

KAJIAN HIDROLISIS ENZIMATIS MINYAK SAWIT SECARA IN SITU¹⁾

(Study of In Situ Palm Oil Enzymatic Hydrolysis)

Dewi Fortuna Ayu Rawi, Purwiyatno Hariyadi²⁾, dan Slamet Budijanto²⁾

ABSTRACT

In situ enzymatic hydrolysis was studied in the fresh dan bruised palm fruit mesocarp. These fruits were stored for 5 and 30 days in a room temperature. Hydrolysis yields contained mono- and diacylglycerols in the crude palm oil were analyzed by HPLC-ELSD. The result showed that lipase in situ can hydrolyze not only triacylglycerols (TAG) but also diacylglycerols (DAG) and monoacylglycerols (MAG). The reaction increased by adding water in to the pulp palm fruit mesocarp, but the activity is very low. However, lipase in situ preferred hydrolyzed TAG acyl chain number 2 than number 1 and 3. It was proved by the highest concentration of 1,3-DAG and specific position analysis of oil hydrolysis by using 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP) and GC-FID. The analysis showed that mol ratio of palmitic and oleic acid was 1 mmol : 1.38 mmol. PSI (positional specificity index) showed value 47.09.

Key words: lipase in situ, monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol, positional specificity index

PENDAHULUAN

Kelapa sawit dan hasil olahannya berupa minyak sawit (CPO) dan minyak inti sawit (PKO) merupakan komoditi penting ekspor nonmigas Indonesia. Masalah utama di lapangan yang sering dialami oleh industri minyak sawit adalah tingginya asam lemak bebas (ALB) di dalam tandan buah segar (TBS) kelapa sawit. Keterbatasan sarana transportasi dan infrastruktur jalur darat sehingga waktu transportasi yang lama dari perkebunan mencapai pabrik (melebihi 8 jam), serta terjadinya luka atau memar selama proses penanganan dan pengolahan mengakibatkan penolakan TBS untuk diolah menjadi minyak kelapa sawit karena kandungan ALB yang telah melampaui 5% hasil hidrolisis lipase *in situ*. Kondisi ini juga diperparah dengan adanya kapang penghasil lipase yang mengkontaminasi minyak sawit pada kondisi lokal penyimpanan. Terjadinya reaksi hidrolisis secara *in situ* di dalam buah sawit mengindikasikan adanya kandungan mono- dan diasilgliserol bersamaan dengan menghasilkan asam lemak bebas sebagai hasil antara reaksi hidrolisis.

Monogliserida atau monoasilgliserol (MAG) merupakan emulsifier pangan yang paling banyak digunakan, sekitar 75% dari pemakaian dunia (Belitz dan Grosch, 1999). Aplikasi menarik lain dari MAG adalah sebagai pasta gigi, produk rambut dan kulit, enkapsulasi flavor, dan pelindung kelembaban produk seperti untuk coating daging, buah atau kacang, dan suplemen nutrisi kesehatan MAG yang mengandung *eicosapentaenoic acid (EPA)* dan *docosapentaenoic acid (DHA)* (Elizabeth dan Boyle, 1997). Minyak goreng kaya

¹⁾ Bagian dari penelitian tesis penulis pertama, Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana IPB

²⁾ Berturut-turut Ketua dan Anggota Pembimbing

DAG dapat memberikan efek positif bagi kesehatan jika dibandingkan dengan trigliserida konvensional (Yasunaga *et al.*, 2001; Sek *et al.*, 2002).

Menurut sistem IUB (*International Union of Biochemistry*), lipase diklasifikasikan sebagai enzim hidrolase, kelompok enzim esterase dengan nama sistematik gliserol ester hidrolase (EC 3.1.1.3) yang mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas (ALB), gliserida parsial (monoasilgliserol dan diasilgliserol) dan gliserol (Macrae, 1983). Menurut Rehm dan Reed (1995), enzim lipase dapat terbagi menjadi beberapa jenis berdasarkan spesifitasnya. Lipase non-spesifik akan menghidrolisis triasilgliserol pada ketiga posisi ikatan ester sehingga membentuk asam lemak dan gliserol. Lipase spesifik akan menghidrolisis ester pada posisi 1,3 atau hanya pada posisi 2 sehingga hasil yang akan terbentuk adalah asam lemak dengan monoasilgliserol atau diasilgliserol.

Adanya kandungan mono- dan diasilgliserol di dalam buah sawit yang telah turun mutu dapat memberikan nilai tambah bagi industri minyak sawit. Akan tetapi, bagaimana proses reaksi hidrolisis yang terjadi dalam buah sawit itu sendiri masih merupakan tanda tanya. Penelitian ini bertujuan mengkaji karakteristik, aktivitas, dan spesifitas reaksi hidrolisis enzimatis minyak dalam buah sawit yang terjadi secara *in situ*.

Sintesis M-DAG melalui proses hidrolisis lipase *in situ* buah sawit dengan optimasi penyimpanan TBS pernah dilakukan oleh Yunanti (2001) dan Puspitasari (2001). Hasil penelitian ini setelah difraksinasi secara kualitatif menunjukkan hasil terbaik pada penyimpanan selama 3 hari kondisi kamar dengan kandungan MAG sebesar 6.21%, DAG 13.47%, ALB 6.11% dan TAG 84.70%. Persentase MAG dan DAG tertinggi dihasilkan oleh TBS fraksi 2-5.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah TBS fraksi kematangan 4 yang diperoleh dari PTPN VIII kebun Cisalak Baru, Banten, dan Kebun Percobaan Cikabayan, Darmaga. Bahan-bahan kimia yang diperlukan antara lain standar MAG, standar DAG spesifik 1,3 dan 1,2, standar TAG, standar ALB, n-heksan, 2-propanol, etil asetat, asam format 88%, benzena, larutan *cupric acetate-pyridine*, kertas saring Whatman no. 42, amonium sulfat, natrium sulfat, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP), buffer fosfat pH 6.90, buffer fosfat saline, NaOH dalam methanol 0.5 N, BF₃/methanol 14%, larutan NaCl jenuh, dietil eter, petroleum eter, larutan H₂SO₄ 10%, larutan CaCl 0.1 N, larutan NaOH 0.01 N, indikator p.p 1%, gas N₂ UHP, dan air destilata.

Alat-alat yang digunakan adalah *hydraulic pressure, autoclaf* ALP, penangas air GFL 1082, sentrifuge IEC Centra-CLD, sentrifuge refrigerasi Hitachi Himac R20A2, refrigerator, HPLC Shimadzu SCL-6A dengan detektor ELSD Sedex 55 (*evaporative light-scattering detector*), kolom silika LiCrosphere Si 100, GC-FID Shimadzu, Spektrofotometer Spectronic 20+D, *stirring hot plate* Thermolyne Cimarec 3, inkubator Heraeus (suhu konstan 37°C), *vortex* Thermolyne Maxi Mix I, oven, neraca analitik AND, pompa vakum Yamato WP-15, tabung vial, *magnetic stirrer*, kertas saring, cawan volumetrik, botol semprot, kain saring (blacu), sendok, gegap, peralatan plastik, corong Buchner, tabung vial, dan peralatan gelas.

Metode

Pengujian karakteristik reaksi hidrolisis minyak secara *in situ*

Pengujian ini secara garis besar dilakukan untuk mengetahui karakteristik pola reaksi hidrolisis minyak yang terjadi di dalam mesokarp buah kelapa sawit menggunakan enzim lipase *in situ*. Brondolan buah sawit hasil panen diberi perlakuan pememaran dan tanpa pememaran kemudian disimpan pada suhu kamar selama 5 hari dan dilanjutkan selama 30 hari. Fraksi minyak kaya M-DAG hasil reaksi hidrolisis dianalisis menggunakan HPLC dengan detektor ELSD (Liu *et al.*, 1993).

Pengujian pengaruh penambahan air terhadap reaksi hidrolisis minyak secara *in situ*.

Pengujian pengaruh penambahan air ini dilakukan dengan menambahkan sejumlah air (0, 5, 10, dan 15% b/b) ke dalam jaringan mesokarp yang sudah dihancurkan secara homogen, diinkubasi selama 5 hari pada suhu 37°C, hasil ekstraksi (CPO) kemudian dianalisis menggunakan HPLC dengan detektor ELSD.

Pengujian aktivitas hidrolisis lipase mesokarp kering bebas minyak

Sebanyak 5 gram olein dicampur dengan 5 gram mesokarp kering bebas minyak, 2.5 ml CaCl₂ 0.1 M, 10 ml akuades, dan 7.5 ml heksan dalam erlenmeyer 250 ml. Campuran tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada suhu 30°C dan 150 rpm selama 2 jam. Setelah selesai diinkubasi lalu ditambahkan 20 ml campuran etanol:aseton (1.1). Kemudian campuran tadi disaring menggunakan kertas saring Whatman dengan bantuan pompa vakum. Hasil filtrasi dititrasi dengan NaOH 0.1 N dan pp 1% sebagai indikator. Untuk blanko 1 digunakan bahan sama dengan diatas tanpa penambahan olein, sedangkan blanko 2 tanpa penambahan sabut.

$$\text{Kemampuan hidrolisis} = \frac{(A - B - C) \text{ ml NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 1000}{\text{waktu inkubasi}} \times \frac{10 \text{ gram}}{\text{bobot sabut}}$$

Keterangan :

A = volume titrasi sampel

B = volume titrasi blanko olein

C = volume titrasi enzim

Pengujian spesifitas hidrolisis ekstrak kasar lipase *in situ*

Pengujian spesifitas lipase *in situ* kelapa sawit dilakukan dengan menguji reaksi hidrolisis yang berlangsung dan melihat hasil asam lemak yang dibebaskan. Pengujian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu ekstraksi enzim dari jaringan mesokarp, pemekatan enzim dari homogenat, pengeringan beku untuk menjaga kestabilan enzim pada saat disimpan, serta pengujian spesifitas hidrolisis enzim tersebut menggunakan standar 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan warna kulit, buah sawit yang digunakan termasuk varietas *Albescens*, buah muda berwarna keputih-putihan, setelah masak akan berwarna kekuning-kuningan dan ujungnya berwarna ungu kehitam-hitaman. Berdasarkan persentase mesokarp terhadap buah, buah sawit ini termasuk varietas *Tenera* dengan persentase rata-rata bobot mesokarp terhadap bobot total buah sebesar 73,33%. Sambanthamurthi *et al.* (2000) menyatakan bahwa aktivitas lipase *in situ* mesokarp bervariasi di dalam buah *E. guineensis* (varietas *Tenera*) yang sama, bergantung pada genotip buah kelapa sawit.

Aktivitas lipase *in situ* mesokarp kelapa sawit sejalan dengan proses terjadinya sintesis minyak di dalam buah. Mohankumar *et al.* (1990) menyatakan bahwa enzim lipase mulai aktif setelah buah berumur 16-20 minggu. Aktivitas lipase yang paling tinggi diperoleh dari tandan dengan brondolan 14-17 buah jatuh (Nainggolan, 1988). Lipase ini terdapat di dalam membran badan minyak, menjadi sangat aktif dengan terjadinya kerusakan jaringan mesokarp karena pememaran, lewat matang, dan perlakuan pascapanen lainnya.

Karakteristik Reaksi Hidrolisis Minyak dalam Mesokarp Kelapa Sawit

Kadar air mesokarp kelapa sawit

Mesokarp TBS kelapa sawit memiliki kadar air rata-rata sebesar 45,22% BK (30,28% BB). Proses penyimpanan buah sawit memar dan kontrol selama 5 hari berturut-turut telah menyebabkan kadar air mesokarp secara umum menjadi berkurang, tetapi masih memungkinkan untuk melakukan reaksi hidrolisis. Menurut Chayati (1998), reaksi hidrolisis dapat berlangsung baik pada kadar air sistem 33% atau lebih, sedangkan pada kadar air 9% keberadaan air sudah sangat terbatas.

Derajat keasaman mesokarp kelapa sawit

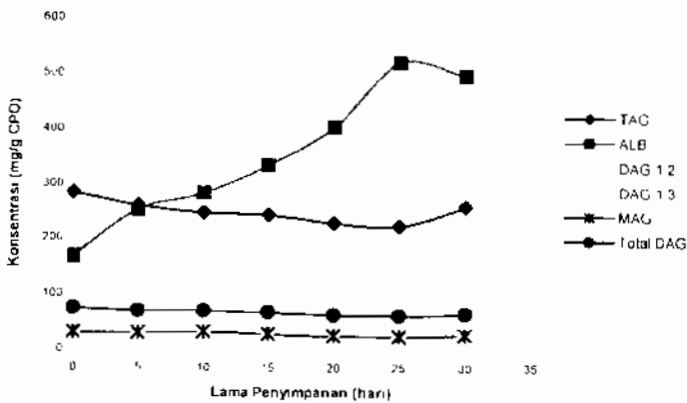
Tandan buah segar kelapa sawit memiliki pH sekitar 5,39. Secara umum selama proses penyimpanan brondolan buah terjadi kecenderungan penurunan pH, baik pada buah sawit kontrol maupun memar.

Asam lemak bebas yang tinggi ditunjukkan oleh penurunan pH selama penyimpanan. Asam lemak bebas ini di samping berasal dari aktivitas hidrolisis lipase *in situ*, kemungkinan juga berasal dari aktivitas lipase kapang yang mengkontaminasi buah sawit selama penyimpanan. Kapang mulai terlihat nyata pertumbuhannya setelah penyimpanan selama 1 hari pada permukaan buah sawit memar dan 2 hari pada buah sawit kontrol. Hal ini sesuai dengan penurunan pH yang tajam pada hari 1 penyimpanan buah sawit memar menjadi 4,24 dan hari ke-2 pada buah sawit kontrol menjadi 4,66.

Hasil analisis HPLC

Hasil analisis HPLC terhadap konsentrasi TAG, ALB, DAG, dan MAG (mg/g CPO) dalam CPO buah sawit memar yang disimpan diperlihatkan seperti Gambar 1. Secara umum penyimpanan buah sawit memar selama 30 hari menunjukkan kecenderungan pola penurunan konsentrasi TAG. Penurunan konsentrasi TAG paling rendah terjadi pada penyimpanan hari ke-25, yaitu dari konsentrasi 294,44 mg/g CPO turun menjadi 223,62 mg/g CPO. Konsentrasi TAG selanjutnya mengalami peningkatan menjadi 258,82 mg/g CPO setelah disimpan selama 30

hari. Hal ini berlaku pola sebaliknya pada ALB, konsentrasi ALB tertinggi terjadi pada penyimpanan selama 25 hari yaitu dari konsentrasi 168.24 mg/g CPO meningkat menjadi 520.81 mg/g CPO, kemudian menurun pada penyimpanan hari ke-30 menjadi 497.27 mg/g CPO. Pada hari ke-25, kandungan air di dalam mesokarp sudah sangat rendah (3.22% BB atau 3.32% BK) sehingga kemungkinan menyebabkan terjadinya reaksi sintesis TAG kembali (transesterifikasi atau interesterifikasi), terbukti dengan menurunnya konsentrasi ALB dan meningkatnya konsentrasi TAG kembali.



Gambar 1 Perubahan konsentrasi TAG, ALB, DAG, dan MAG dalam CPO (mg/g CPO) buah sawit memar yang disimpan selama 30 hari.

Hasil perhitungan konsentrasi DAG menunjukkan bahwa baik DAG spesifik 1,3 maupun DAG spesifik 1, 2 memiliki kecenderungan pola penurunan yang hampir sama. Konsentrasi DAG spesifik 1,3 dan 1,2 yang paling tinggi tetap dicapai pada penyimpanan hari pertama, yaitu sebesar 50.52 mg/g CPO dan 43.59 mg/g CPO. Konsentrasi DAG spesifik 1,3 dan 1,2 yang paling rendah dicapai pada penyimpanan hari ke-25 yaitu sebesar 35.73 mg/g CPO dan 26.26 mg/g CPO.

Berbeda dengan DAG, konsentrasi MAG mengalami kecenderungan penurunan dengan semakin lamanya penyimpanan. Hal ini menunjukkan bahwa lipase *in situ* yang terdapat di dalam mesokarp kelapa sawit diduga selain menghidrolisis TAG, juga mampu menghidrolisis DAG dan MAG.

Pengaruh Penambahan Air terhadap Reaksi Hidrolisis Minyak dalam Mesokarp Kelapa Sawit

Hasil perhitungan persentase rata-rata fraksi TAG, DAG dan MAG di dalam CPO dari pulp mesokarp yang mendapat penambahan air disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Persentase rata-rata fraksi TAG, ALB, DAG, dan MAG dalam CPO

Sampel	Persentase dalam CPO (%)						Gliserol, dll	Total
	TAG	ALB	DAG 1,3	DAG 1,2	MAG			
Pulp + 0% air	23.35	18.78	2.95	2.28	2.08		50.57	100.00
Pulp + 5% air	22.35	23.08	3.75	2.59	1.84		46.39	100.00
Pulp + 10% air	25.00	23.21	3.61	2.39	2.17		43.62	100.00
Pulp + 15% air	23.28	14.64	3.17	1.97	1.31		55.64	100.00

Berdasarkan hasil analisis persentase komposisi minyak tersebut, dapat diperkirakan kesetimbangan reaksi hidrolisis yang terjadi. Kesetimbangan tersebut berdasarkan jumlah persentase perubahan komposisi komponen utama selama reaksi berlangsung, komponen minor yang lain seperti protein, karbohidrat, dan mineral tidak termasuk ke dalam perhitungan. Perkiraan kesetimbangan reaksi rata-rata selama inkubasi terlihat seperti di bawah ini

0% Air. $11 \text{ TAG} + 9 \text{ H}_2\text{O} \leftrightarrow 9 \text{ ALB} + (1,3) \text{ DAG} + (1,2) \text{ DAG} + \text{MAG} + 24 \text{ Gly}$

5% Air. $12 \text{ TAG} + 13 \text{ H}_2\text{O} \leftrightarrow 13 \text{ ALB} + 2 (1,3) \text{ DAG} + (1,2) \text{ DAG} + \text{MAG} + 25 \text{ Gly}$

10% Air. $12 \text{ TAG} + 11 \text{ H}_2\text{O} \leftrightarrow 11 \text{ ALB} + 2 (1,3) \text{ DAG} + (1,2) \text{ DAG} + \text{MAG} + 20 \text{ Gly}$

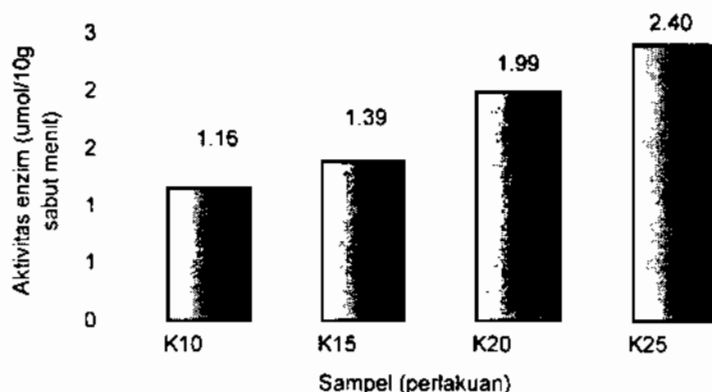
15% Air. $18 \text{ TAG} + 11 \text{ H}_2\text{O} \leftrightarrow 11 \text{ ALB} + 2 (1,3) \text{ DAG} + 2 (1,2) \text{ DAG} + \text{MAG} + 42 \text{ Gly}$

Kesetimbangan reaksi yang diperoleh memperlihatkan bahwa reaksi hidrolisis minyak sawit tidak terjadi secara sempurna menghasilkan 3 mol asam lemak bebas dari 1 mol triasilgliserol dengan 3 mol air, melainkan menghasilkan berbagai produk antara, yaitu diasilgliserol dan monoasilgliserol.

Pengujian Aktivitas Hidrolisis Lipase pada Sabut Kelapa Sawit

Pengujian aktivitas hidrolisis lipase yang terdapat pada sabut kelapa sawit dilakukan secara berulang untuk mempelajari aktivitas enzim yang tertahan pada sabut kelapa. Hasil pengujian memperlihatkan rata-rata aktivitas enzim sebesar $1.18 \mu\text{mol}/10 \text{ g}$ menit. Penurunan aktivitas hidrolisis terjadi setelah penggunaan kedua dari $1.85 \mu\text{mol}/10 \text{ g}$ menit menjadi $0.45 \mu\text{mol}/10 \text{ g}$ menit. Penurunan aktivitas hidrolisis substrat olein oleh lipase *in situ* ini menunjukkan bahwa sifat lipase *in situ* pada sabut dan daging buah kelapa sawit tidak terimobilisasi dengan kuat, dan lebih bebas mengikat substrat dan terlarut dalam pelarut.

Grafik pada Gambar 2. menunjukkan peningkatan aktivitas hidrolisis enzim lipase *in situ* sebanding dengan peningkatan kadar air yang tersedia untuk hidrolisis, walaupun secara kuantitatif relatif rendah. Hal ini disebabkan karena kandungan protein di dalam mesokarp kelapa sawit relatif sangat rendah sekitar 7.16% BB atau 7.71% BK, sedangkan di dalam protein itu sendiri tidak semua merupakan protein enzim, kemungkinan masih terdapat komponen metabolit lain yang mengkontaminasi.



Keterangan: K10 = penambahan 10% air, K15 = penambahan 15% air, K20 = penambahan 20% air, K25 = penambahan 25% air

Gambar 2. Aktivitas hidrolisis lipase terimobilisasi pada sabut kelapa sawit dengan perlakuan penambahan air.

Pengujian Spesifitas Posisi Hidrolisis Ekstrak Kasar Lipase *In situ*

Hasil perhitungan analisis spesifitas posisi lipase *in situ* kelapa sawit menggunakan POP dan GC-FID diperlihatkan seperti pada Tabel 2. Konsentrasi rata-rata dua ulangan asam palmitat yang mampu dihidrolisis adalah sebesar 28.06 mmol AL/mol POP, sedangkan asam oleat yang dapat dihidrolisis adalah sebesar 39.00 mmol/mol POP, sehingga perbandingan asam palmitat dan asam oleat hasil hidrolisis adalah 1mmol: 1.38 mmol. Hal ini menandakan bahwa enzim lipase *in situ* kelapa sawit bekerja dengan kecenderungan menghidrolisis asam lemak pada ikatan ester posisi kedua (sn-2). Hasil perhitungan PSI (*positional specificity index*) juga menunjukkan nilai 47.09. Bukti ini diperkuat dari hasil analisis dengan HPLC-ELSD yang memperlihatkan bahwa reaksi hidrolisis lebih banyak menghasilkan komponen DAG spesifik 1,3 daripada DAG spesifik 1,2.

Tabel 2. Data analisis spesifitas posisi lipase *in situ* kelapa sawit

Perlakuan	ALB	RF	Area AL	Area SI	mmol SI	mol POP	Konsentrasi (mmol AL/mol POP)	Konsentrasi terkoreksi (mmol AL/mol POP)
POP yang dihidrolisis (ulangan I)	Palmitat (C16:0)	0.95	609	15881	1.15×10^{-2}	1.2×10^{-5}	34.9124	15.4589
	Oleat (C18:1)	0.98	766	15881	1.15×10^{-2}	1.2×10^{-5}	45.2995	18.8661
POP yang dihidrolisis II (ulangan II)	Palmitat (C16:0)	0.95	829	16922	1.55×10^{-2}	1.2×10^{-5}	60.1142	40.6607
	Oleat (C18:1)	0.98	1144	16922	1.55×10^{-2}	1.2×10^{-5}	85.5758	59.1424
Blanko	Palmitat (C16:0)	0.95	186	6714	8.87×10^{-3}	1.2×10^{-5}	19.4535	
	Oleat (C18:1)	0.98	245	6714	8.87×10^{-3}	1.2×10^{-5}	26.4334	

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pola reaksi hidrolisis minyak yang terjadi di dalam mesokarp buah kelapa sawit baik yang dimemarkan maupun yang tidak dimemarkan menunjukkan bahwa lipase *in situ* yang terdapat di dalam mesokarp buah kelapa sawit diduga selain menghidrolisis TAG, juga mampu menghidrolisis DAG dan MAG. Reaksi ini tidak terjadi secara sempurna menghasilkan 3 mol asam lemak bebas dari 1 mol TAG dengan 3 mol air, melainkan menghasilkan berbagai produk antara, yaitu DAG dan MAG. Walaupun secara kuantitatif aktivitas lipase *in situ* relatif rendah, peningkatan aktivitas hidrolisis sebanding dengan peningkatan kadar air yang tersedia untuk hidrolisis. Lipase *in situ* lebih menyukai menghidrolisis ikatan ester posisi kedua (sn-2) pada TAG, terbukti dengan pengujian spesifitas posisi menggunakan POP yang menghasilkan perbandingan asam palmitat dan asam oleat hasil reaksi hidrolisis sebesar 1 mmol:1.38 mmol dan nilai PSI (*positional specificity index*) sebesar 47.09.

Saran

Enzim lipase *in situ* mesokarp kelapa sawit memiliki kecenderungan spesifik menghidrolisis ikatan ester pada posisi kedua (sn-2). Enzim tersebut perlu dikaji lebih lanjut isolasi dan pemurniannya mengingat sangat berpotensi untuk menghasilkan *DAG-oil* yang lebih bermanfaat bagi kesehatan tubuh jika dibandingkan dengan olein (triasilgliserol) biasa.

DAFTAR PUSTAKA

- Belitzh, H.D. and Grosch, W. 1999. Food Chemistry. Berlin: Springer-Verlag.
- Chayati, I. 1998. Hidrolisis minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dengan lipase spesifik-1,3 dari *Rhizopus oryzae* dan *Aspergillus niger* untuk mengkonsentrasikan EPA dan DHA dalam gliserida [tesis]. Yogyakarta: UGM, Pascasarjana.
- Elizabeth, B. 1997. Monoglycerides in Food System: Current and Future Uses. Food Technology 51(8): 52-59.
- Liu, J., Lee, T., Bobik, E.Jr., Guzman-Harty, M., and Hastilow, C. 1993. Quantitative determination of monoglycerides and diglycerides by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. JAOCS 70(4) : 343-347.
- Macrae, A.R. 1983. Extracellular Microbial Lipases, in Forgarty (ed). New York: Microbial Enzyme and Biotechnology Applied Science Pub.
- Mohankumar, D., Arumugan, C., and Kaleysa, R.R. 1990. Histological localization of palm oil fruit lipase. JAOCS 76 (10) : 665-669.

- Nainggolan, R.J. 1988. Aktivitas lipase daging buah kelapa sawit [tesis]. Yogyakarta.
- Puspitasari, T. 2001. Sintesis emulsifier dari tbs kelapa sawit dengan tingkat kematangan berbeda menggunakan enzim lipase *in Situ* [skripsi]. Bogor: IPB, Fakultas Teknologi Pertanian.
- Rehm, H.J. and Reed, G. 1995. Enzymes, Biomass, Food and Feed. Di dalam: Biotechnology vol 9. Weinheim: VCH.
- Sambanthamurthi, R., Rajanaidu, N., and Parman, S.H. 2000. Screening for lipase activity in the oil palm. Biochem. Soc. Trans. 28(2000): 769-770 [serial online]. <http://www.biochemsoctrans.org/bst/028/bst0280769.htm>. [7 Mei 2003].
- Sek, L., Porter, C.J., Kaukonen, A.M., and Charman, W.N. 2002. Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. J Pharm Pharmacol 54(1): 29-41 [serial online]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/entrez/query?old?uid=11833493&form=6&db=m&Dopt=b>. [23 September 2002].
- Yasunaga, K., Katsuragi, Y., and Yasukawa, T. 2001. Nutritional characteristics of diacylglycerol. Proceedings Food Technology and Nutrition Conference, August 20-22.
- Yunanti, R.D. 2001. Optimasi, suhu dan waktu penyimpangan tandan buah segar kelapa sawit dalam sintesis emulsifier dengan menggunakan enzim lipase *In Situ* [skripsi]. Bogor : IPB, Fakultas Teknologi Pertanian.