



SNB

Seminar Nasional Bioteknologi 2014

PROSIDING SNB 2014

**BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES
TO BLUE ECONOMY IMPLEMENTATION**

PROSIDING SNB 2014

Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation

UBAYA Press, 2014

I + 295 hal : 23 X 31,5 cm

ISBN : 978-602-14714-2-5

PROSIDING SNB 2014

Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation

Editor : Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto,
Dr. Tjandra Pantjajani,
Theresia Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech,
Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.,
Nurul Azizah, S.Si.

Percetakan : Universitas Surabaya

Cetakan : Pertama, 2014

Penerbit : Universitas Surabaya (Ubaya Press)
Jalan Ngagel Jaya Selatan 169, Surabaya
Telp 031 2981039

*Biotechnological Approaches to Blue Economy
Implementation*

Diselenggarakan oleh:
Program Studi Biologi - Fakultas Teknobiologi
Universitas Surabaya

Perpustakaan Lantai 5 Universitas Surabaya
Surabaya-Indonesia

27 - 28 Februari 2014

“ SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI 2014”

Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation

PROSIDING

Ketua:

Theresa Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech

Editor:

Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto

Dr. Tjandra Pantajani

Theresa Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech

Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.

Nurul Azizah, S.Si.

Diselenggarakan oleh:

**Program Studi Biologi - Fakultas Teknobiologi
Universitas Surabaya**

27 - 28 Februari 2014

“ SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI 2014”

*Biotechnological Approaches to Blue Economy
Implementation*

PROSIDING

ISBN : 978-602-14714-2-5

Editor : Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto
Dr. Tjandra Pantjajani
Theresia Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech
Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.
Nurul Azizah, S.Si.

Diterbitkan oleh : UBAYA Press

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kami haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat yang telah diberikan sehingga Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi (SNB) Universitas Surabaya (UBAYA) 2014 dapat diselesaikan. SNB UBAYA 2014 merupakan seminar nasional pertama yang diselenggarakan oleh Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, sekaligus mengawali rangkaian kegiatan peringatan lustrum pertama Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya yang jatuh pada tanggal 1 Februari 2015. Tema seminar nasional ini adalah '*Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation*' yang diadakan pada tanggal 27-28 Februari 2014, bertempat di Gedung Perpustakaan lantai V, Universitas Surabaya, serta dihadiri oleh enam pembicara utama yang pakar di bidang Industri dan Bisnis, Kesehatan dan Forensik, serta Pangan dan Pertanian. Peserta yang berpartisipasi dalam presentasi oral maupun poster berasal dari berbagai perguruan tinggi negeri maupun swasta di Indonesia serta instansi pemerintah maupun industri.

Prosiding ini dibuat dengan tujuan memberikan pengetahuan bagi masyarakat luas terkait dengan penelitian di bidang bioteknologi untuk mendukung implementasi *Blue economy* di Indonesia . Prosiding SNB UBAYA 2014 ini berisi makalah dan hasil penelitian dari para pembicara utama maupun peserta presentasi oral. Adanya sesi diskusi pada sesi oral yang dibagi menjadi 4 kelas paralel, yaitu kelas Bioteknologi Kesehatan dan Forensik, Bioteknologi Pangan, Bioteknologi Tanaman, dan Bioteknologi Lingkungan, maupun sesi poster diharapkan dapat menjadi motivasi bagi pemakalah untuk terus berkarya di bidang bioteknologi untuk mendukung implementasi *Blue economy* di Indonesia.

Kami menyadari bahwa Prosiding ini tentu saja tidak luput dari kekurangan, untuk itu segala saran dan kritik kami harapkan demi perbaikan Prosiding pada terbitan tahun yang akan datang. Kami berharap Prosiding ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Hormat saya,

Theresia Desy Askitosari

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR

iv

Keynote Speaker

Blue Economy sebagai Pilar Kedaulatan Ekonomi Indonesia Jaya Suprana	3
Aplikasi Teknologi DNA sebagai Metode Identifikasi di Bidang Forensik Agung Sosiawan	4
Solusi Saintifik terhadap Berbagai Permasalahan dalam Industri Bioproses (Lingkungan) yang Menunjang Implementasi <i>Blue Economy</i> Lieke Riadi	5
Aplikasi Bioteknologi Pangan dan Pertanian untuk Menunjang Implementasi <i>Blue Economy</i> Anton Apriyantono	6
<i>Technology Development of Microscope from Cell Biology to Nano Biology</i> Sutiman B. Sumitro	8
Solusi Saintifik terhadap Berbagai Permasalahan dalam Bioteknologi Tanaman yang Menunjang Implementasi <i>Blue Economy</i> Xavier Daniel	9

Bidang Bioteknologi Kesehatan dan Forensik

Deteksi Transovarial Virus Dengue pada Nyamuk Vektor Demam Berdarah Kasus KLB di Kabupaten Merauke Provinsi Papua : Sebuah Pendekatan Molekular Hana Krismawati ^{*1)} , Hanna Kawulur ¹⁾ , Antonius Oktavian ¹⁾ , Neville Raymon M ²⁾ , Arif ²⁾ , John Master Saragih ³⁾ , Jan Lewier ¹⁾	13
Deteksi Mutasi Fragmen DNA Integrase HIV-1 pada Subjek Odha di Jayapura Hotma Hutapea ¹ , Arie Ardiansyah ²	17
Karakterisasi DNA <i>Escherichia coli</i> C600 Lisogenik Menggunakan Teknik Hibridisasi <i>Dot Blotting</i> dan <i>Southern Blotting</i> Aline Puspita Kusumadjaja	22
Optimasi dan Aplikasi <i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i> untuk Deteksi <i>Salmonella</i> sp., <i>Vibrio cholerae</i> , dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Air Minum Kemasan sebagai Pengganti Metode Deteksi Konvensional Vicky Chu*, Maria Goretti M. Purwanto, Xavier Daniel	32

Analisa Sinyal EEG Saat Menggerakkan Kedua Kaki sebagai FES Control <i>Command</i> pada Proses Rehabilitasi Pasien Pasca Stroke Muhammad Hilman Fatoni [*] , Eka Wiantara, Achmad Arifin	40
Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala (<i>Cynometra ramiflora</i> Linn.) terhadap Sel HeLa, T47D, WiDr dan Raji Haryoto*, Muhtadi, Peni Indrayudha, Tanti Azizah, Andi Suhendi, Zulis Husnul Ihlasiyah	48
Efek Sitotoksisitas Mangostin terhadap Sel Hepatoma, HepG2 Harliansyah ^{1)*} , Aan Royhan ²⁾ , Ikke Irmawati PA ³⁾	53
Enkapsulasi Obat Anti Tuberculosis Menggunakan Kitosan-Alginat Sari Edi Cahyaningrum ^{1)*} , Nuniek Herdyastuti ¹⁾ , Nur Qomariah ²⁾	58
Bidang Bioteknologi Pangan	
Cemaran Mikroba pada Pangan Jajanan Anak Sekolah (PJAS) di Wilayah Kabupaten Kulon Progo - DIY Chatarina Wariyah ¹⁾ , Sri Hartati Candra Dewi ²⁾	65
Produksi dan Deteksi Prebiotik Xilooligosakarida serta Seleksi Kapabilitasnya dalam Meningkatkan Pertumbuhan Bakteri Probiotik <i>Bifidobacterium</i> sp. Wuryanti Handayani, Anak Agung Istri Ratnadewi	72
Pengaruh pH Awal dan Lama Fermentasi terhadap Aktivitas Xilanase yang Diproduksi oleh <i>Aspergillus niger</i> dalam Media Tongkol Jagung Yusnita Liasari ¹⁾ , Tjandra Pantjajani, Yessica Berlina Imawan	80
Pengaruh Penambahan Ion Mono- dan Di-valen terhadap Aktivitas Hidrolisis Enzim Lipase <i>Candida rugosa</i> pada Substrat Limbah Minyak Ikan Maria Goretti M. Purwanto*, Stephanie Lauren Tessie, Ruth Chrisnasari	88
Imobilisasi Enzim Lipase pada Ca-Bentonit serta Aplikasinya pada Produksi Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Minyak Ikan Ruth Chrisnasari ^{1)*} , Restu Kartiko Widi ²⁾ , Billy Adrian Halim ¹⁾ , Maria Goretti Marianti Purwanto ¹⁾	97
Penentuan Cara Perendaman dan Pengolahan Akhir Keripik Ketela Ungu sebagai Bahan Pangan Diet Penderita Diabetes Mellitus Bambang Admadi Harsojuwono, I Gusti Ngurah Agung dan Sri Mulyani	105
Ekstrak Kurkumin Kunyit untuk Menghambat Peroksidasi Lemak dan <i>Off-Flavor</i> Daging Itik Afkir Selama Penyimpanan pada Freezer Sri Hartati Candra Dewi [*] , Niken Astuti	112

Aktivitas Antioksidan, Kandungan Karoten Total, dan Uji Organoleptik pada Tempe dengan Penambahan Tepung Labu Kuning (<i>Cucurbita moschata</i> Durch.) Arif Lutfi Ahzani ^{1*} , Lusiawati Dewi, Lydia Ninan Lestario	117
Peningkatan Kualitas Gizi dan Umur Simpan Kue Tradisional Onde-Onde Melalui Penggunaan Tepung Komposit dan Biopreservasi Valencia Tiffany Leonora ^{1*} , Tjandra Pantajani, Yusnita Liasari	124
Model Matematika Pertumbuhan Ragi Roti pada Media Molase Akbarningrum Fatmawati ^{1*}	131
Pengaruh Penggunaan <i>Co-Culture</i> dan Penambahan Fruktosa Cair sebagai <i>Cryoprotectant Agent</i> terhadap Karakteristik <i>Frozen Probio Soy-Vege</i> Robby Cahyono ^{1*} , Tjandra Pantajani, Yusnita Liasari	137
Fortifikasi Mie Menggunakan <i>Crude Fukoidan</i> dari <i>Sargassum echinocarpum</i> Nurul Hidayati ^{1)*} , Sri Yuwantiningsih ¹⁾ , Theresia Desy Askitosari ²⁾	143
Bidang Bioteknologi Lingkungan	
Rancangan Bio Digester Sederhana sebagai Bahan Bakar dan Sumber Energi Alternatif Untuk Peternak Sapi Perah Berskala Kecil Hadi Santosa ^{1[1]} , Yuliati ^{1[2]}	149
Produksi Biogas Menggunakan Substrat Limbah Tjandra Pantajani ^{1*} ; Mangjhot Tua Goeltom	154
Instalasi Biogas Limbah Tahu Skala UKM di Desa Sumberberas Kabupaten Banyuwangi Herman Yuliandoko ^{1)*} , Eka Mistiko Rini ¹⁾ , Abdul Wahid ²⁾	160
Permodelan Pengolahan Limbah Industri Tekstil secara Aerob (<i>Activated Sludge</i>) berdasarkan Biokinetika Mikroba Hanjani Antania Andary ^{1*} , Purwanto ² , Budiyono ³	168
Biodesulfurisasi Dibenzothiophene dalam Tetradecane sebagai Model Minyak Bumi dengan Sel <i>Pseudomonas</i> sp. Strain KWN5 Terimobilisasi Ida Bagus Wayan Gunam ^{1)*} , Ardiansah Sitepu ¹⁾ , I Gusti Ayu Lani Triani ¹⁾ , Nyoman Semadi Antara ¹⁾ , Agus Selamet Duniaji ²⁾ , Yohanes Setiyo ³⁾ , dan I Wayan Arnata ¹⁾	174
Konstruksi Mutan <i>Enterobacter ludwigii</i> Strain Lokal secara Acak Menggunakan Transposon Mutagenesis untuk Menurunkan Produksi Asam dan Meningkatkan Produksi Biogas Junus Rangan ¹⁾ , Yusnita Liasari ²⁾ , Mariana Wahjudi ^{1)*}	180

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Indigen Penghasil Biosurfaktan dari Sampel Endapan Lilin pada Pipa Transmisi Minyak Mentah Any Juliani ^{1)*} , Andik Yulianto ¹⁾ , Mutia Anneu Sutani ²⁾	188
Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Logam Berat Kadmium Johnsen Tanjaya*, Tjandra Pantjajani, Mangihot Tua Goeltom	195
Kloning Gen Pengkode Enzim Endo-1,4-Beta-Glucanase (<i>ysdC</i>) dan Endo-BETA-1,3-1,4 Glucanase (<i>BSUW23_10175</i>) dari <i>Bacillus subtilis</i> dalam Sel <i>Escherichia coli</i> Origami Mariana Wahjudi*, Olivia Maria Angelina, Xavier Daniel, Lisa Gunawan, Yusnita Liasari	201
Kajian Jenis Tempat Perindukan, Kepadatan Larva <i>Aedes</i> sp., dan Perilaku 3M Masyarakat Kecamatan Cilacap Utara Kabupaten Cilacap – Jawa Tengah Imam Apriyana ^{1)*} , Haris B. Widodo ²⁾ , Agatha Sih Piranti ³⁾	210
Ekstraksi Eksotoksin Bakteri Simbion Nematoda Patogen Serangga Hasil Isolasi Sampel Tanah Trawas, Mojokerto Theresia Desy Askitosari	216
Karakteristik Bakterial Agarase Isolat GC 2.1. dari Perairan Sancang Garut Santi R. Anggraeni ^{1)*} , Emma Rochima ²⁾ , M. Untung Kurnia Agung ¹⁾	223
Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Penghasil Enzim Kitinase Termofil pada Permandian Air Panas Prataan, Tuban Steven Yasaputra, Tjandra Pantjajani, Ruth Chrisnasari*	228
Bidang Bioteknologi Tanaman/Pertanian	
Seleksi Ketahanan 10 Genotipe Gandum (<i>Triticum aestivum</i> L.) dengan Proline sebagai Penanda terhadap Cekaman Suhu Tinggi dan Kekeringan Theresa Dwi Kurnia ^{1)*} , Djoko Murdono ²⁾ , Nugraheni Widyawati ²⁾ , Sony Heru Priyanto ³⁾	237
Ekspresi Gen Doda pada Bunga <i>Celosia</i> di Jawa Timur Mastuti R*, Harijati N, Fatinah AA	242
Optimasi Efisiensi Transformasi Transien dan Regenerasi Transforman Stabil Tembakau Sindoro (<i>Nicotiana tabacum</i>) Jaka Angkasa Saputra, Tjie Kok ¹⁾ , Xavier Daniel ²⁾	249
Populasi dan Aktivitas Mikroba Tanah pada Budidaya Wortel Organik dan Konvensional Sarmah ^{1)*} , Khamdanah ¹⁾ , Edi Husen ²⁾	256

Pengaruh Biodekomposer Bc 1 dan Bc 2 terhadap Percepatan Pengomposan dan Kualitas Kompos Tandan Kosong Kelapa Sawit Khamdanah*, Elsanti, Sarmah, Edi Santosa, Surono	261
Pengaruh Katalis Berbasis CoMo pada Reaksi Hydrocracking Minyak Nyamplung Menjadi Biofuel Adrianto Prihartantyo*, Achmad Roesyadi, Mahfud, Rismawati Rasyid	268
Hidrocracking Minyak Biji Kapuk dengan Katalis Padat NiCoMo/ γ -Al ₂ O ₃ Eni Setya Rini*, Achmad Roesyadi	275
Senyawa Penyusun Ekstrak N-Heksana dari Daun Pisang Batu, Kepok dan Ambon Hasil Distilasi Air Titri Siratantri Mastuti*, Ratna Handayani ¹	283
Perombakan Herbisida 2,4- <i>Dichlorophenoxyacetic acid</i> (2,4-D) oleh Isolat Bakteri Tanah Vulkanik Gunung Merapi, Yogyakarta Seftavi Widya Sari	288
UCAPAN TERIMA KASIH	293
HALAMAN SPONSOR	294

Imobilisasi Enzim Lipase pada Ca-Bentonit serta Aplikasinya pada Produksi Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Minyak Ikan

**Ruth Chrisnasari^{1)*}, Restu Kartiko Widi²⁾, Billy Adrian Halim¹⁾,
Maria Goretti Marianti Purwanto¹⁾**

¹⁾Departemen Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya

²⁾Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Surabaya

Jl. Raya kalirungkut, Surabaya, 60293, Indonesia

*Email: ruth_c@staff.ubaya.ac.id

ABSTRAK

Limbah minyak ikan menyisakan asam lemak omega-3 yang berpotensi sebagai bahan baku produksi konsentrat asam lemak omega-3. Penggunaan enzim lipase yang terimobilisasi dapat memberikan keuntungan tambahan secara teknologi dan ekonomis dalam proses hidrolisis minyak ikan. Ca-bentonit merupakan lempung (*clay*) mineral montmorilonit dengan lapisan tetrahedral dan oktaedral yang memiliki daya tukar ion cukup besar, sehingga dapat digunakan sebagai imobilisator. Enzim lipase terimobilisasi pada Ca-bentonit menunjukkan aktifitas terbaik pada pH 6,5 dan suhu 35°C, serta konsentrasi substrat minyak yang paling efisien adalah 3 gram substrat/ 10 ml campuran *buffer*-substrat. Pada limbah minyak ikan, aktivitas enzim lipase terimobilisasi Ca-bentonit adalah sebesar 13,745 mg KOH/g substrat. Selain itu, enzim lipase terimobilisasi Ca-bentonit juga dapat meningkatkan kadar asam eikosapentaenoat-asam dokosaheksaenoat (EPA-DHA) dalam bentuk gliserida sebesar 80,07%.

Kata kunci: lipase, imobilisasi, Ca-bentonit, limbah minyak ikan, omega-3

Pendahuluan

Indonesia adalah salah satu negara kepulauan terbesar yang memiliki potensi sumber daya laut yang melimpah, salah satunya ialah ikan laut. Besarnya potensi pemanfaatan ikan laut mendorong banyaknya industri yang bergerak di bidang pengolahan ikan. Industri pengolahan ikan umumnya menghasilkan limbah berupa minyak ikan dari berbagai aktivitas dan proses industri [1]. Limbah minyak ikan tersebut masih banyak mengandung asam lemak tak jenuh berantai panjang yang berkonfigurasi omega-3, yaitu eikosapentaenoat (EPA) dan dokosaheksaenoat (DHA) yang telah dilaporkan sangat bermanfaat untuk mencegah beberapa penyakit degeneratif [2]. Oleh karena itu, limbah minyak ikan ini sangat berpotensi untuk dimanfaatkan lebih lanjut untuk produksi konsentrat asam lemak omega-3.

Produksi konsentrat asam lemak omega-3 secara konvensional dilakukan melalui proses saponifikasi dan ekstraksi minyak ikan menggunakan senyawa basa kuat dan asam kuat [2]. Cara ini lebih banyak digunakan karena relatif murah, namun proses ini memerlukan membutuhkan suhu dan tekanan tinggi serta masih sering menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan [3]. Produksi secara enzimatis menggunakan enzim lipase dapat memberikan metode alternatif selain dengan secara konvensional. Keuntungan dari proses secara enzimatis adalah dapat dilakukan dalam kondisi netral dan bersifat selektif [2]. Penggunaan enzim lipase yang terimobilisasi dapat memberikan keuntungan tambahan secara teknologi dan ekonomis dalam proses hidrolisis minyak ikan. Imobilisasi enzim dapat mengatasi masalah yang ada pada penggunaan enzim terlarut, seperti keterbatasan stabilitas, pemisahan yang rumit, dan keterbatasan pemakaian ulang. Selain itu, penggunaan enzim terimobilisasi dapat memudahkan pengontrolan produk serta pengoperasian secara kontinu. Hal ini membuat desain reaktor lebih fleksibel pada skala lab maupun industri [4].

Bentonit merupakan lempung (*clay*) mineral montmorilonit dengan dua lapisan tetrahedral dan satu lapisan oktaedral [5,6]. Dua lapisan tetrahedral akan saling bergabung pada ujung-ujung kisi silikat dengan hidroksil yang ada pada lapisan oktaedral, sehingga terbentuk 3 susunan lapisan tetrahedral-oktaedral-tetrahedral [6]. Bentonit terdiri dari dua tipe yaitu Na-bentonit dan Ca-bentonit, dimana jenis bentonit yang melimpah di Indonesia adalah Ca-bentonit. Jenis ini mengandung kalsium (Ca) dan magnesium (Mg) lebih banyak dibandingkan natriumnya, memiliki sifat sedikit menyerap air sehingga apabila didispersikan dalam air tidak membentuk suspensi, pH berkisar 4 – 7 (bersifat asam), dan memiliki daya tukar ion besar [7]. Karakteristik ini membuat bentonit sesuai digunakan sebagai material imobilisator.

Enzim lipase yang terimobilisasi oleh bentonit dapat meningkatkan stabilitas suhu dan tidak mengubah pH optimum aktivitas enzimnya secara signifikan [5]. Enzim lipase yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *Candida rugosa*. Karakter dari enzim ini memungkinkan enzim dapat digunakan pada suhu dan pH yang netral dengan kemampuan hidrolisis dengan *yield* 95-97% [8]. Melalui penelitian ini, diharapkan diketahui karakteristik enzim lipase terimobilisasi pada Ca-bentonit serta aplikasinya pada limbah minyak ikan untuk memproduksi asam lemak omega-3.

Metodologi

Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan uji sebagai berikut: Ca-bentonit yang berasal dari kota Pacitan, Jawa Timur, enzim lipase *Candida rugosa* (E.C.3.1.1.3, type VII) 807 U/mg (Sigma-Aldrich), limbah minyak ikan yang berasal dari kecamatan Muncar, kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur, *olive oil* (BORGES 100% *extra virgin olive oil*)

Alat

Alat-alat yang dipergunakan selama penelitian ini adalah peralatan gelas, kondensor, perangkat refluks, ayakan ukuran 140 mesh, *rotary shaker*, *incubator shaker*, pH meter, pH universal indicator, satu set mikropipet, sentrifuge, *Thin Layer Chromatography* (TLC), gas chromatography (Hewlett Packard, HP C1540A), spektrofotometer UV-vis (Thermo Scientific GENESYS 10S).

Imobilisasi Enzim Lipase pada Ca-bentonit

Sebanyak 5 mg lipase *Candida rugosa* dilarutkan dalam 5 ml 0,1 M larutan *buffer* fosfat pH 7 kemudian dicampurkan dengan 0,5 gram Ca-bentonit. Campuran diaduk dengan *stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang lalu disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh adalah enzim lipase yang terimobilisasi Ca-bentonit, sedangkan supernatannya merupakan enzim lipase yang tidak terimobilisasi. Supernatan diuji dengan metode Lowry [9] untuk mengetahui banyaknya enzim lipase yang tidak terimobilisasi. Pelet dicuci dengan disuspensikan dalam 5 ml *buffer* fosfat pH 7 dan di-centrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan diuji dengan metode Lowry untuk mengetahui banyaknya enzim lipase yang tidak terimobilisasi yang masih tersisa. Persentase enzim terimobilisasi ditentukan dari rumus berikut :

Persentase Enzim Terimobilisasi (%)

$$= \frac{\text{konsentrasi enzim awal}}{(\text{konsentrasi enzim awal} - \text{konsentrasi enzim tidak terimobilisasi})} \times 100\%$$

Karakterisasi pH dan Suhu Enzim Lipase Terimobilisasi

Karakterisasi pH dilakukan melalui uji aktivitas dengan cara mencampurkan 600 U enzim lipase terimobilisasi Ca-bentonit dalam 6 ml *buffer* fosfat 0,1 M dengan variasi pH 6,5, 7, dan 7,5. Larutan enzim kemudian dicampurkan dengan 3 gram *olive oil* (200 U enzim tiap gram substrat). Campuran kemudian diinkubasi selama 12 jam pada suhu 35°C sambil diaduk. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 ml etanol 96%. *Olive oil* hasil hidrolisis kemudian diukur bilangan bilangan asamnya [10] untuk mengetahui aktivitas enzimnya. Selain itu, untuk memastikan bahwa variasi pH *buffer* itu sendiri tidak mempengaruhi volume titrasi KOH pada saat penentuan bilangan asam, maka dibuat kontrol dengan kondisi reaksi dan komposisi substrat *olive oil* dan variasi pH *buffer* yang sama, namun tanpa menggunakan enzim lipase terimobilisasi. Setelah diperoleh pH terbaik, maka dilakukan karakterisasi suhu dengan variasi suhu 30, 35, dan 40°C. Tahapan uji aktivitas pada penentuan suhu terbaik sama dengan penentuan pH terbaik.

Penentuan Konsentrasi Substrat yang Efisien untuk Enzim Lipase Terimobilisasi Ca-Bentonit

Penentuan konsentrasi substrat yang efisien dilakukan dengan uji aktivitas seperti pada penentuan suhu dan pH terbaik, namun dengan variasi komposisi substrat *olive oil* dan *buffer* fosfat 0,1 M pH terbaik, yaitu 1, 2, 3, 4, dan 5 gram *olive oil*/ 10 ml campuran larutan *buffer*-*olive oil*. Pengujian dilakukan pada pH dan suhu terbaik.

Pretreatment Limbah Minyak Ikan

Getah pepaya dicampurkan dalam larutan *buffer* fosfat pH 7 0,1 M sebanyak 10% (b/v) dan diaduk selama 1 jam. Campuran disentrifugasi 4000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit dan diambil supernatannya (ekstrak papain). Limbah minyak ikan (*crude oil*) dicampurkan dengan ekstrak papain sebanyak 0,5% (b/b) dari berat limbah minyak ikan (*crude oil*). Campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu 55°C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit lalu lapisan minyaknya diambil. Lapisan minyak dicampurkan dengan Ca-bentonit sebanyak 4% (b/b) dari volume lapisan minyak, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 40°C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya. Supernatant kemudian diukur bilangan asam dan bilangan penyabunan untuk diamati perubahan kadar lemaknya.

Aplikasi Enzim Lipase Terimobilisasi pada Ca-Bentonit pada Substrat Limbah Minyak Ikan

Aplikasi enzim lipase terimobilisasi pada substrat limbah minyak ikan dilakukan dengan uji aktivitas pada suhu dan pH terbaik dengan komposisi substrat dan *buffer* yang paling efisien. Substrat yang digunakan adalah limbah minyak ikan yang telah mengalami proses *pretreatment*. Sebagai pembanding substrat *olive oil* juga digunakan. Sebagai kontrol, uji aktivitas juga dilakukan tanpa menggunakan enzim lipase. Pengujian aktivitas enzim pada kedua jenis substrat selain dengan pengukuran bilangan asam, juga dilakukan analisa *Gas Chromatography* (GC) yang diawali dengan *Thin Layer Chromotography* (TLC) [11]. Hasil kerokan TLC diderivatisasi ke bentuk *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) [12] sebelum diinjeksikan ke dalam GC.

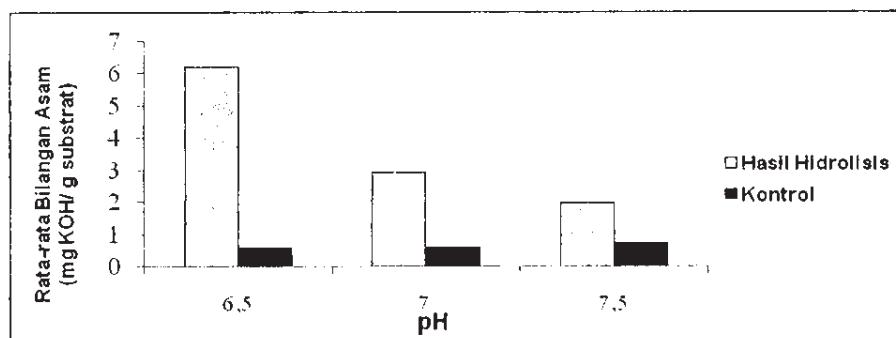
Analisa Gas Chromatography (GC)

Pengaturan GC untuk limbah minyak ikan, gas Helium yang digunakan sebagai *carrier gas* diatur total *flow rate* 26,1 ml/menit. Kenaikan suhu diatur dari 120°C ke 220°C dengan *rate* 7°C/menit kemudian ditahan pada suhu akhir selama 10 menit. *Injector* diatur pada suhu 250°C dan *Front Ionization Detector* (FID) diatur pada suhu 275°C. Sedangkan pada *olive oil*, *carrier gas* diatur total *flow rate* 17,8 ml/menit. Kenaikan suhu diatur dari 100°C ke 220°C dengan *rate* 5°C/menit kemudian ditahan pada suhu akhir selama 10 menit. *Injector* diatur pada suhu 250°C dan FID diatur pada suhu 275°C.

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi pH Enzim Lipase Terimobilisasi Ca-Bentonit

Hasil pengukuran pada Gambar 1 menunjukkan bahwa inkubasi dengan *buffer* pH 6,5 memiliki rata-rata nilai bilangan asam tertinggi. Jika dibandingkan dengan kontrol, variasi pH *buffer* pada saat pereaksian tidak memberikan pengaruh besar pada volume titrasi KOH pada saat pengukuran bilangan asam.



Gambar 1. Grafik Rata-rata Bilangan Asam Substrat Hasil Hidrolisis dan Kontrol pada Karakterisasi pH Enzim Lipase Terimobilisasi

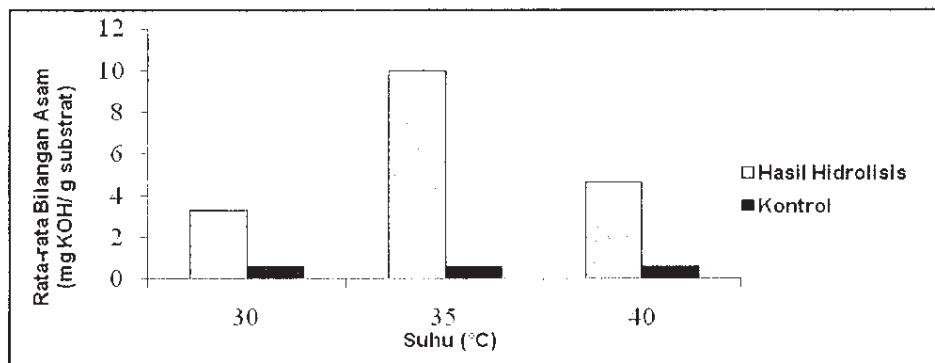
Hasil karakterisasi pH ini menunjukkan enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi memiliki aktivitas yang tinggi pada kondisi pH yang lebih asam. Hasil penelitian lain juga menunjukkan pH optimum enzim

lipase *C. rugosa* berada pada *range* pH 6 hingga 7, dengan aktivitas enzim tertinggi pH 6,5 [4,13,14]. Sebaliknya enzim lipase *C. rugosa* lebih tidak stabil pada kondisi pH yang lebih *alkaline* (pH>7). Hasil karakterisasi pH ini menunjukkan pH terbaik dari enzim lipase *C. rugosa* saat terimobilisasi Ca-bentonit tidak berbeda dengan keadaan bebasnya.

Perbedaan aktivitas pada variasi pH disebabkan perubahan struktur protein enzim seiring dengan perubahan pH. Perubahan pH mengakibatkan ionisasi rantai sampingnya dan mengubah konformasi alaminya, apabila enzim terdenaturasi. pH optimum menunjukkan kondisi yang dapat mempertahankan konformasi optimumnya. Kebanyakan aktivitas enzim pada variasi pH dalam *range* dua/ tiga unit pada tiap sisi titik isoelektrik (pI) masih digolongkan proses yang reversibel [15]. Sebaliknya pH ekstrim mengakibatkan denaturasi ireversibel. Pada larutan alkalin(pH>8), ada kemungkinan kerusakan asam amino *cystine* yang disebabkan β -elimination/ dehydrohalogenation. Sedangkan pada larutan sangat asam (pH<4), hidrolisis ikatan peptida yang tidak *conserved* sering terjadi di sebelah asam amino asam aspartat[15].

Karakterisasi Suhu Enzim Lipase Terimobilisasi Ca-Bentonit

Hasil pengukuran pada Gambar 2 menunjukkan bahwa inkubasi suhu 35°C memiliki rata-rata nilai bilangan asam tertinggi. Jika dibandingkan dengan kontrol, hasil pengukuran bilangan asam tersebut menunjukkan bahwa variasi suhu pada saat pereaksian tidak memberikan pengaruh besar terhadap volume titrasi KOH pada saat penentuan bilangan asam hasil hidrolisis enzim lipase.



Gambar 2. Grafik Rata-rata Bilangan Asam Substrat Hasil Hidrolisis dan Kontrol pada Karakterisasi Suhu Enzim Lipase Terimobilisasi

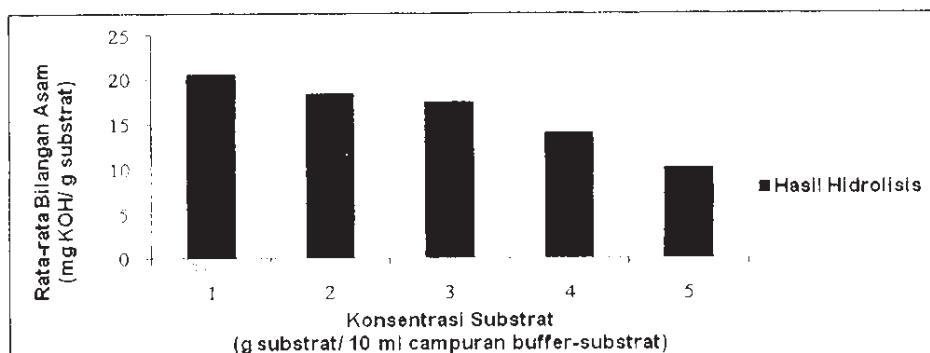
Peningkatan aktivitas enzim lipase sejalan dengan meningkatnya suhu dapat disebabkan oleh meningkatnya jumlah panas yang menyebabkan kontak substrat dan enzim meningkat. Peningkatan temperatur meningkatkan kecepatan reaksi karena molekul atom memiliki energi lebih besar dan memiliki kecenderungan berpindah [16]. Hal ini menyebabkan interaksi enzim lipase dengan substrat minyak lebih sering terjadi. Pada suhu 40°C, terjadi penurunan aktivitas dari enzim lipase terimobilisasi. Hal ini menunjukkan gejala denaturasi struktur protein enzim dan perubahan konformasi karena temperatur yang terlalu tinggi [4].

Hasil karakterisasi suhu secara keseluruhan menunjukkan ada dua faktor yang mempengaruhi. Faktor pertama adalah struktur primer enzim. Tingginya kandungan asam amino dengan rantai samping hidrofobik pada molekul enzim dapat memberikan struktur enzim yang lebih padat, sehingga tidak mudah terdenaturasi oleh perubahan lingkungan seperti suhu [4]. Enzim lipase *C. rugosa* memiliki persentase asam amino rantai samping hidrofobik sebanyak 37,34% [17]. Rendahnya kadar hidrofobik ini membuat enzim rentan denaturasi, sehingga pada suhu di atas 35°C terjadi penurunan aktivitas. Faktor kedua adalah komponen matriks dan kation bivalen juga mampu menstabilkan protein enzim. Ca-bentonit berperan sebagai matriks yang mengadsorpsi enzim lipase serta menstabilkannya karena adanya kation seperti Ca. Pori *interlayer* dari Ca-bentonit membuat enzim lipase lebih tahan terhadap panas karena kalsium justru dapat menstabilkan enzim lipase *C. rugosa* [18].

Hasil Penentuan Konsentrasi Substrat yang Efisien pada Enzim Lipase Terimobilisasi Ca-Bentonit

Hasil pengukuran pada Gambar 3 menunjukkan konsentrasi substrat 1 gram substrat/ 10 ml campuran *buffer*-substrat memiliki nilai bilangan asam tertinggi. Konsentrasi substrat efisien ditentukan dari nilai bilangan asam setinggi mungkin pada jumlah substrat sebanyak mungkin. Sehingga konsentrasi substrat yang efisien adalah 3 gram substrat/ 10 ml campuran *buffer*-substrat. Hal ini disebabkan secara statistik (perhitungan metode *One-Way ANOVA Multiple Comparisons Tukey's Method*) konsentrasi 1, 2, dan 3 gram substrat/ 10 ml campuran *buffer*-substrat tidak berbeda signifikan. Hasil penelitian lain menunjukkan komposisi substrat minyak-*buffer* efisien lipase *C. rugosa* adalah 3 gram substrat dalam 6 ml *buffer* (perkiraaan volume totalnya ±10ml) [19].

Enzim lipase hanya aktif menghidrolisis substrat pada lapisan *interphase* minyak dan *buffer* [20]. Peningkatan jumlah *buffer* akan meningkatkan luas area *interphase*, sehingga meningkatkan persentase pengaktifan enzim. Namun, peningkatan jumlah *buffer* hingga dua kali lipat hanya dapat meningkatkan aktivitas enzim lipase dalam jumlah kecil [19]. Enzim lipase *C. rugosa* memiliki "penutup" yang terdiri dari *amphiphile* α -heliks untuk melindungi enzim pada saat berada dalam fase hidrofilik dan hanya bisa terbuka pada saat berada pada lapisan *interphase* antara minyak dan *buffer* [20]. Oleh karena itu, dengan semakin banyaknya luas area bagian *interphase* pada suatu campuran substrat-*buffer*, maka semakin banyak pula enzim lipase teraktivasi dan mendapatkan akses menuju sisi aktif enzim. Kondisi ini juga didukung oleh meningkatnya sifat hidrofobik pada permukaan daerah sisi aktif enzim ketika "penutup" enzim lipase terbuka [8], sehingga memudahkan interaksi substrat minyak yang bersifat hidrofobik ke sisi aktif enzimnya.



Gambar 3 Grafik Rata-rata Bilangan Asam Substrat Hasil Hidrolisis pada Penentuan Konsentrasi Substrat yang Efisien untuk Enzim Lipase Terimobilisasi

Hasil Aplikasi Enzim Lipase Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam pada Substrat Limbah Minyak Ikan

Tabel 1. Nilai Rata-rata Bilangan Asam dan Rata-rata Aktivitas Enzim Lipase Terimobilisasi pada Substrat Limbah Minyak Ikan dan *Olive Oil*

Variasi Substrat	Rata-Rata Bilangan Asam (mg KOH/g substrat)	Rata-rata Aktivitas Enzim (mg KOH/g substrat)
Limbah Minyak Ikan	20,757	13,745
<i>Olive Oil</i>	18,560	17,999

Keterangan :

Kontrol Bilangan Asam Substrat limbah minyak ikan = 7,013 mg KOH/g substrat limbah minyak ikan

Kontrol Bilangan Asam Substrat *olive oil* = 0,561 mg KOH/g substrat *olive oil*

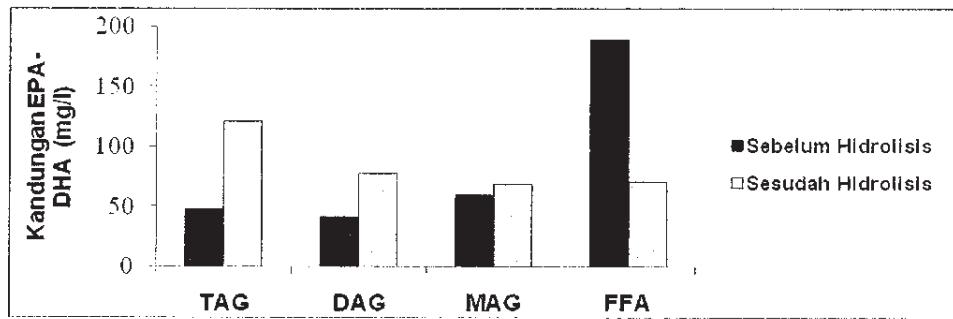
Rata-rata Aktivitas Enzim = Rata-rata Bilangan Asam : Kontrol Bilangan Asam

Hasil pengukuran rata-rata aktivitas enzim lipase pada Tabel 1 menunjukkan bahwa enzim lipase terimobilisasi Ca-bentonit dapat diaplikasikan pada limbah minyak ikan. Aktivitas enzim pada tahapan ini didefinisikan sebagai banyaknya mg KOH yang dibutuhkan untuk menetralkan asam lemak bebas hasil hidrolisis enzim terimobilisasi tiap gram substrat. Kedua substrat hasil hidrolisis ini tidak bisa dibandingkan aktivitasnya menggunakan bilangan asam, karena komposisi asam lemak pada kedua substrat tersebut berbeda sehingga berat molekul kedua substrat tersebut juga berbeda.

Secara teoritis, substrat *olive oil* seharusnya akan memberikan laju aktivitas enzim lipase yang lebih tinggi daripada limbah minyak ikan. Jenis substrat yang berbeda akan menghasilkan metabolisme oleh lipase dengan laju aktivitas yang berbeda [21]. Penyebab perbedaan aktivitas enzim lipase ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Kandungan bahan pengotor yang tinggi pada substrat limbah minyak ikan dapat menjadi salah satu faktor utama. Upaya *pre-treatment* yang dilakukan pada penelitian ini masih belum maksimal, sehingga masih banyak materi pengotor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Faktor lain yang menjadi penyebab penurunan aktivitas adalah perbedaan komposisi berbagai jenis asam lemak pada kedua substrat tersebut.

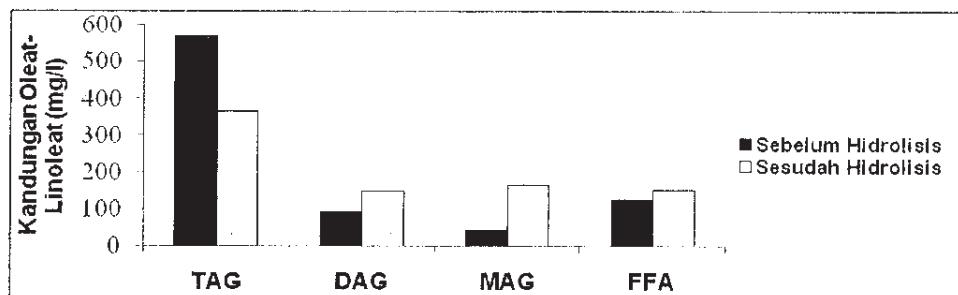
Hasil Gas Chromatography (GC)

Hasil pengukuran kandungan asam lemak *Eicosapentaenoate* (EPA)-*Docosahexaenoic acid* (DHA) menggunakan GC pada limbah minyak ikan (Gambar 4) menunjukkan kandungan EPA-DHA dalam fraksi *Triacylglyceride* (TAG), *Diacylglyceride* (DAG), dan *Monoacylglyceride* (MAG) pada limbah minyak ikan sesudah hidrolisis mengalami peningkatan. Kandungan EPA-DHA pada fraksi-fraksi gliserida sesudah hidrolisis ini secara keseluruhan meningkat sebesar 80,07%. Sebaliknya kandungan EPA-DHA fraksi *Free Fatty Acid* (FFA) sesudah hidrolisis mengalami penurunan sebesar 62,86%. Hal ini menunjukkan reaksi hidrolisis enzim lipase tidak berlangsung satu arah menghasilkan FFA saja, namun dua arah (*reversible*) membentuk gliserida-gliserida asam lemak tertentu. Enzim lipase tidak hanya mengkatalis hidrolisis TAG menjadi bentuk FFA, MAG, DAG, dan gliserol, namun secara reversibel juga membentuk gliserida dari gliserol dan FFA [22].



Gambar 4. Grafik Kandungan EPA-DHA pada TAG, DAG, MAG, dan FFA dari Limbah Minyak Ikan

Lipase *C. rugosa* terbukti memberikan *Hydrolysis Resistant Value* (HRV) tinggi terhadap *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) jenis EPA dan DHA [19]. HRV disini didefinisikan sebagai persentase asam lemak tertentu dalam bentuk gliseridanya. Hasil yang sama juga diperoleh dari hasil hidrolisis dalam *nile perch oil*, dimana lipase *C. rugosa* mampu meningkatkan kandungan EPA-DHA secara seimbang di gliserida [23]. Hal ini berarti peningkatan bilangan asam dari limbah minyak ikan sesudah hidrolisis yang terjadi pada penelitian ini disebabkan oleh pelepasan asam lemak golongan *Saturated Fatty Acid* (SFA) dan *Monounsaturated Fatty Acid* (MUFA). Sehingga lipase dari *C. rugosa* pada penelitian ini diindikasikan secara spesifik membuat asam lemak EPA-DHA yang terkandung dalam FFA limbah minyak ikan bereaksi secara reversibel membentuk gliserida baru.



Gambar 5. Grafik Kandungan Oleat-Linoleat pada TAG, DAG, MAG, dan FFA dari Olive Oil

Hasil pengukuran kandungan asam lemak oleat-linoleat menggunakan GC pada *olive oil* (Gambar 5) menunjukkan kandungan Oleat-Linoleat fraksi TAG *olive oil* sesudah hidrolisis mengalami penurunan sebesar 36,31%, sebaliknya kandungan Oleat-Linoleat fraksi DAG, MAG, dan FFA *olive oil* mengalami peningkatan masing-masing sebesar 61,77% ; 295,35% ; dan 20,78%. Hal ini menunjukkan reaksi hidrolisis enzim lipase pada *olive oil* cenderung memotong gliserida-gliserida menghasilkan asam lemak bebas. Akan tetapi peningkatan kandungan Oleat-Linoleat dalam fraksi FFA lebih sedikit daripada peningkatan kandungan Oleat-Linoleat dalam fraksi DAG dan MAG. Hal ini menunjukkan bahwa selain reaksi hidrolisis, diduga juga terjadi reaksi sintesis ester. Enzim lipase *C. rugosa* menghidrolisis gliserida-gliserida yang asam lemaknya bukan EPA dan DHA seperti asam oleat [19,23]. Enzim lipase *C. rugosa* memiliki pola HRV asam oleat yang berbeda dengan HRV EPA dan DHA. Lipase *C. rugosa* memiliki trend penurunan HRV asam oleat yang signifikan sejalan dengan meningkatnya derajat hidrolisis [19]. Enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi Ca-bentonit dalam penelitian ini diindikasikan memiliki aktivitas hidrolisis yang cenderung untuk memotong asam oleat dan linoleat dalam bentuk gliserida pada *olive oil*. Namun enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi mengalami reaksi sintesis ester EPA dan DHA dari bentuk FFA ke bentuk gliserida pada limbah minyak ikan.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Hasil karakterisasi pH menunjukkan pH terbaik enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi Ca-bentonit adalah pH 6,5. Sedangkan suhu terbaiknya adalah suhu 35°C. Konsentrasi substrat paling efisien enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi Ca-bentonit adalah 3 gram substrat/ 10 ml campuran buffer-substrat. Enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi Ca-bentonit dapat digunakan untuk menghidrolisis substrat limbah minyak ikan dengan rata-rata aktivitas 13,745 mg KOH/ g substrat. Selain itu enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi dapat meningkatkan kadar EPA-DHA dalam bentuk gliserida sebesar 80,07%.

Saran

Diperlukan karakterisasi pH lanjutan pada pH di bawah pH 6,5 agar dapat diketahui titik puncak pH optimum aktivitas enzim lipase *C. rugosa* terimobilisasi. Optimasi metode *pre-treatment* limbah minyak ikan perlu dilakukan agar mendukung aktivitas enzim lipase terimobilisasi. Penelitian lebih lanjut mengenai spesifikasi enzim lipase *C. rugosa* menggunakan *gas chromatography* (GC) juga perlu dilakukan.

Daftar Pustaka

1. Setiyyono & Yudo, S. 2008. *Potensi Pencemaran dari Limbah Cair Industri Pengolahan Ikan di Kecamatan Muncar, Kabupaten Banyuwangi*. Peneliti di Pusat Teknologi Lingkungan, BPPT.
2. Setha, B. 1997. Isolasi Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Minyak Hasil Penepungan Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru Blkr*): Pengaruh Rasio Urea/Minyak dan Lama Kristalisasi. Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Universitas Pattimura.
3. Lorente, G.F., Betancor, L., Carrascosa, A.V., & Guisan, J.M. 2011. *Release of Omega-3 Fatty Acids by the Hydrolysis of Fish Oil Catalyzed by Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports*. J Am Oil Chem Soc 88:1173–1178
4. Öztürk, B. 2001. *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey
5. Yesiloglu, Y. 2004. *Utilization of Bentonite as a Support Material for Immobilization of Candida rugosa lipase*. Department of Chemistry, Trakya University, Edirne 22030, Turkey.
6. Setiawan, B. 1997. *Bentonit: Lempung Penyelamat Lingkungan*. Pusat Teknologi Pengolahan Limbah Radioaktif, BATAN.
7. Sukandarrumidi. 1999. *Bahan Galian Industri*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
8. Petersen, M.T.N., Fojan, P., & Petersen, S.B. 2001. *How Do Lipases and Esterases Work: the Electrostatic Contribution*. Journal of biotechnology, 85(2):115-147
9. Dulekgurgen, E. 2004. *Proteins (Lowry) Protocol*. UIUC
10. Lubrizol. 2006. *Acid ValueTest Procedure AATM 109-01*. Lubrizol Advanced Materials, Inc

11. Rickers-Haunerland, J. 2008. *BISC 429: Experimental Techniques II Separation Methods*. Simon Fraser University, Canada
12. SUPELCO. 1998. *BF₃-Methanol Product Specification*. Sigma-Aldrich Co.
13. Montero S., Blanco, A., Virtó M., Ladentia L.C., Agud I., Solozabal R., Lascaray J.M., Renobales, M., Llama, M.J., & Serra J.L. 1993. *Immobilization of Candida rugosa lipase and some properties of the immobilized enzyme*. Enzyme and microbial technology, 15:239-247.
14. Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., & Sedaghat, M.E. 2009. *Enzyme Immobilization Part 1. Modified Bentonite as a New and Efficient Support for Immobilization of Candida rugosa lipase*. Applied Clay Science 43:289-295
15. Akova, A. & Üstün, G. 2000. *Activiy and Adsorpyion of Lipase from Nigella sativa Seeds on Celite at Different pH Values*. Biotechnology Letters, 22, 355-359.
16. Lee, J.M. 1992. *Biochemical Engineering*. New Jersey: Prentice Hall Inc.
17. Fadoloğlu, S. 1996. *Kinetics of Olive Oil Hydrolysis by Free and Immobilised Candida rugosa Lipase*. Ph.D. Thesis, University of Gaziantep.
18. Akoh, C.C. & Min, D.B. 1998. *Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification in Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Marcel Decer, Inc, New York, p. 641-698.
19. Kahveci, D., Falkeborg, M., Gregersen, S., & Xu, X. 2010. *Upgrading of Farmed Salmon Oil Throught Lipase-Catalyzed Hydrolysis*. Department of Molecular Biology, Aarhus University, Gustav Wieds Vej 10, 8000 Aarhus C, Denmark.
20. Kahlow, U. 2002. *A Model of the Pressure Dependence of the Enantioselectivity of Candida rugosa Lipase towards (R)-Menthol*. INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
21. Botham, K.M., Avella, M., Cantafora, A., & Bravo, E. 1997. *The Lipolysis of Chylomicrons Derived from Different Dietary Fats by Lipoprotein Lipase In Vitro*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Lipids and Lipid Metabolism. Volume 1349, Issue 3, Pages 257-263.
22. Macrae, A.R. & Hammond, R.C. 1985. *Present and Future Applications of Lipases*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews – Vol. 3. Unilever Research, Colworth Laboratory, Sharnbrook, Bedfordshire, MK441LQ, UK.
23. Mbatia, B.N. 2011. *Valorisation of Fish Waste Biomass through Recovery of Nutritional Lipids and Biogas*. Department of Biotechnology, Doctoral Thesis, Department of Biotechnology, Lund University, Sweden.