbon.....	17

2. Sumber Nitrogen.....	17
H. Limbah Agroindustri sebagai Substrat SSF.....	18
1. Dedak Padi.....	19
2. Bungkil Jarak.....	20
3. Ampas VCO.....	21
I. <i>Inducer</i> dalam Ekspresi Gen.....	21
J. Tween 80 sebagai <i>Inducer</i> dalam Produksi Lipase.....	23
BAB III. HIPOTHESIS.....	25
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN.....	26
A. Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	26
B. Bahan dan Alat.....	26
1. Bahan.....	26
2. Alat.....	27
C. Parameter yang Diukur.....	28
D. Cara Kerja.....	28
1. Persiapan Bahan Medium <i>Solid State Fermentation</i>	28
2. Persiapan Inokulum.....	30
3. Pembuatan Medium <i>Solid State Fermentation</i>	31
4. Ekstraksi <i>Crude</i> Lipase.....	32
5. Pengujian Aktivitas Esterifikasi <i>Crude</i> Ekstrak Hasil SSF.....	33
6. Penghitungan Konsentrasi Protein dalam <i>Crude</i> Ekstrak Hasil SSF.....	33
7. Optimasi Medium SSF Menggunakan Tween 80.....	34
E. Analisis Data.....	35
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
A. Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Esterifikasi dan Konsentrasi Protein <i>Crude</i> Ekstrak Hasil SSF.....	36
B. Pengaruh Penambahan Tween 80 dengan Konsentrasi $\leq 1\%$ terhadap Aktivitas Esterifikasi dan Konsentrasi <i>Crude</i> Ekstrak Hasil SSF.....	40

C. Pengaruh Penambahan Tween 80 dengan Konsentrasi $\geq 1\%$ terhadap Aktivitas Esterifikasi dan Konsentrasi <i>Crude</i> Ekstrak Hasil SSF.....	44
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
A. Kesimpulan.....	49
B. Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN.....	54

© UKDW

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Cadangan Energi Fosil di Indonesia.....	6
Tabel 4.1. Komposisi Medium Teroptimasi.....	31

© UKDW

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Reaksi Transesterifikasi untuk Menghasilkan Biodiesel.....	8
Gambar 2.2. Tahap-tahap Reaksi Transesterifikasi.....	9
Gambar 2.3. Gambaran Struktur Lipase secara Skematis.....	13
Gambar 2.4. Skema Dasar <i>Two-Component System</i>	22
Gambar 5.1. Aktivitas Spesifik Esterifikasi Ekstrak Hasil SSF dari Substrat Dedak Padi, Ampas VCO, dan Bungkil Jarak.....	36
Gambar 5.2. Yield Protein Protein Ekstrak Hasil SSF dari Substrat Dedak Padi, Ampas VCO, dan Bungkil Jarak.....	39
Gambar 5.3. Aktivitas Spesifik Esterifikasi dan Yield Protein Ekstrak Hasil SSF pada Substrat Ampas VCO pada Penambahan Tween 80 Konsentrasi 0-1%.....	40
Gambar 5.4. Yield Aktivitas Esterifikasi Ekstrak Hasil SSF pada Substrat Ampas VCO dengan Penambahan Tween 80 Konsentrasi 0-1%.....	41
Gambar 5.5. Aktivitas Spesifik Esterifikasi dan Yield Protein Ekstrak Hasil SSF pada Substrat Ampas VCO pada Penambahan Tween 80 Konsentrasi 0-6%.....	45
Gambar 5.6. Yield Aktivitas Esterifikasi Ekstrak Hasil SSF pada Substrat Ampas VCO dengan Penambahan Tween 80 Konsentrasi 0-6%.....	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Kadar Protein Terlarut Lowry.....	54
Lampiran 2. Kurva Standar Asam Oleat.....	56
Lampiran 3. Hasil Uji Aktivitas Esterifikasi dan Protein Terlarut.....	58
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian.....	60

© UKDW

**PENGARUH TWEEN 80 TERHADAP PRODUKSI LIPASE
OLEH *Aspergillus niger* 6516
MELALUI *SOLID STATE FERMENTATION***

ABSTRAK

**OLEH:
GARA HANDHITO**

Biodiesel merupakan bahan bakar alternatif terbarukan yang marak diteliti saat ini. Produksinya dapat dilakukan menggunakan katalis kimia maupun biologis, dimana salah satunya adalah lipase. Jamur *Aspergillus niger* 6516 dikenal sebagai salah satu spesies mikroorganisme yang paling baik dalam menghasilkan lipase. Hasil sampingan agroindustri seperti ampas VCO, dedak padi, dan bungkil jarak, dapat digunakan sebagai substrat untuk memproduksi lipase dengan menggunakan metode *Solid State Fermentation*.

Ketiga substrat tersebut diseleksi terlebih dahulu untuk mengetahui substrat mana yang mendukung produksi lipase berupa *crude* ekstrak dengan yield aktivitas esterifikasi tertinggi. Ampas VCO menghasilkan *crude* ekstrak dengan yield aktivitas esterifikasi tertinggi, yaitu 47,15 U/g dss. Ampas VCO selanjutnya digunakan dalam produksi *crude* ekstrak melalui SSF, yang dilihat pengaruhnya bila diberi perlakuan penambahan Tween 80 dalam medium pertumbuhan. Pemberian Tween 80 dengan konsentrasi 0,6-1% menghasilkan *crude* ekstrak dengan rata-rata yield aktivitas esterifikasi $222,68 \pm 14,13$ U/g dss. Semakin tinggi konsentrasi Tween 80 yang diberikan, yield aktivitas esterifikasi semakin turun, hingga mencapai 32,2 U/g dss pada konsentrasi 6%.

Tween 80 dapat digunakan sebagai *inducer* dalam SSF menggunakan ampas VCO sebagai substrat, dengan konsentrasi 1% memberikan yield aktivitas esterifikasi tertinggi, yaitu 239,4 U/g dss.

Kata kunci: ampas VCO, dedak padi, bungkil jarak, *crude* ekstrak, aktivitas esterifikasi, *Aspergillus niger* 6516, Solid State Fermentation, Tween 80.

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Energi merupakan kebutuhan mutlak yang diperlukan dalam kehidupan manusia, serta ketersediaannya memberikan pengaruh besar terhadap kemajuan pembangunan Indonesia. Seiring dengan kebutuhan energi yang semakin meningkat, cadangan energi fosil yang tersisa pun semakin menipis akibat sifatnya yang tidak terbarukan. Pembangunan tidak hanya berlaku untuk generasi sekarang, tetapi juga untuk generasi-generasi mendatang, sehingga dalam kerangka pembangunan yang berkelanjutan, penemuan sumber energi alternatif yang terbarukan pun tidak dapat terelakkan.

Salah satu kebutuhan energi yang paling besar adalah bahan bakar, yang digunakan baik pada transportasi, industri, maupun untuk pembangkit energi lainnya. Sebagian besar bahan bakar yang digunakan saat ini adalah berasal dari bahan bakar fosil, yang cadangannya semakin menipis. Penggunaan bahan bakar fosil ini juga memiliki kekurangan, salah satunya adalah pelepasan gas rumah kaca ke atmosfer, baik dalam proses produksinya maupun dalam penggunaannya. Hal ini juga tidak diimbangi dengan penyerapannya oleh biomassa, yang saat ini semakin berkurang akibat pembukaan lahan untuk berbagai kepentingan urbanisasi maupun agroindustri. Efek yang timbul pun telah dapat kita rasakan saat ini, antara lain suhu lingkungan

yang semakin meningkat, serta tidak menentunya cuaca apabila didasarkan pada musim yang ada.

Dengan berdasar pertimbangan mengenai kekurangan yang dimiliki oleh penggunaan bahan bakar fosil tersebut, maka perlu dilakukan pengembangan bahan bakar yang terbarukan serta lebih ramah lingkungan. Bahan bakar terbarukan tersebut bahkan akan semakin meningkat nilainya apabila dapat memanfaatkan berbagai limbah industri dalam proses produksinya, sehingga dapat mengurangi biaya produksi yang diperlukan. Selain mengurangi biaya produksi, pemanfaatan limbah industri dalam produksi energi terbarukan juga dapat mengurangi akumulasi limbah yang ada.

Biodiesel merupakan salah satu bahan bakar alternatif yang menggunakan biomassa dalam proses produksinya, baik sebagai bahan baku maupun katalis produksi. Kelebihan yang dimiliki oleh biodiesel adalah gas rumah kaca, terutama karbondioksida, yang dilepaskan ke atmosfer dalam penggunaannya, akan masuk dalam siklus karbon untuk kembali dibentuk menjadi biomassa. Dibandingkan produksi dan penggunaan bahan bakar fosil yang terus menghasilkan gas rumah kaca tanpa dapat menggunakannya kembali, maka emisi yang dihasilkan produksi dan penggunaan biodiesel tentu lebih kecil. Katalis yang digunakan dalam produksi biodiesel juga dapat dihasilkan dari biomassa. Lipase yang merupakan enzim lipolitik, juga dapat berperan dalam proses esterifikasi maupun trans-esterifikasi, yang merupakan pembentukan biodiesel dari asam lemak bebas maupun trigliserida, dengan kata lain, produksi biodiesel.

Berbagai riset telah dilakukan dalam rangka meningkatkan kuantitas produksi biodiesel, disamping mengurangi biaya produksinya. Salah satu penelitian yang dapat dilakukan adalah mengenai lipase yang berfungsi sebagai katalisnya. Lipase yang merupakan katalis biologis tentu memiliki perbedaan apabila dibandingkan dengan katalis kimia, yang juga dapat digunakan dalam produksi biodiesel. Menurut Fowler (1988), keunggulan enzim sebagai katalis terletak pada aktivitasnya yang spesifik terhadap substrat serta kemampuannya dalam menurunkan energi aktivasi sehingga reaksi berjalan lebih cepat dan berlangsung pada kondisi normal tanpa memerlukan suhu dan tekanan yang tinggi. Penggunaan katalis biologis tentu dapat mengurangi biaya yang dibutuhkan dalam produksi biodiesel jika dibandingkan dengan katalis kimia yang membutuhkan energi aktivasi serta tekanan yang tinggi.

Banyaknya riset yang telah dilakukan mengenai produksi lipase menghasilkan bahwa salah satu organisme penghasil lipase yang baik adalah *Aspergillus niger*. Kapang ini mampu memproduksi lipase apabila diberikan substrat yang mengandung lipid. *Aspergillus niger* dapat tumbuh serta diiringi dengan produksi lipase dengan metode *Solid State Fermentation* yang berisi medium yang mengandung lipid. Lipase yang diproduksi tersebut dapat bervariasi dalam hal kualitas dan kuantitas, tergantung dari kandungan karbon, nitrogen, serta lipid yang ada dalam substrat, *inducer* untuk menstimulasi produksi lipase, serta *enhancer* yang berfungsi untuk meningkatkan produksi serta aktivitas lipase.

Beberapa limbah maupun produk sampingan industri agroindustri masih memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi, antara lain ampas VCO, dedak padi,

serta bungkil biji jarak. Produk sampingan industri ini tentu akan memiliki nilai ekonomi yang lebih apabila dapat dimanfaatkan kembali, salah satunya adalah sebagai substrat dalam produksi lipase. Ketiga produk sampingan industri tersebut bisa didapatkan dengan mudah dengan harga yang murah, yang tentu saja dapat meningkatkan produksi lipase dalam mendukung produksi biodiesel.

Dalam review yang berjudul *Microbial Lipases: Production and Applications* (Ghosh *et al.*, 1996) diungkapkan bahwa salah satu enhancer yang dapat meningkatkan produksi serta aktivitas lipase yang dihasilkan oleh mikrobia adalah Tween 80. Tween 80 merupakan surfaktan dan emulsifier yang lazim digunakan dalam produksi makanan, mudah didapatkan di pasaran, serta harganya murah.

B. RUMUSAN MASALAH

1. Ampas kelapa, dedak padi, dan bungkil jarak merupakan produk sampingan agroindustri. Dari ketiga substrat tersebut, manakah yang mampu menghasilkan *crude* ekstrak dengan yield aktivitas esterifikasi tertinggi jika dilakukan Solid-state Fermentation oleh *Aspergillus niger* 6516?
2. Tween 80 merupakan enhancer yang dapat meningkatkan aktivitas lipase yang dihasilkan melalui Solid-state Fermentation. Bagaimana pengaruh konsentrasi Tween 80 terhadap aktivitas esterifikasi *crude* ekstrak yang dihasilkan dan yield protein, serta konsentrasi Tween 80 berapakah yang memberikan *crude* ekstrak dengan yield aktivitas esterifikasi tertinggi?

C. TUJUAN PENELITIAN

1. Untuk mengetahui substrat manakah yang dapat menghasilkan *crude* ekstrak dengan yield aktivitas esterifikasi tertinggi.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian Tween 80 sebagai enhancer terhadap aktivitas esterifikasi dan yield protein dari *crude* ekstrak yang dihasilkan.

D. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai:

1. Referensi bagi pemanfaatan limbah atau hasil sampingan agroindustri untuk memproduksi lipase. Pemanfaatan ini dapat memberikan nilai tambah bagi hasil sampingan agroindustri.
2. Landasan bagi penelitian lebih lanjut mengenai produksi lipase oleh *Aspergillus niger* 6516, atau produksi lipase menggunakan limbah agroindustri sebagai substrat, dalam kerangka produksi bahan bakar alternatif terbarukan.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

A. SIMPULAN

Dari hasil penelitian mengenai pengaruh Tween 80 terhadap aktivitas esterifikasi dan yield protein *crude* ekstrak yang dihasilkan melalui SSF menggunakan hasil sampingan agroindustri oleh *Aspergillus niger* 6516, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. SSF menggunakan ampas VCO menghasilkan *crude* ekstrak dengan yield aktivitas esterifikasi tertinggi dibandingkan dengan dedak padi dan bungkil jarak.
2. Tween 80 meningkatkan yield aktivitas esterifikasi *crude* ekstrak hasil SSF hingga konsentrasi tertentu, dalam penelitian ini yaitu 1%.

B. SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi lipase yang dihasilkan melalui SSF dengan penambahan Tween 80 untuk mengetahui apakah Tween 80 berpengaruh terhadap karakter maupun stabilitas lipase yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., K. V. V. S. N. Bapi Raju, M. Iqbal Zargar, R. Bhavani Devi, P. Jhansi Lakshmi, P. Ellaiah. 2004. **Optimization of Process Parameters for Production of Lipase in Solid-State Fermentation by Newly Isolated *Aspergillus* Species**. Indian Journal of Biotechnology 3:65-69.
- Aksoy, H. A., I. Kahraman, F. Karaosmanoglu, H. Civelekoglu. 1988. JAOCS 65:936-8.
- Asahara, T., M. Matori, M. Ikemoto, O. Yasuhide. 1993. **Production of Two Types of Lipases with Opposite Positional Specificity by *Geotrichum* sp. F0401B**. Biosci. Biotech. Biochem. 57(3):390-394.
- Balashev, K., T. R. Jensen, K. Kjaer, T. Bjornholm. 2001. **Novel Methods for Studying Lipids and Lipases and Their Mutual Interaction at Interfaces: Part I. Atomic Force Microscopy**. Biochimie 83:387-97.
- Barnwal, B. K., M. P. Sharma. 2005. **Prospects of Biodiesel Production from Vegetable Oils in India**. Renew Sust Energy Rev 9(4):363-78.
- Boekema, Bouke K.H.L., A. Beselin, M. Breuer, B. Hauer, M. Koster, F. Rosenau, K. Jaeger, J. Tommassen. 2007. **Hexadecane and Tween 80 Stimulate Lipase Production in *Burkholderia glumae* by Different Mechanisms**. Appl Environ Microbiol. 73(12):3838-3844.
- Budiman, S., Sukrido, A. Harliana. 2010. **Pembuatan Biobriket dari Campuran Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Sekam sebagai Bahan Bakar Alternatif**. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. 19583.
- Chang, Caren, R.C. Stewart. 1998. **The Two Component System: Regulation of Diverse Signaling Pathways in prokaryotes and Eukaryotes**. Plant Physiol. 117:723-731.
- Chen, S.J., C. Y. Cheng, T. L. Chen. 1998. **Production of An Alkaline Lipase by *Acinetobacter radioresistens***. J. Ferment. Bioeng. 86:308-312.
- Dalmau, E., J. L. Montesinos, M. Lotti, C. Casas. 2000. **Effect of Different Carbon Sources on Lipase Production by *Candida rugosa***. Enzyme Microb Technol 26:657-663.
- Damaso, M. C. T., M. A. Passianoto, S. C. Freitas, D. M. G. Freire; R. C. A. Lago, S. Couri. 2008. **Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase Production by Solid State Fermentation**. Braz. J. Microbiol. 39: 676-681.
- Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral. 2005. **Blueprint Pengelolaan Energi Nasional**.
- Dutra, J. C. V., S. C. Terzi, J. V. Bevilaquia, M. C. T. Damaso, S. Couri, M. A. P. Langone, L. F. Senna. 2008. **Lipase Production in Solid-State Fermentation Monitoring Biomass Growth of *Aspergillus niger* Using Digital Image Processing**. Applied Biochemistry and Biotechnology 147(1-3):63-75.
- Elibol, M., D. Ozer. 2001. **Influence of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Rhizopus arrhizus***. Process Biochem. 36:325-329.

- Falony, G., J. Coca Armas, J. C. Dustet Mendoza, J. L. Martinez Hernandez. 2006. **Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation**. Food Technol. Biotechnol. 44 (2):235–240.
- Fowler, M. W.. 1988. **Enzyme Technology in Biotechnology For Engineers, Biological System in Technological Processes**, Edited: Scragg, A. H.. John Wiley & Sons: New York.
- Freedman, B., R. Butterfield, E. Pryde. 1986. **Transesterification Kinetics of Soybean Oil**. JAOCS 63(10):1375–80.
- Freedman, B., E. H. Pryde, T. L. Mounts. 1984. **Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils**. JAOCS 61(10):1638–43.
- Fukuda, H., A. Kondo, H. Noda. 2001. **Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils**. J Biosci Bioeng 92(5):405–16.
- Gao, Y., C. Breuil. 1995. **Extracellular Lipase Production by A Sapwood-staining Fungus *Ophiostoma piceae***. World J Microbiol Biotechnol 11:638–42.
- Ghosh, P. K., R. K. Saxena, R. Gupta, R. P. Yadav, S. Davidson. 1996. **Microbial Lipases: Production and Applications**. Science Progress 79(2):119-157.
- Goffman, F. D.. 2003. **Genetic Diversity for Lipid Content and Fatty Acid Profile in Rice Bran**. J. Am. Oil Chem. Soc. 80:485-490.
- Gupta, N., V. Shai, R. Gupta. 2007. **Alkaline Lipase from A Novel Strain *Burkholderia multivorans*: Statistical Medium Optimization and Production in A Bioreactor**. Process Biochemistry 42(2):518–526.
- Harrington, K. J., C. DA'rcy-Evans. 1985. Ind Eng Chem Prod Res Dev 24:314.
- Haslinawati, Wheni. 2011. Master Thesis. **Optimasi Produksi Lipase dari *Aspergillus niger* 6516 pada Medium Fermentasi Bungkil Biji Jarak Menggunakan Metode Solid State Fermentation**. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Hemachander, C., N. Bose, R. Puvanakrishnan. 2001. **Whole Cell Immobilization of *Ralstonia pickettii* for Lipase Production**. Process Biochemistry 36:629-633.
- Herawati, Heni., B. Kusbiantoro, Y. Rismayanti, Mulyani. 2008. **Pemanfaatan Limbah Pembuatan VCO**. Prosiding Seminar Nasional Teknik Pertanian.
- Ito, T., H. Kikuta, E. Nagamori, H. Honda, H. Ogino, H. Ishikawa., T. Kobayashi. 2001. **Lipase Production in Two-step Fed-batch Culture of Organic Solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03**. J Biosci Bioeng 91: 245-50.
- Kamini, N. R., J. G. S. Mala, R. Puvanakrishnan. 1998. **Lipase Production from *Aspergillus Niger* by Solid State Fermentation Using Gingelly Oil Cake**. Process Biochem. 33:505–511.
- Lee, D., Y. Kok, K. Kim, B. Kim, H. Choi, D. Kim, M. T. Suhartono, Y. Pyun. 1999. **Isolation and Characterization of A Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1**. FEMS Microbiol Lett 179:393–400.
- Li, C.Y., C. Y. Cheng, T. L. Chen. 2001. **Production of *Acitenobacter radioresistens* Lipase Using Tween 80 as the Carbon Source**. Enzyme Microb Technol 29: 258-263.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent**. J. Biol. Chem. 193 (1): 265–75.
- Ma, F., M. A. Hanna. 1999. **Biodiesel Production: A Review**. Bioresource Technol 70:1–15.
- Mahanta, N., A. Gupta, S. K. Khare. 2008. **Production of Protease and Lipase by Solvent Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* Psea in Solid State Fermentation Using *Jatropha Curcas* Seed Cake as Substrate**. Bioresour. Technol. 99:1729-1735.
- Marchetti, J.M., V.U. Miguel, A.F. Errazu. 2005. **Possible Methods for Biodiesel Production**. Science Direct Renewable and Sustainable Energy Reviews 11:1300–1311.
- Marseno, D.W., R. Indarti, Y. Ohta. 1998. **A Simplified Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay**. Indonesian Food and Nutrition Progress 5: 79-83.
- Martinelle, M., K. Hult. 1995. **Kinetics of Acyl Transfer Reactions in Organic Media Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B**. Biochimica Biophysica Acta. 1251(2): 191-197.
- Miguel, V., G. Trubiano, G. Pe´rez, D. O. Borio, A. F. Errazu. 2001. **Kinetic Analysis of Enzymatic Esterification of Fatty Acids and Ethanol**. Stud. Surf. Sci. Catal. 133:619–24.
- Miskiyah, I., Mulyawati, W. Haliza.. 2006. **Pemanfaatan Ampas Kelapa Limbah Pengolahan Minyak Kelapa Murni Menjadi Pakan**. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Mittelbach, M., B. Tratnigg. 1990. **Kinetics of Alkaline Catalyzed Methanolysis of Sunflower Oil**. Fat Sci Technol 92(4):145–8.
- Nahara, H., Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda, H. Taguchi. 1982. **Growth and Enzyme Production in Solid State Culture of *Aspergillus oryzae***. J. Ferment. Technol. 60:311–319.
- National Biodiesel Board. 1996. **Biodiesel Report**.
- Noureddini, H., D. Zhu. 1997. **Kinetics of Transesterification of Soybean Oil**. JAOCS 74(11):1457–63.
- Nutan, D., S. P. Ulka, K. B. Bastawde, J. M. Khire, D. V. Gokhale. 2002. **Production of Acidic Lipase by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation**. Process Biochem. 38:715–721.
- Okeke, C. N., B. N. Okolo. 1990. **The Effect of Cultural Conditions on the Production of Lipase by *Acremonium strictum***. Biotechnol Lett 12(10):747-750.
- Perez, G.. 2003. Master Thesis. **Analysis of Enzymatic Alcoholisis Reaction with Vegetables Oils**.
- Plou, F. J., M. Ferrer, O. M. Nuero, M. V. Calvo, M. Alcalde, F. Reyes, A. Ballesteros. 1998. **Analysis of Tween 80 as An Esterase Lipase Substrate for Lipolytic Activity**. Biotechnol Tech 12:183-186.

- Pokorny, D., J. Friedrich, A. Cimerman. 1994. **Effect of Nutritional Factors on Lipase Biosynthesis by *Aspergillus niger***. *Biotechnol Lett* 16:363–6.
- Randall, J. M., R. N. Sayre, W. G. Schultz, R. Y. Fong, A. P. Mossman, R. E. Tribelhorn, R. M. Saunders. 1985. **Rice Bran Stabilization by Extrusion Cooking for Extraction of Edible Oil**. *Journal of Food Science* 50(2):361-364.
- Satyanarayana, T.. **Production of Bacterial Extracellular Enzymes by Solid-State Fermentation** dalam A. Pandey (Ed.). 1994. **Solid-State Fermentation**. Wiley Eastern Ltd., New Delhi, India pp. 122–129.
- Sharma, R., Y. Chisti, U. C. Banerjee. 2001. **Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases**. *Biotechnology Advances* 19:627–662.
- Slonczewski, J., J. W. Foster. 2011. **Microbiology: An Evolving Science**. New York: W.W. Norton.
- Srivastava, A., R. Prasad. 2000. **Triglycerides-based Diesel Fuels**. *Renew Sust Energy Rev* 4:111–33.
- Stanbury, P. F., A. Whitaker, S. J. Hall. 1995. **Principles of Fermentation Technology 2nd Edn**. Pergamon Press: Oxford.
- Stern, R., G. Hillion, P. Eur. 1990. *Appl EP* 356:317 [Cl.C07C67/56]
- Sugihara, A., T. Tani, Y. Tominaga. 1991. **Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp.**. *J Biochem* 109:211–6.
- Sztajer, H., U. Menge, R. D. Schmid. 1993. **Purification and Properties of A Lipase from *Penicillium expansum***. *Biochim Biophys Acta* 1168:181–9.
- Treichel, H., D. de Oliveira, M. A. Mazutti, M. Di Luccio, J. Vladimir Oliveira. 2010. **A Review on Microbial Lipases Production**. *Food Bioprocess Technol* 3:182-196.
- U.S. Department of Energy. 2006. **Biodiesel Handling and Use Guidelines**. DOE/GO-102006-2288.
- Wang, Y., K. C. Srivastava, G. J. Shen, H. Y. Wang. 1995. **Thermostable Alkaline Lipase from A Newly Isolated Thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841)**. *J Ferment Bioeng* 79:433–8.
- Zhang, Y., M. A. Dube', D. D. McLean, M. Kates. 2003. **Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: 1. Process Design And Technological Assessment**. *Bioresource Technol* 89:1–16.
- Zhao, L. L., X. X. Chen, J. H. Xu. 2009. **Strain Improvement of *Serratia marcescens* ECU1010 and Medium Cost Reduction for Economic Production Of Lipase**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(3):537-543.