

# Transesterifikasi Ester Asam Lemak Melalui Pemanfaatan Teknologi Lipase

## Application of lipase technology for transesterification of fatty acid ester

RINI HANDAYANI<sup>\*</sup>, JOKO SULISTYO

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16122.

Diterima: 26 Januari 2005. Disetujui: 1 April 2005.

### ABSTRACT

We have reported the potency of microbial extracellular enzyme for synthesis of fatty acid ester. Further investigation was aimed to study capacity of the enzyme on bioprocess of crude palm oil by transesterification of saturated fatty acid to fatty acid ester. We have studied some lipases from culture filtrate of *Candida rugosa* FM-9301, *Bacillus subtilis* FM-9101 and *Pseudomonas aerogenes* FM-9201, which were preincubated in a medium containing olive oil as inducers, using a shaker under conditions that allowed for lipase production at pH 4.5-6.5 and room temperature for 5 days. Those strains shown different activities during the hydrolysis of substrates, which resulted in decreasing or increasing free fatty acids those, were liberated from media containing crude palm oil and organic solvents. The optimal transesterification condition was at temperature of 45-50°C and at pH 4.5 for *C. rugosa* and pH 6.0 to 7.0 for *P. aerogenes* and *B. subtilis*. Under the enzyme concentration of 50% (v/v), the transesterification was rapidly occurred, while at the concentration of 20% (v/v) the enzymatically biosynthesis required longer incubation period. The substrates incubated with *C. rugosa* lipase exhibited higher linoleic and linolenic acid (7.16 and 2.15%, respectively), than that of *B. subtilis* lipase (4.85% and 1.43%, respectively), while *P. aerogenes* lipase (3.73% and 1.11%, respectively).

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** transesterification, lipase, crude palm oil, fatty acid ester.

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil kelapa dan kelapa sawit dunia dengan kontribusi tinggi sebagai komoditi ekspor. Saat ini, areal perkebunan kelapa sawit mengalami peningkatan cukup pesat. Seiring dengan meningkatnya luas areal, produksi minyak sawit mentah (CPO) juga terus meningkat (Latief, 1991). Minyak sawit telah banyak digunakan dalam industri pangan dan non pangan sebagai bahan baku industri farmasi, kosmetika, deterjen dan surfaktan (Ghosh dan Bhattacharyya, 1995; Tucker dan Woods, 1995). Asam lemak dan ester asam lemak berantai pendek juga bermanfaat sebagai senyawa aromatik penyedap rasa (Kosugi dan Azuma, 1994; Singh dkk., 1994). Metil dan etil ester asam lemak berantai panjang bermanfaat untuk produksi alkohol lemak serta bahan bakar pengganti untuk motor bermesin disel (Linko dkk., 1994). Asam lemak tidak jenuh berantai panjang, antara lain asam oleat, linoleat, linolenat dan arakhidonat (Ketaren, 1986), bahkan bermanfaat untuk pencegahan dan penyembuhan berbagai penyakit yang berkaitan dengan sistem peredaran darah antara lain trombosis dan aterosklerosis (Shirasaka dan Shimizu, 1995; Posorske, 1984).

Produksi ester alkohol berantai panjang dari asam lemak dengan cara esterifikasi dan alkoholisis oleh katalisator kimia sudah tidak diragukan lagi. Proses secara

kimiawi tersebut memiliki keterbatasan, antara lain asam-asam dari jenis yang lebih tidak jenuh akan mengalami polimerisasi atau perubahan-perubahan lain selama proses esterifikasi (Sil-Roy dan Bhattacharyya, 1993). Asam lemak dengan grup-grup fungsional seperti epoksi dan hidroksi sulit sekali untuk diesterifikasi tanpa merusaknya terlebih dahulu. Katalisis ester yang sulit dilakukan dengan metode kimiawi tersebut menjadi sederhana dengan pemanfaatan teknologi enzimatik lipase (Bailey, 1950; Sulistyoko dkk., 2000).

Pada penelitian ini enzim lipase digunakan sebagai biokatalisator pada reaksi hidrolisis dan transesterifikasi trigliserida dari minyak sawit mentah dan santan kelapa dengan alkohol atau pelarut organik lainnya untuk mensintesis produk transfer berupa ester asam lemak.

### BAHAN DAN METODE

#### Ekstraksi enzim lipase dari mikroba

Biakan mikroba penghasil enzim lipase terdiri dari *Bacillus subtilis* FM-9101, *Candida rugosa* FM-9301, dan *Pseudomonas aerogenes* FM-9201 ditumbuhkan secara terpisah. Media basal untuk memproduksi enzim mengandung pepton 0,5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, NaCl 0,05%, MgSO<sub>4</sub> 0,05%, FeSO<sub>4</sub> 0,001%, ZnSO<sub>4</sub> 0,0001%, CuSO<sub>4</sub> 0,0001%, MnSO<sub>4</sub> 0,0001%, ekstrak khamir 0,5% (Cowan, 1981; Sulistyoko dkk., 1999) dan masing-masing bahan penginduksi (minyak zaitun) sebanyak 2,0%, pada 10 mM bufer Na-fosfat pH 4,5-6,5. Media produksi digoyang pada suhu ruang selama 5 hari, kemudian disentrifugasi pada

#### ▼ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16122.

Tel.: +62-251-324006. Faks.: +62-251-325854

e-mail: handayanirini@yahoo.co.uk

kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada 4°C dan supernatan digunakan sebagai sumber enzim.

#### *Uji aktivitas enzimatis lipase*

Minyak zaitun sebanyak 1,0 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL, lalu ditambahkan berturut-turut 0,5 mL  $\text{CaCl}_2$  0,1 M dan 4,5 mL bufer asetat 0,1 M (pH 5,5). Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 40°C selama 10 menit, kemudian ditambahkan enzim lipase sebanyak 10% (v/v) dari masing-masing biakan dan diinkubasi kembali pada suhu 40°C dengan digoyang pada kecepatan 160 rpm selama 30 menit. Selanjutnya, campuran reaksi ditambah 20 mL etanol dan 3 tetes indikator fenolptalin serta dititrasi dengan NaOH 0,05 M sampai terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Satu unit aktivitas enzim lipase setara dengan 1  $\mu\text{mol}$  asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis substrat yang dikatalisis oleh enzim lipase selama 30 menit.

#### *Pengaruh pH dan suhu pada aktivitas enzimatis lipase*

Campuran reaksi (dalam erlenmeyer 100-mL) mengandung 1,0 mL minyak zaitun, 0,5 mL  $\text{CaCl}_2$  0,1 M dan 4,5 mL 0,1 M bufer asetat pada pH 4,0-8,0, diinkubasikan pada suhu 30-60°C dengan cara digoyang pada kecepatan 160 rpm selama 30 menit. Selanjutnya, aktivitas residu enzim lipolitiknya diuji sebagaimana cara pengujian aktivitas enzimatis tersebut di atas.

#### *Analisis asam lemak bebas (ALB)*

Kadar asam lemak bebas ditentukan dengan mengukur sebanyak 5,0 g sampel minyak dalam campuran alkohol-benzena (25: 25, v/v). Campuran larutan dititrasi dengan KOH-alkohol (0,1N) menggunakan indikator fenolptalin. Titrasi dilakukan sampai larutan berubah menjadi merah muda. Persentase ALB pada setiap sampel diperoleh dari hasil penghitungan volume larutan titrant terhadap bobot molekul minyak.

#### *Kromatografi gas (GC)*

Campuran reaksi dianalisis secara kuantitatif menggunakan kromatografi gas (GC) dengan menimbang sebanyak 0,02-0,05 g sampel dan dilarutkan dengan 2,0 mL NaOH dalam metanol 0,5 M, kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 20 menit. Setelah penambahan larutan  $\text{BF}_3$  dalam metanol sebanyak 2,0 mL, sampel dipanaskan kembali pada suhu 80°C selama 20 menit dan selanjutnya ditambahkan NaCl jenuh dan heksan, masing-masing sebanyak 2,0 mL. Sampel (2,0  $\mu\text{l}$ ) dimasukkan dalam kolom silikagel GC. GC dijalankan dengan pelarut  $\text{H}_2$  (g) dan  $\text{N}_2$  (g) pada suhu awal 150°C dan suhu injektor 200°C. Deteksi sampel diukur dengan FID pada suhu 250°C.

#### *Reaksi hidrolisis enzimatis*

Substrat (50 g minyak asam) ditempatkan dalam gelas erlenmeyer 100 mL diinkubasikan dengan 25% (v/v) larutan enzim lipase dalam buffer pada suhu 50°C dan digoyang pada 100 rpm diatas shaker selama 24 jam. Reaksi hidrolisis yang terjadi diestimasi dengan pengukuran kandungan asam lemak bebas (ALB) pada setiap sampel yang dianalisis. Emulsi lemak dihancurkan dengan cara pemanasan pada suhu 80°C dan lapisan lemak yang mengandung enzim dan gliserol dipisahkan dengan cara sentrifugasi. ALB sebagai produk hidrolisis yang terkandung dalam lapisan lemak selanjutnya dianalisis.

#### *Reaksi transesterifikasi ester asam lemak*

Substrat CPO dan pelarut alkohol (etanol, metanol, propanol, butanol konsentrasi 10-25%) atau buffer sebagai kontrol dalam gelas erlenmeyer 100-mL diinkubasi dengan 25% larutan enzim lipase dari beberapa biakan mikroba (*B. subtilis*, *C. rugosa* dan *P. aerogenes*) dengan cara dikocok menggunakan pengocok magnetis pada suhu 50°C selama 24 jam. Campuran produk (masing-masing sebanyak 2,0 mL) disaring untuk memisahkannya dari kotoran yang tidak terlarut. Hasil reaksi dianalisis secara kualitatif menggunakan kromatografi lapis tipis (TLC; *thin layer chromatography*) dan secara kuantitatif menggunakan GC.

**TLC.** Sampel diencerkan dengan etanol dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 0,01 mL sampel encer digunakan untuk analisis TLC. Untuk mengetahui spot produk yang terkromatografi, plat TLC dikembangkan dalam larutan heksan:dietil eter:asam asetat (80:20:1) selama satu jam. Setelah dikeringkan, plat TLC disemprot dengan 0,1% 2',7'-diklorofluoresin dalam 99,5% etanol dan selanjutnya diamati pada panjang gelombang 254 dan 360 nm.

**GC.** Sampel (2,0  $\mu\text{L}$ ) dimasukkan dalam kolom silikagel GC. GC dijalankan dengan pelarut  $\text{H}_2$  (g) dan  $\text{N}_2$  (g) pada suhu awal 150°C dan suhu injektor 200°C. Deteksi cuplikan diukur dilakukan dengan FID pada suhu 250°C.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

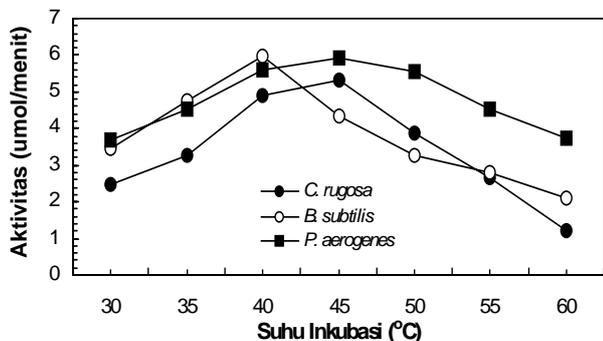
Isolat yang dipilih untuk pengujian aktivitas lipolitik adalah bakteri yang diisolasi dari sampel limbah mengandung minyak. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dari beberapa isolat yang telah diidentifikasi, tiga biakan penghasil enzim lipase yaitu *C. rugosa*, *B. subtilis* dan *P. aerogenes* menunjukkan aktivitas lipolitik secara signifikan, masing-masing sebesar 32,10 U/mL, 37,05 U/mL dan 36,08 U/mL, setelah ketiga biakan tersebut diprakulturkan pada substrat mengandung minyak zaitun 2% dan pada suhu ruang (Sulistyo dkk., 2001).

Hasil uji pengaruh pH dan suhu pada perumbuhan enzim lipase dari berbagai sumber biakan menunjukkan bahwa pH dan suhu optimal untuk aktivitas enzim lipase dari *C. Rugosa*, *B. subtilis* dan *P. aerogenes* masing-masing adalah pada pH 4,5 (5,14  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) dan suhu 45°C (5,33  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ), pada pH 7,0 (masing-masing 5,81  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dan 5,85  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ), dan pada suhu 40°C dan 45°C (masing-masing 5,98  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dan 5,92  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) (Gambar 1 dan 2).

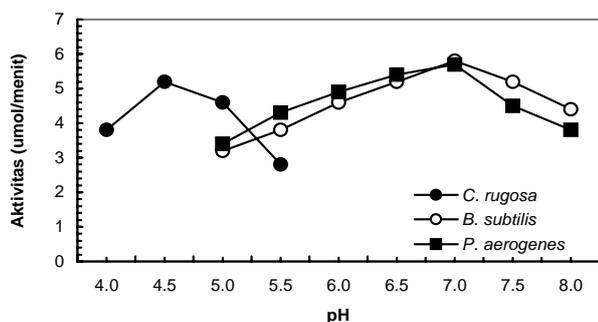
Tabel 1 menunjukkan hasil uji kualitatif perubahan pada substrat CPO setelah terjadi reaksi enzimatis menggunakan beberapa biakan penghasil enzim lipase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sumber enzim lipase berpengaruh pada proses transesterifikasi, meskipun pada konsentrasi 10-25% pengaruh enzim tidak signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim lipase dari biakan tertentu dapat bekerja secara efektif dan efisien sebagai biokatalisator pada proses transesterifikasi (Herawan dan Eka, 1996), karena kondisi media bagi aktivitas enzimatis menjadi optimal, sehingga terjadi proses penguraian trigliserida yang diikuti pembentukan asam lemak yang diperlukan untuk sintesis ester asam lemak.

Terjadinya reaksi transesterifikasi dapat dianalisis berdasarkan perbandingan jumlah gugus hidroksil pada substrat sebelum dan sesudah reaksi enzimatis. Tabel 1 menunjukkan hasil bahwa enzim lipase berpengaruh terhadap penurunan kadar asam lemak bebas (ALB) pada substrat CPO. Pada reaksi hidrolisis, penambahan enzim

lipase dari *C. rugosa* dapat menurunkan kadar ALB sebanyak 25%., sedangkan penambahan enzim lipase dari *B. subtilis* dan *P. aerogenes* hanya menurunkan kadar ALB sekitar 6-7%. Akan tetapi dengan penambahan santan kelapa atau butanol sebagai pelarut organik, penurunan kadar ALB substrat mencapai 29-30%, bahkan hingga 34% pada substrat dengan penambahan butanol yang direaksikan dengan enzim lipase dari *C. rugosa*.



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase dari beberapa biakan mikroba.



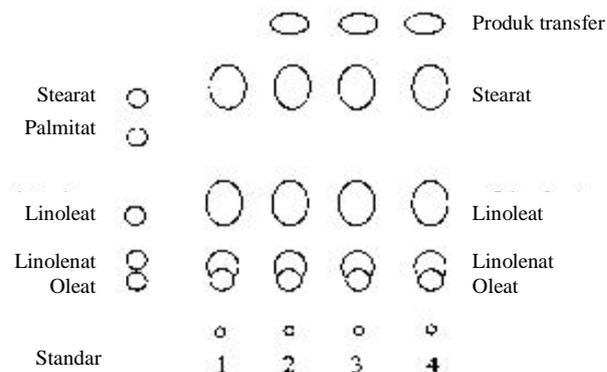
Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim lipase dari beberapa biakan mikroba.

Tabel 1. Pengaruh sumber enzim lipase pada perubahan kadar ALB minyak sawit.

Substrat	Sumber enzim	Kadar enzim	Kadar ALB (%)
Kontrol	-	0%	8,09
CPO + Bufer	<i>C. rugosa</i>	10%	6,33
CPO + Bufer	<i>C. rugosa</i>	25%	6,06
CPO + Santan	<i>C. rugosa</i>	10%	5,21
CPO + Santan	<i>C. rugosa</i>	25%	5,57
CPO + Butanol	<i>C. rugosa</i>	10%	5,30
CPO + Butanol	<i>C. rugosa</i>	25%	5,72
CPO + Bufer	<i>B. subtilis</i>	10%	7,67
CPO + Bufer	<i>B. subtilis</i>	25%	7,50
CPO + Santan	<i>B. subtilis</i>	10%	5,75
CPO + Santan	<i>B. subtilis</i>	25%	5,59
CPO + Butanol	<i>B. subtilis</i>	10%	5,59
CPO + Butanol	<i>B. subtilis</i>	25%	5,65
CPO + Bufer	<i>P. aerogenes</i>	10%	7,61
CPO + Bufer	<i>P. aerogenes</i>	25%	7,57
CPO + Santan	<i>P. aerogenes</i>	10%	6,40
CPO + Santan	<i>P. aerogenes</i>	25%	6,75
CPO + Butanol	<i>P. aerogenes</i>	10%	5,75
CPO + Butanol	<i>P. aerogenes</i>	25%	6,74

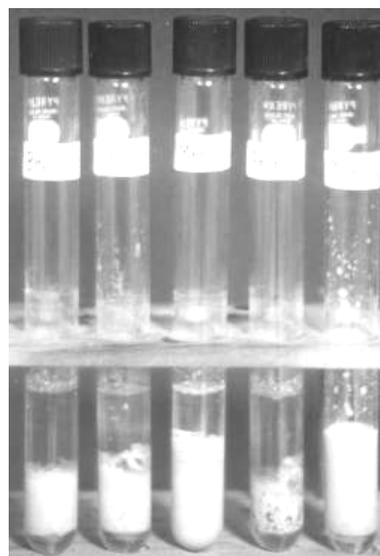
Gambar 3 menunjukkan kromatogram TLC hasil reaksi substrat CPO setelah penambahan butanol 10% dan dinkubasi menggunakan enzim lipase dari *C. rugosa* selama 48 jam. Secara kualitatif terjadinya reaksi

transglukosilasi dapat ditandai dengan adanya pembentukan spot-spot sebagai produk transfer (PT) yang terdeteksi pada kromatogram hasil analisis TLC. Ester asam lemak yang memiliki polaritas lebih tinggi, memiliki spot kromatogram dengan nilai-Rf yang lebih tinggi (0,82) dibanding nilai-Rf produk asam lemak bebas hasil hidrolisis trigliserida pada CPO antara lain stearat (Rf 0,59), palmitat (Rf 0,46), linoleat (Rf 0,25), linolenat (Rf 0,09) dan oleat (Rf 0,04).



Gambar 3. Kromatogram TLC hasil reaksi enzimatis lipase pada substrat CPO dan butanol. Keterangan: 1. Kontrol, 2. *C. rugosa*, 3. *B. subtilis*, 4. *P. aerogenes*.

Gambar 4 menunjukkan kondisi campuran reaksi mengandung substrat CPO setelah penambahan pelarut alkohol (metanol, etanol, butanol dan propanol) 10-25%, dinkubasi dengan enzim lipase dari *C. rugosa* selama 48 jam. Secara kualitatif terjadinya reaksi transesterifikasi ditunjukkan dengan adanya pembentukan ester asam lemak yang memiliki polaritas dan solubilitas lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (buffer) yang tidak diberi penambahan pelarut alkohol (Saifuddin dan Chua, 2004). Campuran reaksi menunjukkan terjadinya perubahan sifat kelarutan yang lebih baik, ditandai dengan tingginya kadar asam lemak tidak jenuh dari golongan oleat, linoleat dan linolenat (Tabel 2) sebagai produk asam lemak bebas hasil hidrolisis trigliserida secara enzimatis pada CPO.



Gambar 4. Campuran reaksi mengandung substrat CPO dan beberapa pelarut alkohol sebagai akseptor reaksi transesterifikasi dengan enzim lipase dari biakan *C. rugosa*.

Tabel 2. Analisis kandungan asam lemak minyak nabati.

Substrat	Sumber enzim	Asam lemak jenuh (%)			Asam lemak tak jenuh (%)		
		Laurat	Palmitat	Stearat	Oleat	Linoleat	Linolenat
CPO + Bufer	Kontrol	0,3984	0,3848	4,8587	0,9452	5,5588	1,5128
CPO + Bufer	<i>C. rugosa</i>	0,0380	0,1700	5,0421	0,6876	0,4305	1,3525
CPO + Santan	<i>C. rugosa</i>	0,5522	0,2620	2,4151	0,3698	2,1069	0,6351
CPO + Butanol	<i>C. rugosa</i>	0,0507	0,2112	7,4600	1,1282	7,1596	2,1467
CPO + Butanol	<i>C. rugosa</i>	0,0119	0,1130	4,5486	0,8613	4,3726	1,3961
CPO + Butanol CPO + Butanol	<i>B. subtilis</i>	0,0150	0,1470	5,9049	0,8303	4,8465	1,4279
	<i>P. aerogenes</i>	0,0113	0,1207	4,5793	0,6374	3,7342	1,1143

Hasil analisis kromatografi gas pada substrat CPO yang telah direaksikan dengan butanol dan enzim lipase dari *C. rugosa*, menunjukkan bahwa komposisi kandungan asam lemak tidak jenuh yang merupakan asam lemak esensial, terbentuk lebih tinggi dibanding kandungan asam lemak jenuh. Hasil tersebut memberi indikasi bahwa komposisi asam lemak bebas pada substrat CPO sebelum dan sesudah mengalami reaksi transesterifikasi, mengalami perubahan yang nyata. Reaksi transesterifikasi menggunakan butanol dengan enzim lipase dari *C. rugosa* dapat meningkatkan kandungan asam lemak tak jenuh yaitu asam oleat, linoleat dan linolenat, masing-masing sebesar 19%, 29% dan 42%, serta menurunkan asam lemak jenuh, yaitu laurat dan palmitat masing-masing sebesar 87% dan 45%, akan tetapi sebaliknya kandungan asam lemak jenuh stearat juga meningkat sebesar 53%.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak seluruh komponen asam lemak tidak jenuh dapat ditingkatkan mengikuti penurunan kandungan sebagian asam lemak jenuh. Sebaliknya Reaksi enzimatis menggunakan butanol dengan enzim lipase dari *B. subtilis* dan *P. aerogenes* tidak dapat meningkatkan kandungan asam lemak tak jenuh yang terdiri dari asam oleat, linoleat dan linolenat, meskipun dapat menurunkan asam lemak jenuh, khususnya asam laurat dan palmitat, masing-masing sebesar 96% dan 62% (*B. subtilis*) serta 97% dan 69% (*P. aerogenes*). Peningkatan kandungan asam stearat juga terjadi meskipun tidak terlalu besar.

Hasil tersebut mengindikasikan bahwa sumber enzim berpengaruh terhadap peningkatan atau penurunan kandungan asam lemak bebas secara cukup signifikan pada ketersediaan akseptor butanol. Perubahan komposisi dan kandungan asam lemak bebas yang terdapat pada substrat CPO belum optimal, sehingga masih dapat ditingkatkan lagi mengingat tingginya kandungan asam palmitat pada CPO (40-46%) belum sepenuhnya dapat dimanfaatkan dengan baik. Untuk meningkatkan reaksi transesterifikasi secara lebih efektif dan efisien, diperlukan optimasi perihal sumber enzim dari berbagai sumber biakan mikroba, khususnya dari golongan termofilik dan alkalotoleran, serta kondisi optimum inkubasi maupun jenis pelarut organiknya, agar seluruh kandungan asam lemak jenuh yang terdapat dalam substrat dapat ditransferkan menjadi ester asam lemak secara optimal (Winarno, 1987). Indikasi tersebut didasarkan pada asumsi apabila efektivitas enzim pada reaksi transesterifikasi menjadi sangat tinggi, maka kandungan asam lemak tidak jenuh akan meningkat, sehingga minyak akan tetap cair pada suhu ruang dan fungsinya sebagai bahan berminyak dapat dimanfaatkan secara optimal, antara lain sebagai senyawa aromatik penyedap rasa, untuk produksi alkohol lemak atau untuk pemanfaatan sebagai produk farmaka yang berfungsi untuk pencegahan dan penyembuhan penyakit yang berkaitan dengan sistem peredaran darah, antara lain trombosis dan arteriosklerosis.

## KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa asam lemak pada minyak sawit mentah (CPO) dan minyak kelapa, dapat direaksikan secara transesterifikasi menggunakan enzim lipase yang diekstraksi dari biakan mikroba, antara lain *C. rugosa*, *B. subtilis* dan *P. aerogenes* menjadi ester asam lemak, pada ketersediaan butanol sebagai pelarut organik. Selain itu, reaksi transesterifikasi dengan enzim lipase dari *C. rugosa* juga menyebabkan terjadinya perubahan pada kandungan asam lemak bebas. Perubahan cukup signifikan yang ditunjukkan oleh adanya penurunan beberapa komponen asam lemak jenuh, diikuti dengan peningkatan beberapa komponen asam lemak tidak jenuh sebagai asam lemak esensial, memberikan indikasi yang prospektif perihal pemanfaatan enzim lipase dari biakan mikroba.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, A.E. 1950. *Industrial Oil and Fat Product*. New York: Pinterscholastic Publishing Inc.
- Cowan, S.T. 1981. *Manual for Identification of Medical Bacteria*. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ghosh, S. and D.K. Bhattacharyya. 1995. Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. *Journal of American Oil Chemistry Society* 72 (12): 1541-1544.
- Herawan, T. dan N. Eka. 1996. Hidrolisis minyak sawit menggunakan lipozyme dari *Mucor miehei*. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit* 4(2): 91-98.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Kosugi, Y. and N. Azuma. 1994. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. *Journal of American Oil Chemistry Society* 71 (12): 1397-1403.
- Latief, S. 1991. Analisis komposisi asam lemak minyak sawit yang dipercepat. *Berita Penelitian Perkebunan* 1 (1): 21-26.
- Linko, Y.Y., M. Lämsä, A. Huhtala, and P. Linko. 1994. Lipase catalyzed transesterification of rapeseed oil and 2-ethyl-1-hexanol. *Journal of American Oil Chemistry Society* 71 (12): 1411-1414.
- Posorske, L.H. 1984. Industrial scale application of enzyme to the fats and oil industry. *Journal American Oil Chemistry Society* 61 (11): 1758-1760.
- Saifuddin, N. and K.H. Chua. 2004. Production of ethyl ester (biodisel) from used frying oil: optimization of transesterification process using microwave irradiation. *Malaysian Journal of Chemistry* 6 (1): 077-082.
- Shirasaka, N. and S. Shimizu. 1995. Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1. *Journal of American Oil Chemistry Society* 72 (12): 1545-1549.
- Sil-Roy, S. and D.K. Battacharyya. 1993. Distinction between enzymically and chemically catalyzed interesterification. *Journal of American Oil Chemistry Society* 70 (12): 1293-1294.
- Singh, C.P., P. Skagerlind, K. Holmberg, and D.O. Shah. 1994. A comparison between lipase-catalyzed esterification of oleic acid with glycerol in monolayer and microemulsion systems. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 71 (12): 1405-1409.
- Sulistyo, J., Y.S. Soeka, E. Triana, and R.N.R. Napitupulu. 1999. Bioprocessing of fermented coconut oil by application of enzymatic technology. *Berita Biologi* 4 (5): 273-279
- Sulistyo, J., Y.S. Soeka, and R. Handayani. 2000. Bioprocessing of fatty acid esters by application of enzymatic technology. *Prosiding Seminar TTG. UNPAD-BP-TTG-LIPI*. November 2000.
- Sulistyo, J., Y.S. Soeka, dan R. Handayani. 2001. Transesterifikasi enzimatis asam lemak dari substrat minyak sawit dan santan kelapa. *Berkala Penelitian Hayati* 7 (1): 19-23.
- Tucker G.A. and L.F.J. Woods. 1995. *Enzyme in Food Processing*. 2nd edition. London: Blacckie Academic & Professional.
- Winarno, F.G. 1987. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.