

# Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Lipase Bakteri Hasil Skrining dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Gunung Tugel Banyumas

Zusfahair<sup>\*)</sup>, Tien Setyaningtyas, Amin Fatoni

Program Studi Kimia, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam, FST,  
Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto  
Jl. Dr Soeparno 62, Karangwangkal, Purwokerto Jawa Tengah 53123

Diterima 07-11-2008

Disetujui 23-03-2009

## ABSTRACT

A bacterial lipase producer was isolated from garbage dump soil and was identified its genus. Lipase was extracted according to production time optimized, purified using ammonium sulfate fractionation and gel chromatograph. Determination of enzyme characteristic studied were influence of pH, temperature, various metals to lipase activity. The result of this research shows that the genus of isolated bacteria which produced lipase was *Acinetobacter* sp., the lipase optimum production time is about 18 hours with the activity is about 115 unit/mL. The highest activity of lipase fractionation using ammonium sulfate is about 45% and the highest activity of purifying with filtration gel chromatograph column using Sephadex G-150 at 24<sup>th</sup> fraction. Lipase from crude extract and purifying product at this fraction has optimum pH 6 and optimum temperature is about 40°C. Lipase to be classified as metalloenzyme that shows with decreasing the activity after added the EDTA. Metals ion, such as Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> were inhibited the lipase activity. Ca<sup>2+</sup> ion could increase lipase crude extract activity but inhibited the activity of lipase purifying product. Hg<sup>2+</sup> ion could increase the activity of lipase purifying product.

**Keywords:** *Acinetobacter* sp, garbage dismissal place's soil, lipase

## PENDAHULUAN

Lipase merupakan biokatalisator yang mempunyai kemampuan mengkatalisis reaksi hidrolisis lipid menjadi asam lemak dan gliserol. Oleh karena kemampuannya dalam menghidrolisis lipid, lipase dapat dimanfaatkan sebagai aditif dalam industri detergen. Lipase yang digunakan dalam industri detergen mempunyai sifat seperti rentang pH antara 8-10,5, serta tetap aktif pada suhu 30°C-60°C.

Sharma *et al.*, (2001) melaporkan bahwa total pasokan enzim di dunia masih didominasi oleh negara Eropa. Hal tersebut mendorong upaya untuk mengisolasi dan memurnikan lipase. Lipase telah diisolasi dari hewan, tanaman dan mikroorganisme. Mikroorganisme penghasil lipase ditemukan dalam bermacam-macam habitat seperti limbah industri, pabrik pengolahan minyak sayur, perusahaan susu, tanah yang terkontaminasi dengan minyak, makanan yang membusuk, timbunan kompos (Sharma *et al.*, 2001). Kojima dan Shimizu (2003) berhasil memurnikan lipase yang diisolasi dari bermacam-macam tanah

seperti tanah sawah, kebun sayur dan hutan. Pemurnian dilakukan menggunakan fraksinasi fenil-toyoppearl, kromatografi DEAE-sepharosa dan kromatografi superdex-200HR. Enzim yang diperoleh mempunyai aktivitas spesifik 9854 U/mg dengan tingkat kemurnian 24,3 kali ekstrak kasar.

Tempat Pembuangan Akhir (TPA) limbah rumah tangga dan industri kecil diduga mengandung bakteri penghasil lipase, karena merupakan tempat penimbunan bermacam-macam sampah, seperti makanan yang membusuk dan limbah rumah tangga yang mengandung minyak. Sampah-sampah tersebut kemungkinan juga telah membentuk kompos. Oleh karena itu tanah TPA berpotensi mengandung bakteri penghasil lipase. Penelitian ini mempunyai tujuan mendapatkan isolat bakteri yang dapat menghasilkan lipase dari tanah TPA, dan menganalisis karakteristik enzim lipase yang dihasilkan.

## METODE PENELITIAN

**Alat dan Bahan.** Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas yang umum digunakan pada Laboratorium Kimia. Bahan yang digunakan: NaCl,

---

\*Telp: -  
Email: -

medium NB (peptone from meat 5 g, yeast ekstrak 3 g/l), minyak olive, ammonium sulfat, sephadex G-150, selophan, tributirin agar (komposisi per liter : pepton daging 2,5 g, pepton kasein 2,5 g, ekstrak ragi 3 gr, agar 12 g dan tributirin 10 ml), buffer tris-HCl, buffer natrium asetat-HCl, buffer natrium fosfat, NaOH, polivinil alkohol, aseton, etanol,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , EDTA,  $\text{HgCl}_2$ ,

**Prosedur Kerja.** Penelitian ini akan dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

**Isolasi Mikroorganisme Penghasil Lipase.** Mikroorganisme diisolasi dari sampel tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Gunung Tugel Banyumas. Skrining mikroorganisme penghasil lipase menggunakan cawan petri yang berisi medium tributirin agar. Kultur diinkubasi pada  $37^\circ\text{C}$  selama 2 hari. Koloni penghasil lipase yang memperlihatkan zona bening diukur indeks lipolitiknya. Indeks lipolitik dinyatakan sebagai nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Isolat yang memiliki indeks lipolitik terbesar dinamakan isolat potensial penghasil lipase (Gupta *et al.*, 2003).

**Identifikasi isolat penghasil lipase yang potensial.** Uji biokimia dan uji morfologi (pengamatan sel) dilakukan untuk identifikasi bakteri. Uji biokimia meliputi uji katalase, uji oksidase, dan uji reduksi nitrat. Bakteri ditumbuhkan dalam medium tumbuh untuk mengetahui jenis bakteri tersebut. Bakteri selanjutnya diidentifikasi melalui serangkaian uji biokimiawi dan uji morfologi. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman Purwokerto.

**Produksi Lipase.** Isolat potensial diinokulasi ke dalam 10 ml medium inokulum (medium NB), diinkubasi selama 2 hari dengan pengocokan 300 rpm pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Medium NB sebanyak 50 ml diinkubasi selama 5 menit, kemudian ditambah inokulum bakteri 0,5 ml dan minyak olive sebagai inducer 0,5 ml. Medium produksi diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  sambil digoyang dengan kecepatan 300 rpm selama 6, 12, 18, 24, 30 dan 36 jam dan diamati aktivitas lipase yang dihasilkan isolat bakteri pada interval waktu tersebut.

**Ekstraksi Lipase.** Medium produksi yang telah diinkubasi diekstraksi dengan menggunakan sentrifus pada kecepatan 10.000 g selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh disebut ekstrak enzim kasar. Enzim enzim kasar diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Ekstrak enzim kasar yang mempunyai aktivitas tertinggi dilakukan fraksinasi.

**Fraksinasi Lipase.** Fraksinasi dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat secara bertahap pada 15, 30, 45 dan 60% jenuh. Caranya sebagai berikut: amonium sulfat sebanyak 15% dimasukkan secara perlahan ke dalam gelas piala yang berisi ekstrak lipase sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai terbentuk endapan. Ekstrak kasar lipase kemudian disentrifus pada 10.000 g selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dinamakan F1. F1 dilarutkan dalam NaCl 1% dan disimpan pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Supernatan hasil fraksinasi pertama ditambah ammonium sulfat sebanyak 30%, selanjutnya dilakukan prosedur yang sama sehingga diperoleh F2. Prosedur yang sama dilakukan untuk menghasilkan fraksi ammonium sulfat 45% (F3) dan 60% (F4). Seluruh fraksi yang dihasilkan didialisis menggunakan selophan (Saxena *et al.*, 2003). Fraksi hasil dialisis dinamakan FHD1 (fraksi 15%), FHD2 (fraksi 30%), FHD3 (fraksi 45%) dan FHD4 (fraksi 60%). Seluruh fraksi diuji aktivitas, kadar protein, aktivitas spesifik, tingkat kemurniannya.

**Kromatografi Kolom Filtrasi Gel.** Fraksi endapan amonim sulfat yang memiliki unit aktivitas yang paling tinggi dilanjutkan pemurniannya dengan metode filtrasi gel sephadex G-150. Langkah langkahnya adalah sebagai berikut (Subardjo *et al.*, 1997).

Pembuatan kolom sephadex G150. Tepung sephadex G150 sebanyak 7 g dikembangkan dengan 400 ml akuades dan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Suspensi ini dibiarkan sampai mengendap. Gel yang mengapung dibuang, sedangkan gel yang mengendap dijaga agar tetap terendam dalam akuades. Gelembung-gelembung udara yang terdapat di dalam partikel-partikel gel dikeluarkan dengan cara mengurangi tekanan udara diatas permukaan suspensi menggunakan pompa vakum. Gel kemudian direndam dalam buffer tris HCl pH 7,2. Kelebihan buffer di atas gel yang mengendap disisakan lebih kurang 1 cm. Gel diaduk perlahan-lahan dan dimasukan lewat batang pengaduk ke dalam kolom gelas dengan panjang 30 cm dan diameter 2,5 cm dan buffer tris HCl pH 7,2 setinggi 5 cm. Gel dibiarkan mengendap semuanya.

Pemurnian Lipase dengan Kolom Sephadex G-150. Sebanyak 5 ml fraksi hasil dianalisis dengan aktivitas tertinggi dimasukkan ke dalam kolom dengan

hati-hati agar gel tidak rusak. Kolom dihubungkan dengan sumber eluen lewat pipa plastik. Kolom Sephadex G-150 yang terjadi dielusi dengan buffer pengembangannya dengan kecepatan tetesan 6 menit per tetes. Kran kolom kaca dibuka, eluat ditampung dalam botol ampul sebanyak 100 buah. Semua eluat ditentukan aktivitas, aktivitas spesifik dan kadar proteinnya. Fraksi yang mempunyai aktivitas paling tinggi selanjutnya ditentukan tingkat kemurnian dan beberapa karakteristiknya meliputi pH optimum, suhu optimum, pengaruh beberapa logam berat.

**Pengukuran Aktivitas Lipase.** Aktivitas lipase diukur dengan medium emulsi minyak olive. Campuran reaksi mengandung 2,5 mL emulsi 2 : 1 : 1 = gum arab : Bufer fosfat 0,2M (pH 8) : minyak olive), ditambah 0,2 mL larutan enzim, diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2,5 ml aseton/etanol 1/1 (v/v). Asam lemak yang dibebaskan dititrasi dengan 0,05 N NaOH menggunakan phenoptalin (pp) sebagai indikator. Pengukuran 1 unit enzim (U) adalah jumlah yang menyebabkan perubahan 1  $\mu$ mol substrat (minyak olive) permenit pada keadaan pengukuran optimum (Kojima & Shimizu, 2003).

**Penentuan Kadar Protein.** Sebanyak 0,5 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 5 ml pereaksi C. Larutan-larutan tersebut dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambah Follin Ciocalteu sebanyak 0,5 ml, dikocok dan dibiarkan selama 30 menit. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang 750 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama, dengan sampelnya akuades. Standar protein dibuat dengan memasukkan 0,5 ml kasein *Hamerstein* dalam bufer Tris-HCl ke dalam 6 buah tabung reaksi dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 mg per ml, selanjutnya perlakuan sama seperti sampel (Lowry 1964 dalam Bollag *et al.*, 1996).

**Karakterisasi Enzim.** Karakterisasi enzim meliputi pH optimum, suhu optimum dan penentuan pengaruh beberapa logam berat terhadap aktivitas lipase

**Penentuan pH Optimum.** Posedur kerja penentuan pH optimum sama seperti pada uji aktivitas, tetapi dengan variasi pH. Variasi pH yang dilakukan adalah 5, 6, 7, 8, dan 9. Nilai pH optimum merupakan pH pada saat enzim mempunyai aktivitas tertinggi. Uji aktivitas untuk pH 5 digunakan 100 mM buffer natrium asetat- HCl, untuk pH 6-7 digunakan 100 mM buffer natrium fosfat, sedangkan untuk pH 8, dan 9 digunakan buffer tris HCl.

**Penentuan Suhu Optimum.** Penentuan suhu optimum dilakukan seperti uji aktivitas dengan variasi suhu 30, 40, 50, 60 ,70, 80, dan 90°C . Pengujian dilakukan pada pH optimum yang telah diperoleh dari tahap sebelumnya.

**Pengaruh EDTA dan Logam terhadap Aktivitas Lipase.** Penentuan pengaruh penambahan EDTA dan ion logam ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ) ditentukan dengan menambahkan EDTA dan ion-ion logam masing-masing dengan konsentrasi  $10^{-2}$  M sebanyak 0,06 ml ke dalam larutan sampel sehingga konsentrasi akhir larutan pada saat uji aktivitas dilakukan adalah  $10^{-3}$  M. Sebagai pembanding aktivitas dilakukan uji pada sampel enzim tanpa penambahan EDTA dan ion-ion logam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lipase dari Tanah TPA.** Sampel tanah diambil dari (TPA) Gunung Tugel, Purwokerto Selatan, Banyumas. Bakteri ditumbuhkan pada medium tributirin agar, dan koloni terpilih untuk produksi lipase adalah koloni dengan zona jernih terbesar, yang menunjukkan lebih banyak trigliserida dari medium dihidrolisis enzim lipase bakteri tersebut. Isolat yang mempunyai zona jernih terbesar, selanjutnya diidentifikasi jenis bakterinya dan digunakan untuk memproduksi enzim lipase. Hasil identifikasi koloni bakteri penghasil lipase yang terpilih untuk produksi terlihat dalam Tabel 1.

**Penentuan Waktu Produksi Optimum.** Waktu produksi optimum ditentukan dengan mengisolasi enzim yang dihasilkan dalam rentang waktu inkubasi

Tabel 1. Hasil identifikasi bakteri tanah TPA Gunung Tugel penghasil lipase

Morfologi koloni	Bentuk sel	Gram	Uji katalase	Uji oksidase	Uji reduksi nitrat	Asam dari karbohidrat	Pendugaan jenis M.O
Tumbuh di <i>Nutrient Agar</i> dengan ciri koloni : koloni kecil, bentuk teratur tepi berlekuk, ukuran kecil, warna jernih, permukaan mengkilap, elevasi cembung rendah	Coccus	(-)	(+)	(-)	(-)	Glucose (+) Fructose(+)	<i>Acinetobacter</i> , sp.

0-30 jam, dan diamati tiap 6 jam selama 18 jam. Aktivitas lipase yang dihasilkan isolat bakteri dibuat kurva terhadap waktu produksi (Gambar 1).

**Fraksinasi lipase dengan amonium sulfat.**

Fraksinasi dengan amonium sulfat merupakan salah satu cara pemurnian protein melalui proses pengendapan garam. Pada proses ini protein dipisahkan dari komponen nonprotein yang terdapat di dalam larutannya. Penambahan garam amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadinya kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out*. Fraksinasi amonium sulfat dilakukan dengan tingkat kejenuhan 15%, 30%, 45% dan 60% jenuh. Hasil pemurnian lipase dari *Acinetobacter* sp. terlihat dalam Tabel 2. Data ini menunjukkan fraksi 45% mempunyai aktivitas spesifik tertinggi yaitu 442,396 U/mg dan tingkat kemurnian 6,28 kali ekstrak kasarnya, sehingga fraksi 45% dimurnikan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom gel filtrasi.

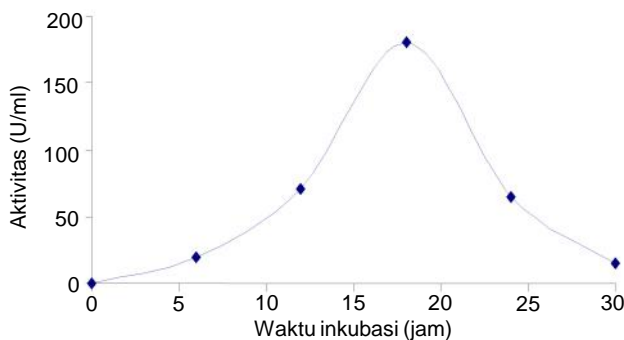
**Pemurnian Lipase Menggunakan Kromatografi Kolom Gel Filtrasi.** Fraksi 45% amonium sulfat dengan kemurnian tertinggi dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan kromatografi kolom filtrasi gel. Pemisahan protein enzim pada metode ini didasarkan atas perbedaan ukuran molekul protein melalui sebuah kolom yang dinamakan sephadex. Sephadex terbuat dari protein berhidrat tinggi dengan

pori-pori yang sangat halus. Molekul protein yang kecil dapat menembus pori-pori dan tertahan selama aliran ke bawah kolom. Molekul protein yang lebih besar akan terelusi lebih dahulu oleh pelarutnya disusul molekul yang lebih kecil, sehingga dapat terjadi pemisahan fraksi berdasarkan ukuran molekul. Kecepatan aliran molekul protein tergantung dari kemampuannya memasuki pori-pori (Blaber, 1998).

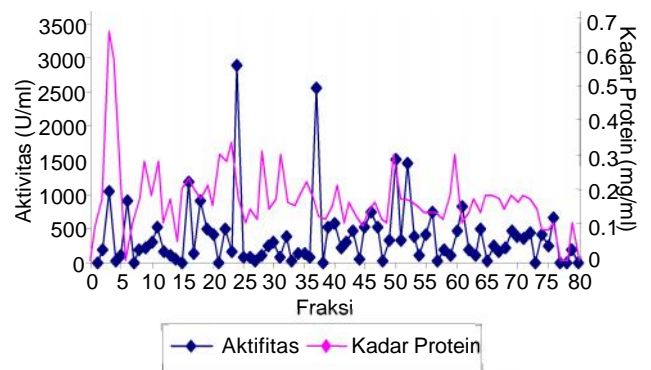
Kolom kromatografi yang digunakan adalah *sephadex* G-150 dengan eluen buffer Tris-HCl pH 7,2. Hasil fraksinasi terlihat pada Gambar 2, yang mempunyai dua fraksi dengan aktivitas lipase tinggi, yaitu fraksi 24 dengan aktivitas 2880 U/ml dan fraksi 37 dengan aktivitas 2560 U/ml. Fraksi 24 selanjutnya dilakukan karakterisasi.

**Karakterisasi Lipase. Penentuan pH dan suhu optimum.** Hasil penentuan pH optimum ekstrak kasar dan hasil pemurnian lipase terlihat dalam Gambar 3. Pada grafik tersebut terlihat pH optimum lipase pada pH 6,0. Secara umum, lipase bakteri mempunyai pH optimum netral dan alkali, dengan pengecualian lipase dari *P. fluorescens* mempunyai pH optimum 4,8 (Gupta *et al.*, 2004). Lipase yang dihasilkan dalam penelitian ini termasuk lipase bakteri pada umumnya dengan pH optimum mendekati netral.

Suhu optimum ekstrak kasar dan hasil pemurnian lipase pada penelitian ini ditentukan dalam jangkauan



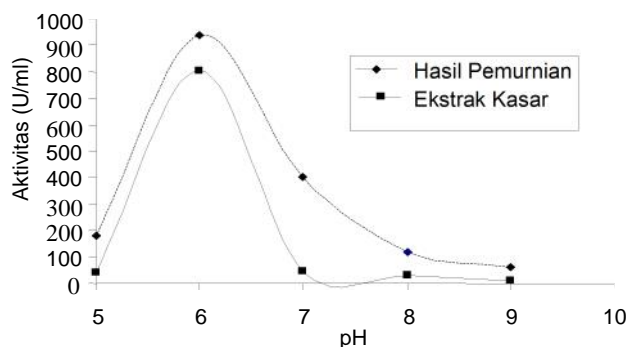
Gambar 1. Aktivitas lipase terhadap waktu produksi



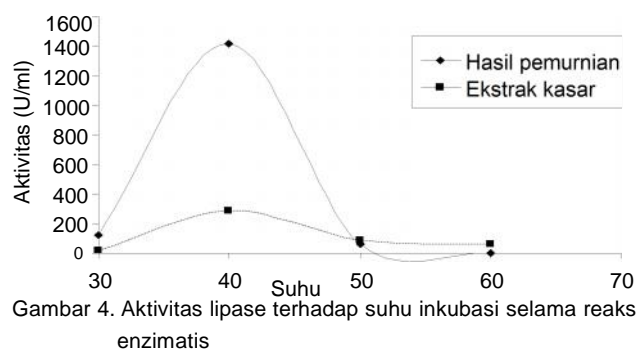
Gambar 2. Aktivitas dan kadar protein lipase fraksi-fraksi hasil pemurnian dengan filtrasi gel

Tabel 2. Hasil pemurnian protease dengan fraksinasi amonium sulfat

Tahap pemurnian	Volume sample (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Aktivitas (U/ml)	Total Aktivitas	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian
Ekstrak kasar	25	1,632	40,800	115	2875	70,469	1
FS-15%	23	1,296	29,808	500	11500	385,800	5,47
FS-30%	26,5	1,252	33,178	500	13250	399,255	5,67
FS-45%	24,5	0,633	15,509	280	6860	442,396	6,28
FS-60%	25	0,724	18,100	100	2500	138,076	1,96



Gambar 3. Aktivitas lipase terhadap pH medium reaksi enzimatik



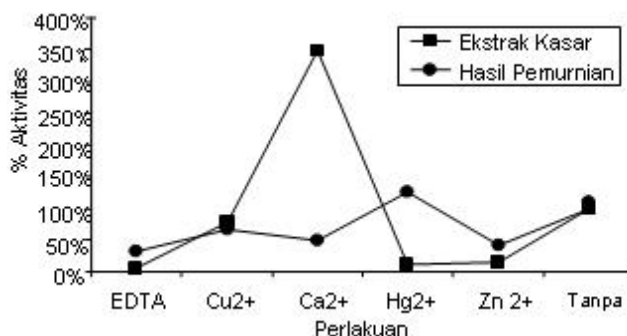
Gambar 4. Aktivitas lipase terhadap suhu inkubasi selama reaksi enzimatik

suhu 30°C sampai 60°C. Hasil penentuan suhu optimum terlihat dalam Gambar 4. Lipase bakteri pada umumnya mempunyai suhu optimum dalam jangkauan 30-60°C. Meskipun demikian ada beberapa lipase yang suhu optimumnya di atas atau di bawah jangkauan suhu tersebut. Lipase yang tetap stabil pada suhu tinggi ditemukan pada spesies bakteri *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, dan *Staphylococcus*. Lipase yang dihasilkan *Bacillus* sp. tetap stabil pada suhu 70°C selama 150 menit (Gupta et al., 2004). Lipase yang dihasilkan dalam penelitian ini mempunyai kinetika suhu seperti lipase bakteri pada umumnya, yaitu suhu optimum 40°C.

#### Pengaruh EDTA dan berbagai Ion Logam.

Beberapa enzim termasuk lipase tertentu aktivitasnya dipengaruhi oleh logam, hal ini disebabkan yang logam tersebut merupakan kofaktor lipase, sehingga meningkatkan aktivitas, sedangkan beberapa logam tertentu dapat menurunkan aktivitas yang mempengaruhi stabilitas konformasi. EDTA merupakan senyawa pengkelat logam, apabila enzim lipase dalam penelitian ini membutuhkan kofaktor logam, maka ketika ditambahkan EDTA aktivitasnya akan menurun, karena kofaktornya terkelat oleh EDTA tersebut.

Kofaktor secara umum tidak diperlukan untuk aktivitas lipase, tetapi kation divalen seperti kalsium kadang merangsang aktivitas enzim (Gupta et al.,



Gambar 5. Pengaruh EDTA dan logam pada aktivitas lipase

2004). Kalsium merangsang lipase dari *B. subtilis* 168, *B. thermoleovorans* ID1, *P. aeruginosa* EF2, *S. aureus* 226, *S. hyicus*, *C. viscosum* dan *Acinetobacter* sp. RAG-1, sedangkan lipase dari *P. aeruginosa* 10145 justru dihambat oleh ion kalsium. Aktivitas lipase secara umum dihambat oleh logam berat seperti Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> dan Sn<sup>2+</sup>, serta sedikit dihambat oleh Zn<sup>2+</sup> dan Mg<sup>2+</sup> (Gupta et al., 2004). Hasil penelitian pengaruh penambahan EDTA dan berbagai logam terlihat Gambar 5. Gambar tersebut menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang dihasilkan dalam percobaan ini secara umum dihambat EDTA dan beberapa logam yang digunakan, namun ada perbedaan yaitu aktivitas ekstrak kasar meningkat dengan adanya ion Ca<sup>2+</sup>, sedangkan lipase hasil pemurnian aktivitasnya meningkat dengan adanya ion Hg<sup>2+</sup>.

## KESIMPULAN

Salah satu species bakteri dari tanah TPA Gunung Tugel Kabupaten Banyumas yang dapat menghasilkan lipase ekstra seluler teridentifikasi sebagai *Acinetobacter*, sp.

Aktivitas spesifik tertinggi hasil pemurnian lipase diperoleh pada hasil fraksi amonium sulfat 45% (FS-45%) sebesar 442,4 U/mg protein dengan tingkat kemurnian 6,28 kali ekstrak kasar. Pemurnian filtrasi gel dengan *sephadex* G-150, kemurnian tertinggi pada fraksi 24 dengan aktivitas 2880 U/ml, dan aktivitas spesifik 8195,8 U/mg protein. Lipase yang dihasilkan mempunyai pH optimum 6, dan suhu optimum 40°C.

Aktivitas lipase ini dihambat oleh EDTA dan beberapa ion logam seperti Cu<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup>. Ion Ca<sup>2+</sup> meningkatkan aktivitas ekstrak kasar lipase, tetapi menghambat aktivitas lipase hasil pemurnian. Ion Hg<sup>2+</sup> meningkatkan aktivitas lipase hasil pemurnian, tetapi menghambat aktivitas ekstrak kasar lipase.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas bantuan dana untuk penelitian ini melalui Program Penelitian Dosen Muda tahun 2006.

## DAFTAR PUSTAKA

- Blaber, M.** 1998. Protein Purification: Column Chromatography-Ion Exchange, Dialysis and Concentration. In *Molecular Biology and Biotechnology*. <http://wine1.sb.fsu.edu/bch5425/lect30/htm>. (7 June 2004).
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. & Edelstein, S.I.** 1996. *Protein Methods 2<sup>nd</sup> Ed.* New York: John Willey dan Sons.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P.** 2004. Bacterial lipases: an Overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **64**: 763-781.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N. & Bradoo, S.** 2003. Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 63-67.
- Kojima Y. & Shimizu, S.** 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal Bioscience and Bioengineering.* **96**: 219-226.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W.S.** 2003. Purification strategies for microbial lipases. *J. Microb Meth.* **52**: 1-18.
- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C.** 2001. Productin, purification, characterization and applications of lipases. *Biotech Adv.* **19**:627-662.
- Subardjo, B., Maryanto, J. Kartini, Suyata, Hartiwi, D. & Kusumaharti, I.A.** 1997. Pengembangan potensi bakteri bongkrek *Pseudomonas cocovenenans* X-128 untuk produksi gliserol, asam lemak dan lipase. *J. Agrin.* **1**: 1-4.