

Vol 9, No 1

April 2004

DOI: <https://doi.org/10.21831/jps.v9i1>

TABLE OF CONTENTS



Vol 9, No 1

April 2004

DOI: <https://doi.org/10.21831/jps.v9i1>

Table of Contents

Articles

DESIGN OF WORK EQUIPMENT SYSTEM AND STEAM SYSTEM WITH HYDRAULIC SYSTEM

PDF

Heri Wibowo, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia

 [10.21831/jps.v9i1.5286](https://doi.org/10.21831/jps.v9i1.5286)

ESTIMATION OF AGRICULTURE SAVE GARUT CHIPS WITH ACCELERATED TEST METHOD

PDF

Ichda Chayati, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia

 [10.21831/jps.v9i1.5474](https://doi.org/10.21831/jps.v9i1.5474)

EFFECT OF ALGINAT CONCENTRATION VARIATION AND LIPASE CONCENTRATION TO HYDROLYSIS ACTIVITY AND SPECIFIC ACTIVITY OF AMPILE LIPASE IN LIPASE AMOBILIZATION PROCESS FROM *Rhizopus delemar*

PDF

Nani Ratnaningsih, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia

 [10.21831/jps.v9i1.5549](https://doi.org/10.21831/jps.v9i1.5549)

EFFECT OF MALELO SANDAL SALT WITH HN03 TO THE EFFICIENCY OF CRYSTAL IMPLEMENTATION

PDF

Siti Sulastri, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia
Susila Kristianingrum, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia
Retno Arianingrum, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia

 [10.21831/jps.v9i1.5553](https://doi.org/10.21831/jps.v9i1.5553)

PENGARUH VARIASI KONSENTRASI ALGINAT DAN KONSENTRASI LIPASE TERHADAP AKTIVITAS HIDROLISIS DAN AKTIVITAS SPESIFIK LIPASE AMOBIL PADA PROSES AMOBILISASI LIPASE DARI *Rhizopus delemar*

Oleh:

Nani Ratnaningsih

Staf Pengajar FT UNY

Abstract

Effect of lipase from Rhizopus delemar and alginate concentration during immobilization preparation on the hydrolytic activity and the specific activity of immobilized lipase has been studied. Immobilization of lipase was done by entrapping lipase onto Ca-alginate beads with 0,2 M CaCl₂. Immobilized lipase made from 9 variations by mixing lipase at same weight with 1 %, 2 % and 3 % (w/v) alginate solution concentration and 10 ml, 20 ml and 30 ml alginate volume. The stability of immobilized lipase activity for repeated used reactions were also observed. The selected immobilized lipase from first step was freeze dried for 24, 36 and 48 hours. Both the hydrolytic activity and the specific activity of immobilized lipase were affected by lipase and alginate concentration. The hydrolytic activity of immobilized lipase decreased with the reduction of lipase concentration, however, the specific activity increased accordingly. After freeze drying, the activity of immobilized lipase was also affected by alginate and lipase concentration. The activity of immobilized lipases were stabil, however, increased, after freeze drying.

Key words : immobilization, immobilized lipase, Ca-alginate

PENDAHULUAN

Penggunaan enzim sebagai biokatalis sudah lama dikenal, baik berupa enzim bebas maupun enzim amobil. Enzim amobil yang dikembangkan sejak tahun 1953 oleh Grubhofer dan Schleith (Chibata, 1978), telah secara luas digunakan pada industri farmasi, industri pangan, dan industri kimia lainnya. Bila dibandingkan

dengan enzim bebas, enzim amobil akan memberikan banyak keuntungan bagi industri, misalnya pemisahan enzim dan produk lebih mudah, dapat digunakan berkali-kali dan kebutuhan energi lebih rendah.

Amobilisasi enzim adalah suatu cara atau teknik untuk menghasilkan enzim yang tidak larut atau tetap larut dalam air dan mudah dipisahkan dari substrat. Kennedy (1995) menyatakan bahwa enzim amobil terdiri dari: a) enzim yang dimodifikasi menjadi enzim yang tidak larut air dengan teknik yang sesuai; b) enzim yang larut dan digunakan dalam reaktor yang dilengkapi dengan membran semipermeabel sehingga produk reaksi dari hidrolisis substrat dengan berat molekul tinggi dapat lolos tetapi enzim tetap tertahan dalam reaktor; dan c) enzim yang mobilitasnya dihambat dengan menggunakan senyawa makromolekul namun tetap larut air.

Metode amobilisasi enzim yang paling sering digunakan adalah metode pemerangkapan (*entrapment*). Metode pemerangkapan berdasar atas lokalisasi enzim dalam kisi-kisi matriks suatu polimer atau membran yang mencegah lepasnya molekul protein namun masih memungkinkan penetrasi substrat. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan polimer baik sintesis maupun alami. Polimer sintesis yang sering digunakan

adalah polivinil alkohol dan poliakrilamid, sedangkan polimer alami yang sering digunakan adalah protein (kolagen, gelatin) dan polisakarida (κ -karagenan, kalsium alginat, agar, agarosa, chitosan dan gellan gum).

Keberhasilan metode pemerangkapan enzim dapat diketahui dari distribusi enzim dalam matriks polimer, interaksi enzim amobil dengan substrat dan perubahan aktivitas enzim. Distribusi enzim dalam matriks polimer dapat diatur dengan pencampuran enzim dan matriks polimer pada rasio tertentu, sedangkan kontak antara enzim dan substrat dapat ditingkatkan dengan mengatur ukuran pori gel. Ukuran pori gel dapat diatur dengan konsentrasi matriks polimer. Konsentrasi matriks polimer yang semakin tinggi akan menghasilkan gel yang semakin padat (rigid) sehingga ukuran pori-pori gel semakin kecil. Pori-pori gel yang semakin kecil mengakibatkan kontak antara enzim dengan substrat akan semakin sulit. Pada rasio enzim : matriks polimer yang semakin tinggi akan diperoleh gel yang lebih banyak sehingga distribusi enzim dalam matriks polimer semakin baik. Selanjutnya kontak antara substrat dengan enzim akan semakin luas karena setiap gel mengandung enzim yang semakin sedikit.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh konsentrasi lipase dan konsentrasi alginat dalam manik-manik

lipase amobil pada proses amobilisasi lipase (pemerangkapan lipase dan *freeze drying*) terhadap aktivitas hidrolisis lipase amobil dan aktivitas spesifik lipase amobil.

METODE PENELITIAN

Bahan-bahan dalam proses amobilisasi enzim adalah enzim lipase bebas dengan merk Lipase 'D' dari *Rhizopus delemar* (Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Jepang) dengan aktivitas hidrolisis 120.000 U/g enzim (pH 6,0), Na-alginat (Wako Chemical, Jepang) dan larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (Merck). Alat utama yang digunakan adalah alat-alat gelas, *water-bath shaker* (Haake SWB 20), *freeze dryer*, sentrifus (MLW T 51.1), spektrofotometer (Shimadzu UV-1201 V), dan pengaduk magnetis (Ikamag RCT).

Teknik amobilisasi lipase dengan Na-alginat dilakukan dengan membuat larutan lipase dengan berat 80 mg dan dicampur dengan larutan Na-alginat sehingga diperoleh konsentrasi alginat 1 %, 2 % dan 3 % (b/v). Selanjutnya campuran diteteskan dengan *syring* pada larutan CaCl_2 0,2 M yang diaduk dengan pengaduk magnetik. Manik-manik Ca-alginat yang terbentuk dibiarkan dalam larutan CaCl_2 0,2 M selama 30 menit untuk memperkeras bead

(Morris *et al.*, 1992) kemudian manik-manik dipisahkan dari larutan CaCl_2 .

Untuk mengetahui konsentrasi enzim dan konsentrasi Na-alginat yang menghasilkan lipase amobil dengan aktivitas optimum digunakan larutan Na-alginat 1 %, 2 %, dan 3 % dengan volume 10, 20, dan 30 ml yang masing-masing dicampurkan pada berat lipase yang sama (80 mg). Dari perlakuan tersebut akan diperoleh lipase amobil dengan aktivitas optimum. Selanjutnya lipase amobil yang terpilih dari tahap pertama diliofilisasi dengan *freeze dryer* selama 24, 36 dan 48 jam pada tekanan di bawah 1 Torr dan suhu -40°C . Tahap ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan aktivitas hidrolisis lipase amobil terhadap proses *freeze drying*.

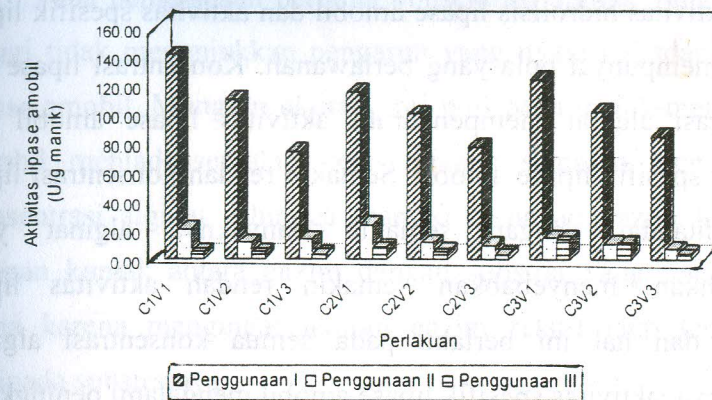
Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah aktivitas hidrolisis enzim pada lipase bebas, lipase amobil, larutan sisa amobilisasi (larutan CaCl_2 0,2 M), dan lipase amobil setelah *freeze drying*. Untuk mengamati kestabilan aktivitas lipase amobil dari 9 variasi tersebut dilakukan uji aktivitas lipase amobil secara berulang sebanyak 3 kali dengan menggunakan manik-manik yang sama. Pengujian aktivitas hidrolisis secara berulang hanya dilakukan 3 kali dengan pertimbangan bahwa secara visual manik-manik lipase amobil dari konsentrasi alginat 1 % sudah mengalami kebocoran pada uji ketiga. Sebelum digunakan kembali, manik-manik dicuci dengan aquades sebanyak dua kali. Selain itu juga

dilakukan uji aktivitas lipase bebas pada larutan CaCl_2 untuk mengetahui pengaruh larutan CaCl_2 terhadap aktivitas lipase bebas, kadar protein terlarut pada lipase bebas dan larutan sisa amobilisasi, serta kadar air lipase amobil setelah *freeze drying*. Uji aktivitas hidrolisis lipase dilakukan dengan metode Marseno *et al.* (1998), kadar protein terlarut dengan metode Peterson (1977), dan kadar air dengan metode Sudarmadji *et al.* (1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses amobilisasi lipase dengan Ca-alginat menghasilkan manik-manik dengan diameter rata-rata 3 mm. Aktivitas hidrolisis lipase bebas sebesar 103.133,27 U/g enzim dengan aktivitas spesifik sebesar 57.455,86 U/mg protein. Penggunaan larutan CaCl_2 sebagai pengeras manik-manik Ca-alginat ternyata menurunkan aktivitas hidrolisis lipase bebas sebesar 15 % dari aktivitas lipase yang diuji dengan buffer K-fosfat, disebabkan karena ion Ca^{2+} menghambat reaksi hidrolisis.

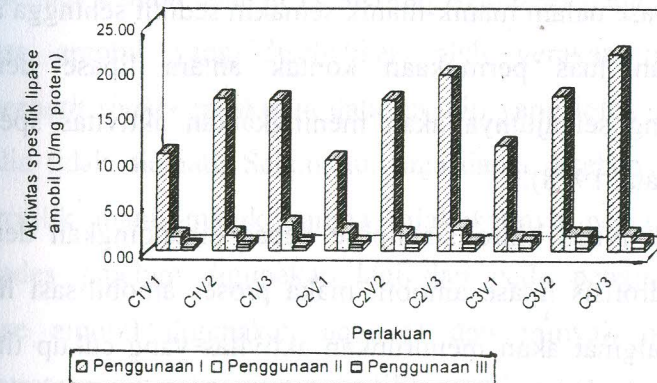
Aktivitas hidrolisis lipase amobil dan aktivitas spesifik lipase amobil pada penggunaan berulang sebanyak 3 kali untuk menentukan konsentrasi alginat dan konsentrasi lipase yang masih mempunyai aktivitas tinggi dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Aktivitas hidrolisis lipase amobil dengan variasi konsentrasi alginat dan konsentrasi lipase pada penggunaan berulang.

Keterangan:

C = konsentrasi alginat 1 %, 2 %, 3 %; V = volume alginat 10 ml, 20 ml, 30 ml



Gambar 2. Aktivitas spesifik lipase amobil dengan variasi konsentrasi alginat dan konsentrasi lipase pada penggunaan berulang.

Keterangan:

C = konsentrasi alginat 1 %, 2 %, 3 %; V = volume alginat 10 ml, 20 ml, 30 ml

Aktivitas hidrolisis lipase amobil dan aktivitas spesifik lipase amobil mempunyai pola yang berlawanan. Konsentrasi lipase dan konsentrasi alginat mempengaruhi aktivitas lipase amobil dan aktivitas spesifik lipase amobil. Semakin rendah konsentrasi lipase yang ditandai dengan semakin banyaknya alginat yang ditambahkan, menyebabkan semakin rendah aktivitas lipase amobil, dan hal ini berlaku pada semua konsentrasi alginat. Sebaliknya, aktivitas spesifik lipase amobil mengalami peningkatan dengan semakin rendahnya konsentrasi lipase. Fenomena ini sejalan dengan teori karena dengan semakin rendahnya konsentrasi lipase yang ditandai dengan semakin banyaknya volume alginat, akan diperoleh manik-manik dalam jumlah yang lebih banyak dan distribusi lipase dalam manik-manik semakin sedikit sehingga akan meningkatkan luas permukaan kontak antara lipase dengan substrat, yang selanjutnya akan meningkatkan aktivitas spesifik lipase (Chibata, 1978).

Bila aktivitas hidrolisis lipase bebas dibandingkan dengan aktivitas hidrolisis lipase amobil, maka proses amobilisasi lipase dengan Ca-alginat akan menurunkan aktivitas yang cukup tinggi. Hal ini disebabkan oleh penggunaan matriks Ca-alginat yang bersifat hidrofilik, yang menimbulkan penurunan kemampuan substrat hidrofobik untuk mencapai sisi aktif lipase dan sedikitnya lipase yang dapat diamobilkan (Malcata *et al.*, 1990).

Pada penggunaan pertama konsentrasi alginat yang semakin tinggi tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas lipase amobil. Mungkin ukuran pori-pori pada manik-manik lipase amobil menjadi semakin kecil dengan semakin meningkatnya konsentrasi alginat sehingga mampu menahan enzim lebih baik dengan kontak antara enzim dengan substrat yang relatif masih sama karena mengingat ukuran enzim relatif jauh lebih besar daripada substratnya.

Aktivitas spesifik lipase amobil pada penggunaan berulang (Gambar 2) mengalami penurunan yang sangat tajam dari penggunaan pertama ke penggunaan kedua, sedangkan pada penggunaan ketiga penurunannya tidak terlalu tajam. Kemungkinan ini terjadi karena adanya kebocoran (*leakage*) pada manik-manik lipase amobil yang disebabkan oleh gerakan mekanis dari *waterbath shaker* meskipun data protein yang lolos dan keluar ke media tidak diamati. Selain itu, juga dapat disebabkan oleh sifat hidrofilik manik-manik karena dilakukannya pencucian dengan aquades sebelum digunakan lagi dan pada pengujian aktivitas lipase amobil digunakan aquades dan minyak olive sebagai substratnya. Interaksi sifat hidrofilik manik-manik dengan aquades menyebabkan lipase pada permukaan manik-manik akan hilang karena pencucian. Selain itu konsentrasi lipase yang terlalu tinggi dalam manik-manik juga menyebabkan lipase yang sudah

terperangkap akan mudah keluar dari manik-manik selama pencucian dan pengujian. Namun pada penggunaan kedua dan ketiga, penurunan aktivitas lipase amobil tidak terlalu tajam. Ini disebabkan oleh sedikitnya lipase yang lolos dari manik-manik selama pencucian dan pengujian daripada penggunaan pertama. Aktivitas lipase amobil pada penggunaan ketiga ini diduga merupakan aktivitas lipase yang benar-benar mencerminkan lipase yang terperangkap dalam manik-manik Ca-alginat.

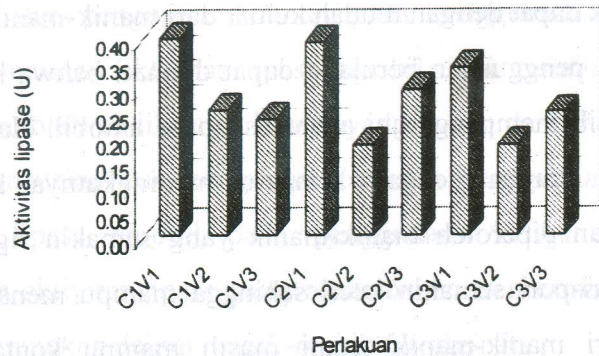
Quiros *et al.* (1995) mengamati kebocoran pada sel *Serratia marcescens* yang diamobilkan dengan alginat, akan semakin banyak dan semakin luas dengan semakin lama inkubasi dan diperparah dengan kurangnya ion Ca^{2+} pada media. Selain itu juga diamati bahwa hilangnya stabilitas manik-manik yang ditandai dengan kebocoran manik-manik disebabkan karena interaksi fisikokimia manik-manik dengan substrat/medium atau konsentrasi sel yang tinggi dalam manik-manik.

Kebocoran manik-manik lipase amobil semakin banyak pada konsentrasi alginat yang lebih rendah. Pada konsentrasi alginat yang lebih rendah diperoleh manik-manik dengan ukuran pori-pori yang lebih besar dan kurang rigid sehingga lipase yang sudah terperangkap dalam gel Ca-alginat akan lebih mudah keluar dari manik-manik apalagi bila terjadi kebocoran manik-manik. Sedangkan pada konsentrasi alginat yang semakin tinggi diperoleh

manik-manik dengan ukuran pori-pori yang lebih kecil sehingga lipase tidak dapat dengan mudah keluar dari manik-manik.

Pada penggunaan berulang dapat diamati bahwa konsentrasi alginat lebih mempengaruhi aktivitas lipase amobil. Hal ini dapat dimengerti karena dengan semakin meningkatnya konsentrasi alginat akan diperoleh manik-manik yang semakin rigid dengan ukuran pori-pori semakin kecil sehingga mampu menahan lipase keluar dari manik-manik tetapi masih mampu kontak dengan substrat. Pada penggunaan ketiga, konsentrasi alginat 1 % dengan volume alginat 30 ml menghasilkan manik-manik yang paling tidak rigid dan aktivitas lipase terendah. Sedangkan manik-manik dari konsentrasi alginat 2 % dengan volume alginat 10 ml, konsentrasi 3 % dengan volume alginat 10 ml dan 20 ml, menghasilkan manik-manik dengan aktivitas lipase yang relatif lebih tinggi.

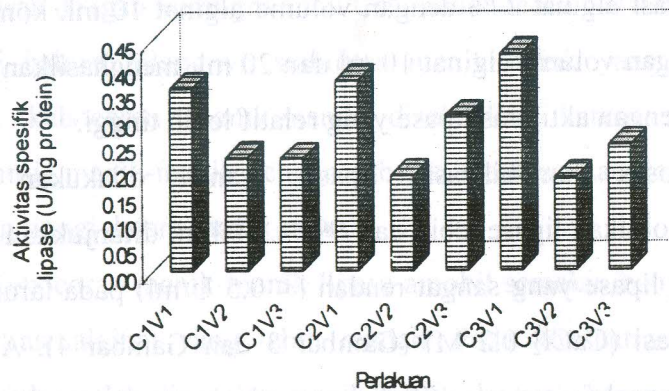
Proses amobilisasi lipase yang dilakukan dapat mengamobilkan lipase lebih dari 99 %. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas lipase yang sangat rendah (< 0.5 U/ml) pada larutan sisa amobilisasi ($CaCl_2$ 0.2 M) (Gambar 3 dan Gambar 4). Aktivitas lipase dan aktivitas spesifik lipase pada larutan sisa amobilisasi mempunyai pola yang serupa.



Gambar 3. Aktivitas lipase pada larutan sisa amobilisasi (CaCl₂ 0,2 M)

Keterangan:

C = konsentrasi alginat 1 %, 2 %, 3 %; V = volume alginat 10 ml, 20 ml, 30 ml



Gambar 4. Aktivitas spesifik lipase pada larutan sisa amobilisasi (CaCl₂ 0,2 M)

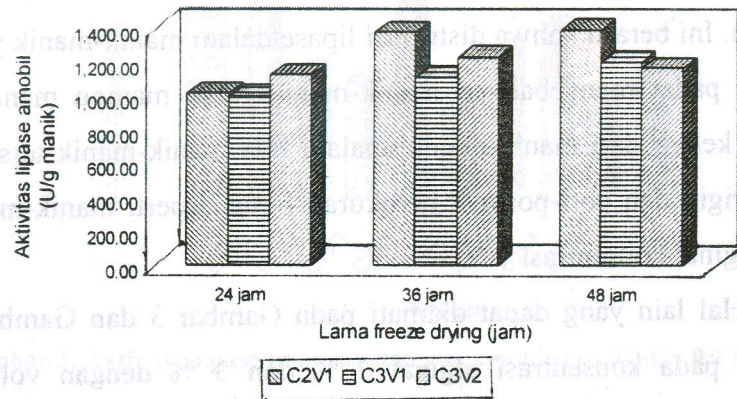
Keterangan:

C = konsentrasi alginat 1 %, 2 %, 3 %; V = volume alginat 10 ml, 20 ml, 30 ml

Pada konsentrasi alginat 1 % ditunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi lipase, aktivitas lipase pada larutan sisa semakin rendah. Ini berarti bahwa distribusi lipase dalam manik-manik yang terlalu padat menyebabkan manik-manik tidak mampu menahan lipase keluar dari manik-manik apalagi bila manik-manik tersebut tidak rigid dan pori-porinya berukuran besar seperti manik-manik dari alginat konsentrasi 1 %.

Hal lain yang dapat diamati pada Gambar 3 dan Gambar 4 adalah pada konsentrasi alginat 2 % dan 3 % dengan volume alginat 20 ml mempunyai aktivitas lipase pada larutan sisa amobilisasi yang lebih rendah daripada volume alginat 30 ml. Kemungkinan pada volume alginat 20 ml, banyaknya lipase yang terperangkap dalam manik-manik sudah optimal, sehingga bila volume alginat ditambah akan mengurangi jumlah lipase yang terperangkap dalam tiap manik yang mengakibatkan lipase lebih leluasa bergerak dalam manik dan akhirnya keluar dari manik-manik.

Berdasarkan masih tingginya aktivitas hidrolisis lipase amobil dan rendahnya aktivitas hidrolisis pada larutan sisa amobilisasi, dipilih beberapa variasi yang akan digunakan untuk tahap selanjutnya, yaitu konsentrasi alginat 2 % dengan volume 10 ml, konsentrasi alginat 3 % dengan volume 10 ml dan 20 ml.



Gambar 5. Stabilitas aktivitas hidrolisis lipase amobil terhadap proses freeze drying

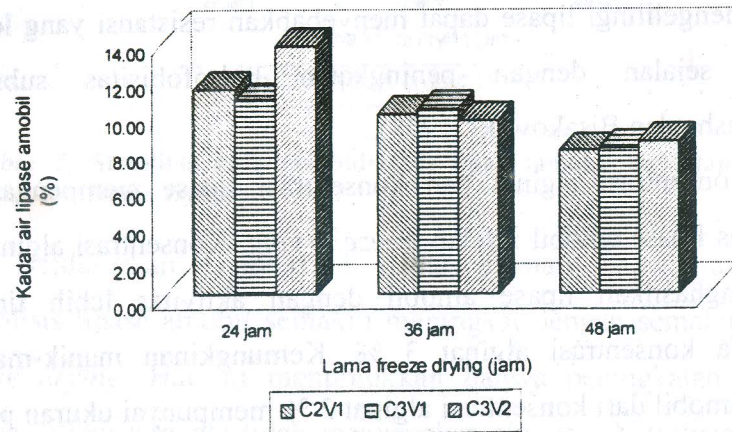
Berdasarkan Gambar 5 dapat diamati bahwa aktivitas hidrolisis lipase amobil semakin meningkat dengan semakin lama freeze drying. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan waktu freeze drying ternyata tidak menurunkan aktivitas hidrolisis lipase amobil sehingga dapat dikatakan bahwa lipase amobil stabil terhadap proses freeze drying. Freeze drying selama 24 jam menghasilkan lipase amobil dengan aktivitas hidrolisis terendah. Waktu freeze drying yang lebih lama (36 dan 48 jam) menghasilkan manik-manik lipase amobil dengan aktivitas hidrolisis yang hampir sama.

Perbedaan aktivitas hidrolisis lipase amobil sebelum dan sesudah liofilisasi disebabkan oleh distribusi air di sekitar enzim. Matriks hidrofilik seperti Ca-alginat akan menyebabkan desorpsi air dari enzim. Perbedaan distribusi air dalam manik-manik lipase amobil dapat meningkatkan reaksi hidrolisis pada substrat hidrofobik maupun hidrofilik, tergantung pada banyaknya air yang terdapat pada mikrolingkungan. Oleh karena itu, air permukaan yang mengelilingi lipase dapat menyebabkan resistansi yang lebih tinggi sejalan dengan peningkatan hidrofobisitas substrat (Kermasha dan Bisakowski, 1998).

Konsentrasi alginat dan konsentrasi lipase mempengaruhi aktivitas lipase amobil setelah freeze drying. Konsentrasi alginat 2 % menghasilkan lipase amobil dengan aktivitas lebih tinggi daripada konsentrasi alginat 3 %. Kemungkinan manik-manik lipase amobil dari konsentrasi alginat 2 % mempunyai ukuran pori-pori yang optimal untuk kontak dengan substrat dibandingkan dengan konsentrasi 3 %. Pada konsentrasi alginat 3 % diperoleh manik-manik dengan ukuran pori-pori yang lebih kecil sehingga akan menghambat difusi substrat hidrofobik ke dalam manik-manik Ca-alginat yang bersifat hidrofilik (Basri et al., 1995).

Selanjutnya pada konsentrasi alginat 3 %, semakin rendah konsentrasi lipase atau semakin banyak volume alginat yang ditambahkan akan meningkatkan aktivitas lipase amobil.

Peningkatan aktivitas ini teramati pada *freeze drying* selama 24 jam dan 36 jam sedangkan pada 48 jam tidak terjadi peningkatan. Peningkatan aktivitas lipase amobil ini disebabkan karena distribusi lipase yang semakin baik dengan semakin banyaknya volume alginat sehingga luas permukaan kontak antara lipase dengan substrat juga semakin optimal.



Gambar 6. Hubungan lama *freeze drying* dengan kadar air lipase amobil

Semakin lama *freeze drying* akan semakin menurunkan kadar air lipase amobil (Gambar 6). Air dibutuhkan oleh lipase dalam jumlah relatif sedikit untuk mempertahankan struktur tiga dimensi protein enzim sehingga dapat menunjukkan aktivitas katalitiknya, khususnya aktivitas sintesis, secara penuh (Yamane, 1987). Monot *et al.* (1991) menyebutkan bahwa air memegang beberapa peranan

dalam struktur dan fungsi enzim, yaitu 1) mempertahankan struktur protein enzim dengan kontribusi pada semua ikatan nonkovalen, 2) mengubah struktur protein enzim dengan memecah ikatan hidrogen, 3) fasilitator terjadinya difusi substrat, dan 4) berpartisipasi dalam konstanta kesetimbangan, baik air sebagai substrat ataupun produk.

SIMPULAN

Konsentrasi lipase dan konsentrasi alginat mempengaruhi aktivitas hidrolisis lipase amobil dan aktivitas spesifik lipase amobil. Semakin rendah konsentrasi lipase dalam manik-manik, semakin rendah aktivitas hidrolisis lipase amobil, sebaliknya aktivitas spesifik semakin meningkat, dan hal ini berlaku pada semua konsentrasi alginat. Pada penggunaan berulang, aktivitas lipase amobil dan aktivitas spesifik lipase amobil lebih dipengaruhi konsentrasi alginat.

Aktivitas hidrolisis lipase amobil setelah *freeze drying* juga dipengaruhi oleh konsentrasi alginat dan konsentrasi lipase. Aktivitas hidrolisis lipase amobil stabil terhadap proses *freeze drying* dan semakin meningkat dengan semakin lama *freeze drying*.

DAFTAR PUSTAKA

- Basri, M., Ampon, K., Wan Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A., dan Salleh, A.B. (1995). *Enzymic Synthesis of Fatty Esters by Hydrophobic Lipase Derivatives Immobilized on Organic Polymer Beads*. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 407-411.
- Chibata, I. (Ed.). (1978). *Immobilized Enzymes Research and Development*. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Kennedy, J. F. (1995). *Principles of Immobilization of Enzymes*. Di dalam A. Wiseman (Ed.). 1995. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 3rd Ed. Ellis Horwood, London, U. K.
- Kermasha, S. dan Bisakowski, B. (1998). *The Effect of Immobilization on the Hydrolytic/ Interesterification Activity of Lipase from Rhizopus niveus*. J. Am. Oil Chem. Soc., 75: 1791-1799.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, Jr. C.G., dan Amundson, C.H. (1990). *Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils- A Review*. J. Am. Oil Chem. Soc., 67: 890-910.
- Marseno, D.W., Indrati, R. dan Ohta, Y. (1998). *A Simplified Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay*. Indonesian Food and Nutrition Progress, 5: 79-83.
- Morrin, N., Cardou, M.B., dan Champagne, C.P. (1992). *Production of Concentrated Lactococcus lactis subsp. cremoris Suspension in Calcium Alginate Beads*. Applied and Environmental Microbiology, 58 (2) : 545-550.
- Peterson, G.L. (1977). *A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable*. Analytical Biochemistry, 83 : 346-356.

- Quiros, C., Garcia, L.A. dan Diaz, M. (1996). *The Evolution of the Structure of Calcium Alginate Beads and Cell Leakage During Protease Production*. Process Biochemistry, 31 : 813-822.
- Yamane, T. (1987). *Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Engineering Overview*. J. Am. Oil Chem. Soc., 64: 1657-1662.