

Pengaruh Medium Limbah Organik Terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari Isolat Kapang Tanah Wonorejo

Alfia R. Kurniawati dan Nengah D. Kuswytasari
Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: kuswytasari@bio.its.ac.id

Abstrak— Meningkatnya akumulasi limbah cair organik yang mengandung lipid di lingkungan perlu ditanggulangi. Limbah cair organik yang mengandung lipid diantaranya limbah tangki septik, limbah pencucian ikan dan limbah minyak goreng bekas. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari lebih lanjut pengaruh limbah organik yang berbeda terhadap produksi dan aktivitas enzim lipase. Penentuan produksi dan aktivitas lipase dilakukan dengan mengukur aktivitas lipase dan nilai degradasi lipid. Limbah diinokusikan dengan isolat *Mortierella* sp T3.G1, *Penicillium* sp T4.E3 dan *Aspergillus niger* T2.1 secara tunggal dan konsorsium yang kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 40°C. Hasil menunjukkan bahwa nilai aktivitas dan nilai degradasi tertinggi ditunjukkan pada penambahan isolat *Aspergillus niger* dengan nilai aktivitas lipase sebesar 0,1511 U/mL dan degradasi lipid 83,95% pada limbah minyak goreng bekas, 0,0997 U/mL dan degradasi lipid 58,43% pada limbah pencucian ikan dan aktivitas lipase 0,0697 U/mL dan degradasi lipid 67,36% pada limbah tangki septik.

Kata Kunci—Aktivitas lipase, degradasi lipid, limbah organik

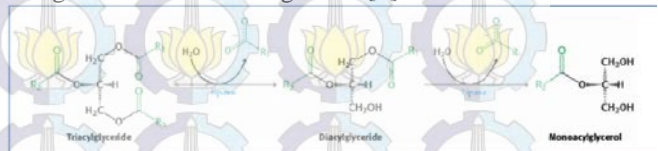
I. PENDAHULUAN

Pencemaran lingkungan berhubungan erat dengan limbah. Permasalahan limbah timbul karena tidak seimbangnya produksi limbah dengan pengolahannya dan semakin menurunnya daya dukung alam sebagai tempat pembuangan limbah [1]. Sekitar 90% air limbah langsung dibuang ke badan air (sungai) [2]. Di negara-negara berkembang termasuk Indonesia, pencemaran domestik merupakan jumlah pencemar terbesar (85%) yang masuk ke badan air. Komposisi pencemar berasal dari limbah domestik dengan rata-rata mengandung bahan organik dengan konsentrasi lipid berkisar 50 – 150 mg/L dan senyawa mineral yang berasal dari sisa makanan, urin dan sabun [3].

Lapisan lipid pada permukaan perairan dapat menghalangi masuknya cahaya matahari dalam badan air sehingga proses fotosintesis terhambat dan kadar oksigen menjadi rendah dan menyebabkan organisme aerobik mati [4]. Salah satu cara untuk dapat mengurangi tingkat pencemaran air adalah dengan cara biologis menggunakan mikroorganisme [5]. Senyawa organik yang terdapat dalam limbah organik seperti lipid dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber nutrisi sebagai sumber energinya. Lipid yang terdapat di dalam limbah berbentuk kompleks dan hanya larut dalam pelarut organik seperti kloroform atau benzena [6]. Karena

sifatnya yang non polar tersebut maka dibutuhkan enzim lipase untuk menghidrolisis lipid.

Degradasi ikatan lipid oleh lipase dilakukan melalui reaksi lipolisis. Lipolisis merupakan hidrolisis pada materi lipid hingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserida parsial [10]. Lipase diketahui dapat dibedakan atas dua kelompok berdasarkan lokasi pemutusan ikatan gliserol pada triasilgliserol yaitu lipase non-spesifik dan lipase spesifik. Lipase non-spesifik memutus ikatan gliserol dari triasilgliserol pada tiga posisi, sehingga menghasilkan diasilgliserol, monoasilgliserol atau tiga molekul asam lemak dan gliserol. Lipase spesifik memutus ikatan gliserol dari triasilgliserol pada posisi satu dan tiga sehingga menghasilkan 1,2-diasilgliserol dan monoasilgliserol [7].



Gambar 2. Reaksi Hidrolisis Trigliserida [8].

Berdasarkan hasil penelitian [9] yang menguji 37 isolat kapang asal Wonorejo, dan diperoleh 23 isolat yang mampu menghasilkan enzim lipase. Dari 23 isolat dipilih 3 (tiga) isolat yang memiliki aktivitas enzim lipase paling tinggi diantaranya *Mortierella* sp. T3.G1 dengan aktivitas lipase sebesar 0,0077 U/mL, *Aspergillus niger* T2.1 dengan aktivitas lipase sebesar 0,0063 U/mL, dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 dengan aktivitas lipase sebesar 0,0043 U/mL.

Melalui data penelitian tersebut, perlu dilakukan pengembangan agen hayati pendegradasi lipid dalam memproduksi lipase dan aktivitasnya dengan memanfaatkan limbah organik sebagai substratnya. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari lebih lanjut pengaruh limbah organik yang berbeda terhadap produksi dan aktivitas enzim lipase.

II. URAIAN PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2014, di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

B. Peremajaan isolat kapang

Isolat kapang yang didapatkan dari koleksi kultur murni laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS dibuat menjadi 2 sub kultur yaitu kultur stok dan kultur kerja. Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 Subkultur dilakukan ke dalam media agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*).

C. Pembuatan kurva pertumbuhan

Isolat diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam masing-masing 125mL medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Pertumbuhan dikontrol tiap 24 jam selama 7 hari, dengan mengukur nilai biomasanya. Nilai biomassa diperoleh dengan cara menimbang berat kering isolat yang tumbuh pada medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Data biomassa yang diperoleh kemudian disajikan dalam grafik pertumbuhan.

D. Degradasi lipid dari limbah organik oleh isolat kapang

Limbah organik yang digunakan adalah limbah pencucian ikan, limbah air tanki septik dan limbah minyak goreng bekas. Limbah pencucian ikan dan limbah air tanki septik ditreatment dengan melakukan filtrasi. Sedangkan untuk limbah minyak goreng bekas ditambahkan sebanyak 20% medium starter dan 10% Tween 80 kemudian dihomogenkan hingga terbentuk emulsi. Kemudian medium limbah organik ini ditempatkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL sebanyak 125 mL dan dilakukan tiga kali replikasi atau pengulangan. Kemudian medium di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm. Selanjutnya diatur pH medium menjadi pH 7.

Medium starter yang mengandung isolat ditambahkan sebanyak 10% kedalam medium limbah dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 40°C. Medium starter terdiri dari 3,0 % pepton; 0,2% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄.7H₂O; 0,05% KCL dan 1% minyak zaitun: glukosa (0,5:0,5) [10].

E. Analisis lipid pada limbah organik

Analisis kandungan lipid pada limbah cair dilakukan dengan mengukur kadar asam lemak bebas berupa asam oleat menggunakan metode kolorimetri [11]. Pengukuran sampel dilakukan dengan cara menambahkan 2mL sampel limbah cair dengan 5mL etanol 96%. Campuran selanjutnya dikocok kuat dan lapisan atas diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat. Absorbansi campuran diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 715 nm. Hasil absorbansi dihitung konsentrasinya dengan persamaan matematik dari kurva standar asam oleat.

Nilai degradasi dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Nilai Degradasi} = \frac{(\text{Konsentrasi akhir} - \text{Konsentrasi awal})}{\text{Konsentrasi awal}} \times 100\%$$

F. Uji penentuan aktivitas lipase

Penentuan aktivitas lipase ditentukan dengan menggunakan metode Kwon dan Rhee (Kwon and Rhee, 1986). Enzim lipase yang telah diproduksi pada medium limbah dipisahkan filtrat dan supernatannya dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Filtrat

diasumsikan sebagai enzim kasar. Substrat yang digunakan adalah minyak zaitun (Le Riche®, PT Ishma mediterranea: Al-Jazair) sebanyak 1,5 mL kemudian ditambahkan dengan 1 mL buffer fosfat pH 7 dan 1 mL larutan enzim kasar. Campuran ini selanjutnya diinkubasi pada *shaker incubator* selama 30 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan larutan 1 mL HCL 6N dan 5 mL reagen etanol 96%. Campuran selanjutnya dikocok kuat dan lapisan atas diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat. Absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 715 nm.

Nilai aktivitas lipase ditentukan dengan rumus:

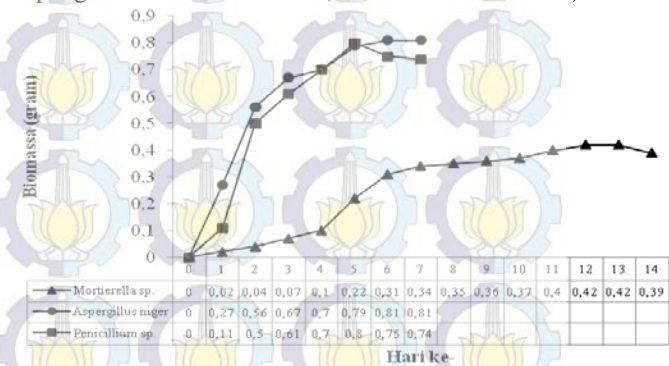
$$A_e = \frac{\text{konsentrasi Asam oleat } (\mu\text{mol/ml})}{\text{Waktu Inkubasi (menit)}} \times \frac{\text{volume total campuran (mL)}}{\text{volume enzim (mL)}}$$

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim lipase yang dihasilkan dari isolat kapang *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1, *Penicillium* sp.1 T4.E3 secara tunggal dan konsorsium dalam mendegradasi lipid pada medium limbah organik yang berbeda. Isolat diperoleh dari koleksi labolatorium Mikologi yang merupakan hasil isolasi dari tanah Wonorejo. Medium limbah organik yang digunakan adalah limbah pencucian ikan, limbah tangki septik dan limbah minyak goreng bekas. Pemilihan tiga limbah organik yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada limbah pencemar yang umumnya ditemukan pada perairan tercemar.

A. Kurva Pertumbuhan

Setiap organisme mempunyai kurva pertumbuhan, begitu pula fungi. Kurva tersebut dapat diperoleh dari menghitung massa sel pada kapang atau kekeruhan media pada khamir dalam waktu tertentu [7]. Fase pertumbuhan kapang dapat diketahui dengan perbanyakan biomassa kapang melalui fermentasi. Medium yang digunakan dalam pertumbuhan kapang adalah medium PDB (*Potato Dextrose Broth*).



Gambar 3. Grafik pertumbuhan pada isolat (●) *Aspergillus niger* T2.1, (■) *Penicillium* sp. T4.E3 dan (▲) *Mortierella* sp. T3.G1.

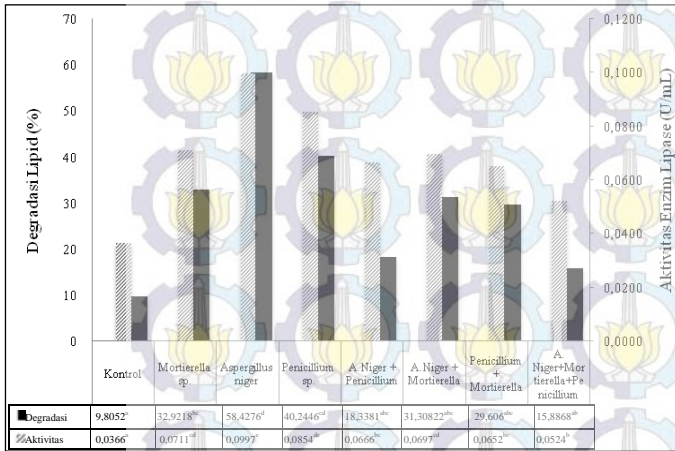
Berdasarkan grafik diatas dapat ditentukan untuk usia starter pada *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp adalah pada hari ke 3 sedangkan untuk *Mortierella* sp adalah pada hari ke-6.

B. Aktivitas Enzim Lipase dan Degradasi Lipid dalam Medium Limbah Pencucian Ikan

Lipid yang terkandung di dalam limbah pencucian ikan terbentuk dalam emulsi minyak di dalam air (*oil in water*

O/W), dimana fase minyak sebagai fase terdispersi. Agen pengemulsi (non ionik surfaktan) pada *amphiphilic nature* seperti limbah pencucian ikan, disebut dengan HLB (*hydrophyle-lipophile balance*) dengan kisaran angka yang rendah [12].

Karakteristik limbah pencucian ikan memiliki nilai pH 7 dan suhu 32°C dengan jumlah total asam lemak sebesar 0,130 µmol/mL. Hasil aktivitas lipase dan degradasi lipid pada limbah pencucian ikan ditunjukkan pada Gambar 4,4.



Gambar 4 Grafik Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid di dalam Medium Limbah Pencucian Ikan

Berdasarkan grafik di atas, dapat diketahui bahwa penambahan isolat tunggal dan konsorsium mempengaruhi nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid yang dihasilkan pada medium limbah pencucian ikan. Hal ini ditunjang dengan analisa data menggunakan ANNOVA *oneway* yang menunjukkan P value sebesar 0,000. Analisa data dilanjutkan dengan uji Duncan sehingga diperoleh notasi yang menunjukkan tingkat signifikansi. Semakin besar notasi maka menunjukkan pengaruh yang besar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas yang memiliki nilai signifikansi paling tinggi adalah isolat *Aspergillus niger* sebesar 0,0997^c U/mL dengan degradasi lipid sebesar 58,43^d %. Dilanjutkan dengan isolat *Penicillium* sp. yang memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0854^{bc} U/mL dengan degradasi lipid sebesar 40,24^{cd} %. Perbedaan tingkat aktivitas lipase dan degradasi lipid ini didasarkan pada kecepatan pertumbuhan dari masing-masing isolat. Pada isolat *A. niger* memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan kedua isolat yang lainnya seperti pada kurva pertumbuhan.

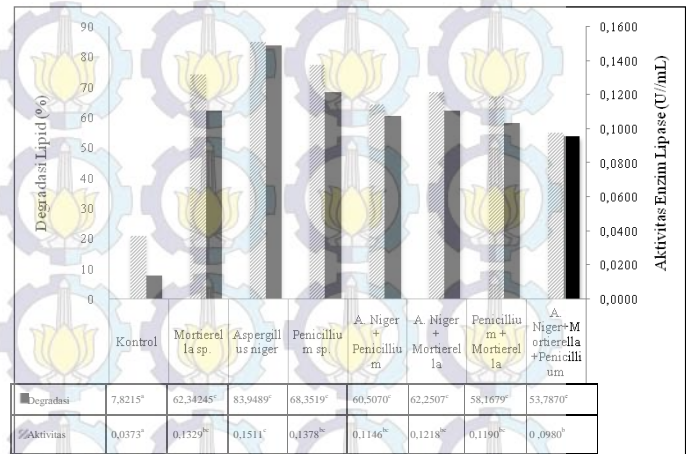
Pada konsorsium isolat *A. niger* dan *Penicillium* sp., memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0666^{bc} U/mL dengan nilai degradasi lipid sebesar 18,34^{abc}%. Konsorsium dari kedua isolat dapat dilihat pada hasil uji interaksi (Lampiran 9) yang menunjukkan bahwa kedua nya tumbuh secara sinergis. Nilai degradasi dari konsorsium menunjukkan nilai yang lebih rendah dari nilai degradasi isolat dalam kondisi tunggal. Hal ini dikarenakan asam lemak hasil hidrolisis sebagian besar telah di metabolisme oleh isolat untuk kebutuhan nutrisi, sehingga sedikit konsentrasi asam lemak yang terdeteksi.

Sedangkan pada konsorsium *Mortierella* sp dan *Penicillium* sp. yang memiliki nilai lebih rendah yakni

aktivitas lipase sebesar 0,0652^{bc} U/mL dan nilai degradasi lipid sebesar 29,60^{abc} %. Perbedaan nilai ini kembali pada kemampuan isolat dalam melakukan kompetisi. Beberapa kompetisi dapat menghambat pertumbuhan kompetitornya dengan memproduksi metabolit sekunder baik berupa antifungal maupun zat toksik lainnya. Salah satu spesies dari *Penicillium* yakni *Penicillium solitum* diketahui mampu memproduksi zat antifungal berupa kompaktin [13].

C. Aktivitas Enzim Lipase dan Degradasi Lipid dalam Medium Limbah Minyak Goreng Bekas

Karakteristik limbah minyak goreng bekas memiliki nilai pH 6 dan suhu 32°C dengan jumlah asam lemak sebesar 0,176µmol/mL. Uji degradasi lipid pada limbah minyak goreng bekas dilakukan dengan metode fermentasi cair dengan masa inkubasi selama 7 hari. Hasil aktivitas lipase dan degradasi lipid ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 5 Grafik Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid di dalam Medium Limbah Minyak Goreng Bekas.

Berdasarkan grafik pada gambar 5, dapat diketahui bahwa penambahan isolat baik tunggal maupun konsorsium mempengaruhi nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid yang dihasilkan pada medium limbah minyak goreng bekas. Hal ini ditunjang dengan analisa data menggunakan ANNOVA *oneway* yang menunjukkan P value sebesar 0,000. Nilai aktivitas tertinggi ditunjukkan pada perlakuan penambahan isolat tunggal, yakni *Aspergillus niger* yang memiliki nilai aktivitas sebesar 0,1511^c U/mL dengan nilai degradasi sebesar 83,95%. Kedua nilai memiliki taraf signifikansi yang tertinggi yang berarti *A.niger* memiliki nilai yang paling optimal untuk mendegradasi lipid pada medium limbah minyak goreng bekas.

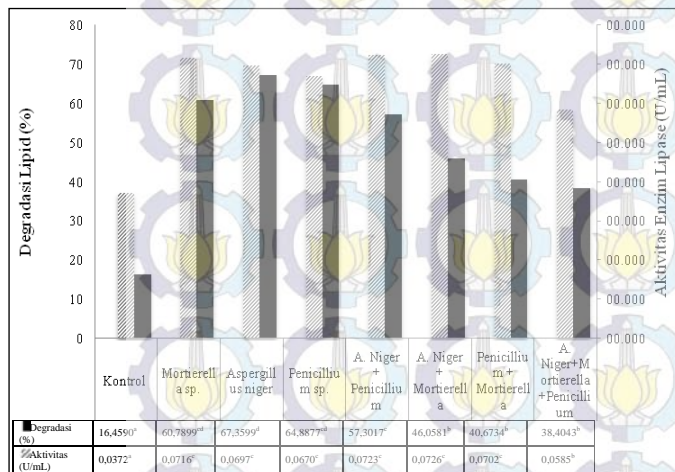
Selanjutnya terdapat lima perlakuan yang memiliki taraf signifikansi yang sama baik pada nilai aktivitas maupun degradasi lipid, yakni isolat *Penicillium* sp. (0,1378^{bc} U/mL; 68,35%), isolat *Mortierella* sp. (0,1329^{bc} U/mL; 62,34%), konsorsium *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. (0,0666^{bc} U/mL; 18,33%), konsorsium *A. niger* dan *Mortierella* sp.(0,1218^{bc} U/mL;62,25%) dan Pada konsorsium *Penicillium* sp. dan *Mortierella* sp. (0,1190^{bc} U/mL; 58,17%). Hal ini menunjukkan bahwa produksi lipase dan aktivitas

lipase yang dihasilkan dari kelima perlakuan tidak berbeda nyata.

Konsorsium 3 isolat yakni *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* dan *Mortierella* sp. memiliki nilai yang terendah dibandingkan perlakuan yang lain, yakni dengan aktivitas lipase sebesar 0,0980^b U/mL dan nilai degradasi sebesar 53,78^c %. Hal ini disebabkan adanya kompetisi interspesifik antara 3 isolat. Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi lipase yang rendah, dimana isolat tidak maksimal dalam memproduksi lipase dikarenakan kompetisi dan aktivitas dari masing-masing isolat.

D. Aktivitas Enzim Lipase dan Degradasi Lipid dalam Medium Limbah Tangki Septik

Karakteristik limbah pencucian ikan memiliki nilai pH 7 dan suhu 32°C dengan jumlah total asam lemak sebesar 0,119µmol/mL. Adapun hasil fermentasi isolat kapang tanah Wonorejo dalam medium limbah tangki septik dapat dilihat pada gambar 4.7. Berdasarkan grafik yang telah diperoleh, menunjukkan hasil yang berbeda dengan hasil pada limbah pengolahan ikan dan limbah minyak bekas. Dimana nilai aktivitas tertinggi ditunjukkan pada konsorsium dua isolat (*A.niger*+*Mortierella* sp.) namun nilai degradasi tertinggi ditunjukkan pada isolat tunggal (*A. niger*). Hal menunjukkan bahwa jumlah produksi lipase ini tidak selalu linear dengan aktivitas lipase. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor pelarut, jumlah zat organik, konsentrasi enzim dan substrat. Pada limbah tangki septik, mengandung zat-zat organik sebesar 20% untuk tinja dan 2,5% untuk air seni [14]. Didalam limbah tangki septik terdapat pula kadungan mikronutrien seperti Ca²⁺ dan Mg²⁺ yang dapat menstimulasi aktivitas. Beberapa hal tersebut yang dapat menyebabkan medium limbah tangki septik menjadi optimum bagi aktivitas lipase dari isolat konsorsium.



Gambar 6 Grafik Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid di dalam Medium Limbah Tangki Septik

Berdasarkan grafik pada gambar 6, dapat diketahui bahwa penambahan isolat tunggal dan konsorsium mempengaruhi nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid yang dihasilkan pada medium limbah tangki septik. Hal ini ditunjang dengan analisa data menggunakan ANNOVA oneway yang menunjukkan P value sebesar 0,000. Analisa dilanjutkan dengan menggunakan

uji Duncan untuk mengetahui pengaruh dari masing-masing pada taraf signifikansi nya. Semakin besar notasi maka semakin besar pengaruh isolat dalam melakukan aktivitas atau degradasi.

Pada semua isolat tunggal dan konsorsium menunjukkan taraf signifikansi yang sama yakni dengan notasi c. Dimana nilai aktivitas tertinggi ditunjukkan pada konsorsium *Aspergillus niger* dan *Mortierella* sp yang memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0726^c U/mL dan degradasi lipid sebesar 45,06^b %. Sehingga untuk mengetahui mana isolat yang paling berpengaruh, perlu dikorelasikan dengan nilai degradasi lipid. Nilai degradasi lipid dengan tingkat signifikansi paling besar ditunjukkan pada isolat tunggal *A. niger* yang memiliki nilai degradasi sebesar 67,36^d % dengan nilai aktivitas sebesar 0,0697^c U/mL. Dengan demikian isolat tunggal *A. niger* dapat dikatakan sebagai isolat yang paling optimal di dalam limbah tangki septik.

Pada isolat *Mortierella* sp. (0,0716^c U/mL; 60,79^{cd} %), memiliki taraf signifikansi yang sama dengan *Penicillium* sp. (0,0670^c U/mL; 64,87^{cd} %). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas lipase dari kedua isolat tidak berbeda nyata.

Konsorsium tiga isolat menunjukkan nilai yang paling rendah dengan nilai aktivitas lipase sebesar 0,0585^b U/mL dan nilai degradasi lipid sebesar 38,40^b %. Hal ini disebabkan adanya kompetisi interspesifik. Spesies yang dapat mengeluarkan antifungal yakni *Penicillium* sp. Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi lipase yang rendah, dimana dengan isolat tidak maksimal dalam memproduksi lipase karena adanya kompetisi antar spesies.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan isolat mempengaruhi aktivitas enzim pada masing-masing limbah dengan nilai p=0,000 (<0,005) pada uji ANOVA oneway dengan rincian sebagai berikut :

1. Pada medium limbah pencucian ikan menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang optimal untuk isolat tunggal yakni *Aspergillus niger* (0,0997^e U/mL; 58,43^d %) dan untuk konsorsium yakni *Mortierella* sp dan *A. niger* (0,0697^{cd} U/mL; 31,31^{abc} %).
2. Pada medium limbah minyak goreng bekas menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang optimal untuk isolat tunggal yakni *Aspergillus niger* (0,1511^c U/mL; 83,95^c %) dan untuk konsorsium yakni *Mortierella* sp dan *A. niger* (0,1218^{bc} U/mL; 62,25^c %).
3. Pada medium limbah tangki septik menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang optimal untuk isolat tunggal yakni *Aspergillus niger* (0,0697^c U/mL; 67,36^d %) dan untuk konsorsium yakni *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. (0,0723^c U/mL; 57,30^c %).

DAFTAR PUSTAKA

[1] Rizaldi, R.” Pengelolaan Sampah Secara Terpadu Di Perumahan Dayu Permai”. Skripsi. Yogyakarta: Jurusan Kesehatan Masyarakat, Universitas Islam Indonesia (2008).

- [2] Sasongko L. A. "Kontribusi Air Limbah Domestik Penduduk Di Sekitar Sungai Tuk Terhadap Kualitas Air Sungai Kaligarang Serta Upaya Penanganannya". Skripsi. Semarang: Jurusan Ilmu Lingkungan Universitas Diponegoro (2006).
- [3] Sumarno "Degradasi Lingkungan. Hand Out Kuliah. Magister Ilmu Lingkungan". Semarang: Universitas Diponegoro (2002).
- [4] Tresna, S. Pencemaran Lingkungan. Jakarta: Penerbit Rineka Cipta (1991).
- [5] Lestari, W. "Perbedaan EM-4 dan Starbio dalam Menurunkan Kadar TSS dan TDS Limbah Cair Batik Brotojoyo di Desa Karangpilang, Kecamatan Masaran Kabupaten Sragen". Skripsi. Surakarta: Jurusan Kimia, Universitas Muhammadiyah Surakarta (2008).
- [6] Karp, G. Cell and Molecular Biology: Concept and Experiments. New Jersey: Jhon Wiley & Sons Ltd (2000).
- [7] Gandjar, I. W., Samsurizal, dan A. Oetari. "Mikologi Dasar dan Terapan". Jakarta: Yayasan Obor Indonesia (2006).
- [8] Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer. "Biochemistry 5th Edition". New York: W.H. Freeman and Company (2006).
- [9] Pramitasari, Novera D. "Seleksi Isolat Kapang Tanah Wonorejo Penghasil Enzim Lipase". Skripsi. Surabaya: Jurusan Biologi FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya (2012).
- [10] Akhtar, M. W., Mirza, A. Q. and Chughtai, M. I. D. "Lipase induction in *Mucor hiemalis*". *Applied Environmental Microbiology* (1980) 40, 257-263.
- [11] Kwon, D. Y. and J. S. Rhee. "A simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acid for Lipase Assay". *Journal of the American Oil Chemists' Society* (1986). 63 (1) : 89-92
- [12] Shaw, D.J. "Introduction to Colloid and Surface Chemistry", Fourth edition. Britain: Butterworth-Heinemann Ltd (1991).
- [13] Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. "Terverticillate penicillia: Chemotaxonomy and mycotoxin production". *Mycologia* (1989), 81, 837-861.
- [14] Azwar, Azrul. Pengantar Ilmu Kesehatan Lingkungan. Jakarta: Mutiara Sumber (1995).

