

Agustus 2008

JURNAL TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS MULAWARMAN

Penelitian

Pengaruh Penambahan Pemplastis (Polietilen Glikol 400, Dietilen Glikol, Dan Dimetil Ftalat) Terhadap Proses Biodegradasi Bioplastik Poli-B-Hidroksialkanoat Pada Media Cair dengan Udara Terlimitasi (*The Effects of Plastisizer Additions (Polyethylene Glycol 400, Diethylene Glycol, and Dimethyl Phtalate) on the Biodegradation Process of Bioplastic Poly- β -Hydroxyalkanoates in Liquid Media with Limited Air*) **Khaswar Syamsu, Krisnani Setyowati, Arban A. Khoiri**

Pengaruh Pentagamavunon-0 (Curcumin Analog) Terhadap Penerimaan Uterus (*Effect of Pentagamavunon-0 (Curcumin Analog) on Uterus Receptivity*) **Sri Hastati, Novida Ariani**

Karakterisasi Perekat Siklo Karet Alam (*Adhesive Characterization of Natural Rubber Cyclo*) **Nurul Puspita Palupi, Illah Sailah, Yoharmus Syamsu, Chilwan Pandji**

Kajian Mutu Kimiawi Bakso Asap Dari Udang Putih (*Penaeus merguensis*) pada berbagai Variasi Konsentrasi dan Waktu Perendaman dalam Asap Cair (*Chemical Quality Study of Smoked White Shrimp Ball on Various Concentrations and Soaking Time in Liquid Smoked*) **Indrati Kusumaningrum, Doddy Sutono**

Produksi Lipase Ekstraseluler Dari Rhizopus Oligosporus RG2 Menggunakan Media Cair Mengandung Bungkil Wijen (*Production of Extracellular Lipase from Rhizopus oligosporus RG2 in Liquid State Fermentation of Sesame Seed Press-Cake Containing Media*) **Yuliani**

Pengaruh Proporsi Beras Pecah Kulit, Kacang Tunggak, dan Jagung terhadap Mutu Sereal Mengembang (*Puffed*) yang Dihasilkan (*Influence of Proportion of Germinated Rice Shell, Pea, and Corn on Cereal Puffed Quality*) **Deny Sumarna**

JTP

JURNAL TEKNOLOGI PERTANIAN

PENERBIT

Program Studi Teknologi Hasil Pertanian
Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian
Universitas Mulawarman
Jl. Tanah Grogot Kampus Gunung Kelua
Samarinda

PELINDUNG

Juremi Gani

PENANGGUNG JAWAB

Alexander Mirza

KETUA EDITOR

Krishna Purnawan Candra (THP-UNMUL Samarinda)

EDITOR

Dahrulsyah (TPG-IPB Bogor)
Meika Syahbana Roesli (TIN-IPB Bogor)
Muhammad Nurroufiq (BPTP-Samarinda)
Neni Suswatini (THP-UNMUL Samarinda)
Sulistyo Prabowo (THP-UNMUL Samarinda)
Hudaida Syahrumsyah (THP-UNMUL Samarinda)

EDITOR PELAKSANA

Hadi Suprpto
Sukmiyati Agustin, Anton Rahmadi

ALAMAT REDAKSI

Program Studi Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian
Universitas Mulawarman
Jalan Tanah Grogot Kampus Gunung Kelua
Samarinda 75123
Telp 0541-749159
e-mail: JTP_unmul@yahoo.com

JURNAL TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS MULAWARMAN

Volume 4 Nomor 1
Agustus 2008

Halaman

Penelitian

- Pengaruh Penambahan Pemlastis (Polietilen Glikol 400, Dietilen Glikol, Dan Dimetil Ftalat) Terhadap Proses Biodegradasi Bioplastik Poli-B-Hidroksialkanoat Pada Media Cair dengan Udara Terlimitasi (*The Effects of Plastisizer Additions (Polyethylene Glycol 400, Diethylene Glycol, and Dimethyl Phtalate) on the Biodegradation Process of Bioplastic Poly-β-Hydroxyalkanoates in Liquid Media with Limited Air*) **Khaswar Syamsu, Krisnani Setyowati, Arban A. Khoiri** 1
- Pengaruh Pentagamavunon-0 (Curcumin Analog) Terhadap Penerimaan Uterus (*Effect of Pentagamavunon-0 (Curcumin Analog) on Uterus Receptivity*) **Sri Hastati, Novida Ariani** 12
- Karakterisasi Perekat Siklo Karet Alam (*Adhesive Characterization of Natural Rubber Cyclo*) **Nurul Puspita Palupi, Illah Sailah, Yoharmus Syamsu, Chilwan Pandji** 19
- Kajian Mutu Kimiawi Bakso Asap Dari Udang Putih (*Penaeus merguensis*) pada berbagai Variasi Konsentrasi dan Waktu Perendaman dalam Asap Cair (*Chemical Quality Study of Smoked White Shrimp Ball on Various Concentrations and Soaking Time in Liquid Smoked*) **Indrati Kusumaningrum, Doddy Sutono** 25
- Produksi Lipase Ekstraseluler Dari *Rhizopus oligosporus* RG2 Menggunakan Media Cair Mengandung Bungkil Wijen (*Production of Extracellular Lipase from Rhizopus oligosporus RG2 in Liquid State Fermentation of Sesame Seed Press-Cake Containing Media*) **Yuliani** 31
- Pengaruh Proporsi Beras Pecah Kulit, Kacang Tunggak, dan Jagung terhadap Mutu Sereal Mengembang (*Puffed*) yang Dihasilkan (*Influence of Proportion of Germinated Rice Shell, Pea, and Corn on Cereal Puffed Quality*) **Deny Sumarna** 41
-

PRODUKSI LIPASE EKSTRASELULER DARI *Rhizopus oligosporus* RG2 MENGGUNAKAN MEDIA CAIR MENGANDUNG BUNGKIL WIJEN

Production of Extracellular Lipase from Rhizopus oligosporus RG2 in Liquid State Fermentation of Sesame Seed Press-Cake Containing Media

Yuliani

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman, Jl.Tanah Grogot, Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75119

Received 28 May 2008 Accepted 11 July 2008

ABSTRACT

We have found a liquid fermentation condition of *Rhizopus oligosporus* RG2, isolated from tempeh *ragi*, for lipase producing. The mold grew on basal salt medium (NaNO₃ 0.1 %, KH₂PO₄ 0.1 %, MgSO₄.7H₂O 0.05 %) containing sesame seed or sesame seed press-cake gave higher production of lipase ($P < 0.05$) than that on basal medium (NaNO₃ 0.1 %, KH₂PO₄ 0.1 %; MgSO₄.7H₂O 0.05 %; pepton 1 %, yeast extract 0.1 %) containing 2 % of sesame seed oil or olive oil. This research showed that sesame seed press-cake was a potential carbon and nitrogen source in the medium for lipase production from *R. oligosporus*. The best fermentation condition in 100 mL *liquid state fermentation* using basal medium, with sesame seed press-cake as substitute for peptone and yeast extract was pH 6.6, incubation time of 3 days, using rotary shaker speed of 150 rpm. The incubation temperature was between 30-40 °C. There was no esterification activity detected in the crude lipase from *R. oligosporus* filtrate.

Keywords: lipase-producing moulds, Rhizopus oligosporus, tempeh ragi

PENDAHULUAN

Lipase (triasilgliserol hidrolase EC 3.1.1.3) mengkatalisa hidrolisa ikatan ester dari triasilgliserol dan pada kondisi tertentu dapat mensintesa ikatan ester melalui transesterifikasi (Kohno *et al.*, 1994). Lipase dihasilkan oleh hewan (Thirstrup, 1993), tumbuh-tumbuhan (Mohamed *et al.*, 2000; Abigor *et al.*, 2002) dan mikrobial (Dalmau *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2001). Lipase mikrobial mempunyai potensi yang besar untuk digunakan secara komersial disebabkan karena stabilitas, selektivitas dan spesifisitas yang tinggi terhadap substrat (Cardenas, 2001). Disamping itu produksi lipase dari mikroba memerlukan waktu yang relatif singkat dan aktivitasnya dapat ditingkatkan melalui penggunaan kondisi pertumbuhan yang tepat, serta tidak memerlukan lahan produksi yang luas. Diantara mikrobial penghasil lipase, jamur mendapat perhatian yang sangat besar karena merupakan penghasil lipase ekstraseluler potensial. Lipase ekstraseluler jamur biasanya

diproduksi melalui proses fermentasi dalam media cair yang memungkinkan perolehan (*recovery*) yang cukup besar dan mudah dilakukan (Lima *et al.*, 2003).

Baru-baru ini kami telah berhasil mengisolasi jamur potensial penghasil lipase dari *ragi* tempe yang diidentifikasi sebagai *R. oligosporus* RG2. Jenis jamur ini masih sangat jarang dilaporkan sehingga sangat menarik untuk dipelajari karakteristiknya. Sebagai langkah awal dari pekerjaan ini dilakukan usaha untuk menemukan kondisi optimum produksi lipase dengan menggunakan beberapa parameter yang dapat mempengaruhi produksi enzim oleh mikrobial. Parameter yang digunakan adalah suhu dan pH pertumbuhan, serta jenis media yang berbeda pada macam dan konsentrasi sumber karbon dan nitrogen (Lima *et al.*, 2003; Cardenas *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 1999). Sumber karbon dari lipida pada umumnya dapat menghasilkan lipase yang cukup tinggi, tetapi media tanpa lipida dan minyak ternyata juga dapat memberikan hasil yang cukup baik (Salleh *et al.*, 1993).

Berdasarkan alasan-alasan tersebut di atas maka pada tahap optimasi produksi lipase ekstraselluler dari *R. oligosporus* RG2, dipelajari pengaruh: (i) konsentrasi spora yang digunakan sebagai starter, (ii) macam media tumbuh, (iii) lama fermentasi, (iv) pH media tumbuh, dan (v) suhu pertumbuhan.

Pada penelitian ini digunakan berbagai produk wijen antara lain biji wijen, minyak wijen dan bungkil wijen sebagai substrat tambahan dalam fermentasi cair untuk produksi lipase ekstraselluler. Belum ada laporan tentang penggunaan biji wijen atau bungkil wijen (limbah industri minyak wijen) untuk produksi lipase secara fermentasi cair, sedangkan Indonesia merupakan salah satu penghasil wijen yang potensial.

Wijen merupakan biji-bijian sumber minyak yang banyak dihasilkan di Indonesia. Pada tahun 2002 ekspor wijen Indonesia meningkat dari 74 ton (Badan Pusat Statistik, 2002) menjadi 224,9 ton pada tahun 2003 dengan negara tujuan antara lain Taiwan, Singapura, dan Malaysia (Badan Pusat Statistik, 2003). Biji wijen mengandung lemak sekitar 50-55 %, dengan komposisi asam lemak jenuh sekitar 14 %, asam oleat 33-54 %, dan asam linoleat 35-59 % (Gunstone, 1996).

Dengan bahan baku yang ada dan mudah didapat di Indonesia dan menggunakan mikrobia *indigenus* Indonesia maka diharapkan Indonesia dapat menjadi produsen lipase spesifik yang dapat digunakan untuk berbagai kepentingan seperti sintesa lipid terstruktur dalam rangka menunjang pengembangan ilmu dan teknologi yang berbasis pemanfaatan potensi dalam negeri agar dapat bersaing di dunia internasional. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi produksi optimum lipase ekstraselluler dari *R. oligosporus* RG2.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan sumber jamur, tempe, diperoleh dari produsen tempe di Yogyakarta. Biji wijen putih diperoleh di pasar lokal di Yogyakarta, sedangkan minyak wijen serta

bungkilnya diperoleh dari hasil pengempaan biji wijen.

Bahan kimia yang digunakan semuanya *analytical grade*. Pepton, ekstrak khamir, dan agar yang digunakan adalah produk dari Oxoid, sedangkan reagen-reagen kimia seperti natrium asetat, natrium hidroksida, minyak zaitun, etanol, asam oleat, isooktan, tris-hydroxy methane, asam klorida, natrium nitrat, tributirin, kalsium klorida, khloram-fenikol, asam asetat glasial, Cu-asetat, piridin, gliserol, glukosa, petroleum ether, dietil ether, aseton, dinatrium hidrogen fosfat, dan natrium dihidrogen fosfat yang digunakan adalah produk dari Merck. Triolein diperoleh dari Sigma.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat-alat gelas seperti erlenmeyer, gelas piala, tabung reaksi, labu ukur, gelas ukur, petridish dan pipet ukur serta alat-alat non gelas seperti *stomacher*, mikropipet, UV-Vis spektrofotometer, pH meter, *autoclave*, penangas air, *magnetic stirrer*, *shaker incubator*, *shaker water bath*, oven dan refrigerator.

Prosedur Penelitian

Optimasi Produksi Lipase Ekstraselluler Kasar dengan Cara Fermentasi Cair

Dalam optimasi lipasae ini, aktivitas hidrolitik lipase ekstraselluler kasar diuji dengan menggunakan metode yang disarankan oleh Marseno *et al.* (1988) yang telah dimodifikasi. Uji aktivitas hidrolitik lipase dilakukan dalam campuran reaksi 1,0 mL buffer (buffer natrium asetat untuk pH 4 dan 5, buffer natrium fosfat untuk pH 6 dan 7, buffer tris-HCl untuk pH 8 dan 8,9, dan 10). Larutan enzim sebanyak 1 mL dan 4 mL substrat (60 % (v/v) minyak zaitun dalam isooktan) diemulsikan dengan vorteks sampai homogen. Konsentrasi buffer akhir pada fase polarnya adalah 0,1 M. Campuran diemulsikan selama 20 menit pada suhu 30 °C dengan goyangan 150 goyangan per menit. Reaksi dihentikan dengan menginkubasikannya pada es selama 5 menit. Untuk uji ini dilakukan kontrol dengan cara mengganti larutan dengan aquades. Asam lemak yang dibebaskan diukur dengan cara mengambil 3,0 mL fase non-polar dan memasukkannya

ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1,0 mL isooktan dan 800 μ L 5 % (w/v) Cu-asetat piridin pH 6,0. Setelah didiamkan 10 menit, absorbansinya diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 707 nm. Kadar asam lemak yang terdapat pada sampel ditentukan melalui kurva standar yang dibuat dengan menggunakan asam oleat sebagai asam lemak bebasnya. Aktivitas hidrolitik lipase didefinisikan sebagai aktivitas enzim dalam membebaskan 1 μ mol produk (asam lemak bebas) per menit.

Optimasi konsentrasi spora awal dalam media produksi.

Optimasi jumlah starter (spora) dilakukan dengan cara menambahkan starter (larutan spora) dengan konsentrasi awal yang berbeda pada media produksi. Larutan spora dipersiapkan dengan cara mensuspensikan spora (dari kultur yang ditumbuhkan pada PDA miring yang telah diinkubasi selama 5 hari) dengan 10 mL larutan 0,05 % Tween 80 yang telah disterilkan. Selanjutnya disentrifusi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Supernatan dibuang dan spora yang diperoleh dicuci dengan pepton 0,1 % steril sebanyak 3 kali. Spora yang diperoleh dihitung dengan menggunakan hemacytometer hingga memiliki konsentrasi 10^8 spora per mL. Suspensi spora diencerkan dengan pepton 0,1 % hingga diperoleh suspensi spora stok dengan konsentrasi 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , spora per mL. Starter dibuat dengan cara menambahkan 1 mL suspensi spora stok dengan konsentrasi yang berbeda-beda ini kedalam 9 mL media basal yang mengandung 2 % minyak zaitun (konsentrasi spora 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C dengan pengocokan 150 rpm. Selanjutnya seluruh volume starter dimasukkan ke dalam 10 mL media produksi. Kondisi yang digunakan untuk optimasi konsentrasi spora adalah menggunakan isolat *R. Oligosporus* RG2, ditumbuhkan pada media basal yang mengandung minyak wijen 2 %, pH 6,0, dan suhu inkubasi 30 °C, waktu inkubasi 96 jam, dan pengocokan 150 menit. Konsentrasi spora yang memberikan aktivitas lipase

tertinggi selanjutnya digunakan untuk optimasi faktor yang lain.

Optimasi jenis dan komposisi media

Dilakukan dengan cara mensubstitusi pepton dan ekstrak khamir pada media basal dengan produk wijen (biji, minyak, dan bungkil). Kondisi yang digunakan adalah kondisi awal yaitu konsentrasi spora awal starter 10^4 , pH media 6,0, suhu inkubasi 30 °C, waktu inkubasi 96 jam, pengocokan 150 rpm. Tabel 1 menunjukkan jenis media yang digunakan pada tahap ini:

Table1. Composition of growth media for *R. Oligosporus* RG2

Type of Media	Composition
A	BSM + sesame seed 3.5 %
B	BSM + press cake of sesame seed 5 %
C	BSM + press cake of sesame seed 2.5 % + sesame oil 1 %
D	BSM + sesame oil 2 %
E	BSM + NH ₄ Cl 0.75 % + sesame oil 2 %
F	BSM + NH ₄ Cl 2 % + sesame oil 2 %
G	BM + olive oil 2 %
H	BM + sesame oil 2 %

Note:

Media G and H were used as control

Basal Salt Medium (BSM): NaNO₃ 0.1 %, KH₂PO₄ 0.1 %, MgSO₄.7H₂O 0.05 %, Basal Medium (BM): NaNO₃ 0.1 %, KH₂PO₄ 0.1 %, MgSO₄.7H₂O 0.05 %; pepton 1 %, ekstrak khamir 0.1 %

Jenis media yang memberikan produksi lipase tertinggi (media basal dimana pepton dan ekstrak khamir disubstitusi dengan bungkil wijen 5 % atau disebut media B) digunakan untuk optimasi tahap selanjutnya.

Optimasi lama fermentasi

Dilakukan dengan cara membuat lama fermentasi dengan selang 1, 2, 3, 4 dan 5 hari. Kondisi yang digunakan adalah media B, konsentrasi spora 10^4 , suhu inkubasi 30 °C, pengocokan 150 rpm. Lama fermentasi optimal yang diperoleh digunakan untuk percobaan tahap selanjutnya.

Optimasi pH media pertumbuhan

Dilakukan dengan cara membuat variasi pH media produksi yaitu pH 5,56; 5,89; 6,07; 6,4; 6,66, dan 6,96 (nilai pH media ini diperoleh setelah saterilisasi media

dilakukan). pH optimal yang diperoleh digunakan untuk optimasi selanjutnya. Kondisi lain yang digunakan adalah media B, konsentrasi spora 10^4 , waktu inkubasi 3 hari, suhu inkubasi 30 °C, pengocokan 150 rpm. Media dengan pH yang dapat memacu produksi lipase tertinggi digunakan untuk optimasi selanjutnya.

Optimasi suhu pertumbuhan

Dilakukan dengan cara membuat variasi suhu 30, 40, dan 50 °C. Kondisi yang digunakan adalah media B, konsentrasi spora 10^4 , waktu inkubasi 3 hari, pH media 6,6, pengocokan 150 rpm.

Deteksi Kemampuan Lipase Kasar Isolat *R. oligosporus* RG2 dalam Reaksi Esterifikasi

Kemampuan lipase dari *R. oligosporus* RG2 dalam mengkatalisa reaksi esterifikasi dideteksi dengan cara mereaksikan gliserol dengan asam oleat dalam pelarut isooktan. Lipase kasar yang diperoleh dari kondisi produksi optimum digunakan pada uji aktivitas esterifikasi ini dan dilakukan sesuai dengan metode dari Yesiloglu dan Kilic (2004). Kedalam erlenmeyer 50 mL dicampurkan 3 mL asam oleat dalam isooktan (5 g asam oleat dalam 30 mL isooktan), 2 g gliserol, 1 g *molecular sieve*, dan 150 sampai dengan 900 μ L enzim kasar. Setelah diinkubasi dengan pengocokan 200 rpm selama waktu tertentu sesuai dengan perlakuan (sampai dengan 48 jam), reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 10 mL etanol : aseton (1 : 1, v/v). Ester yang terbentuk diekstrak dengan penambahan 4 mL dietil eter, kemudian produk (ester) dianalisis dengan *Thin Layer Chromatography* (TLC) menggunakan campuran pelarut organik petroleum eter : dietil eter : asam asetat glasial (85 : 35 : 1, v/v) pada plat silica gel (20x20 cm).

Dalam proses esterifikasi ini lama reaksi divariasi antara 0-48 jam (0, 4, 8, 12, 24, 36, dan 48 jam) dengan jumlah lipase kasar 5 % dari campuran asam oleat-pelarut. Selain itu dilakukan pula variasi jumlah lipase yang ditambahkan yaitu sebesar 10, 20, dan 30 % dengan lama reaksi 48 jam. *Molecular sieve* ditambahkan untuk mengikat air yang terbentuk selama proses esterifikasi.

Analisis Statitik

Data aktivitas hidrolitik lipase ekstraseluler dari *R. oligosporus* RG2 pada setiap tahapan optimasi produksi lipase dianalisis dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Setiap tahapan optimasi merupakan perlakuan, dan setiap perlakuan dilakukan 2 ulangan. Perlakuan-perlakuan tersebut adalah (i) variasi konsentrasi spora, (ii) variasi jenis media tumbuh, (iii) variasi lama fermentasi, (iv) variasi pH media pertumbuhan, (v) variasi suhu pertumbuhan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variasi Konsentrasi Spora Starter

Konsentrasi spora starter yang digunakan dengan selang dari 10^3 - 10^7 pada 100 mL media basal yang ditumbuhkan pada suhu 30 °C selama 4 hari, secara statistik tidak menunjukkan adanya perbedaan ($P > 0,05$) terhadap produksi lipase. Aktivitas hidrolitik lipase dari supernatant medium tumbuh tersebut berkisar antara 3,5-4,3 U/mL. Data pengaruh konsentrasi spora starter pada media tumbuh terhadap aktivitas hidrolitik lipase dapat dilihat pada Gambar 1.

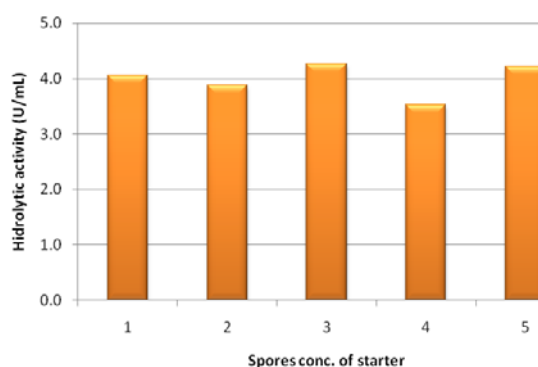


Figure 1. Effect of starter concentration of starter on hidrolytic activity of lipase. Ten mL of starter which was incubated for 24 h was poured into 100 mL of growth media and incynated for 4 days at 30 °C and 150 rpm. The growth medium was basal medium (pH 6,0). Hidrolytic activity was assayed at 50 °C, pH 7.0 for 20 mimutes.

Dilaporkan bahwa kebanyakan enzim hidrolitik ekstraseluler diekspresikan oleh mikroorganisme pada fase log (Hiol *et al.*, 1999; Valero *et al.*, 1991). Perbedaan

konsentrasi spora dalam suatu media fermentasi sangat menentukan percepatan pertumbuhan jamur, hal ini akan mempengaruhi ketersediaan nutrient yang terdapat dalam media tersebut, sehingga makin besar konsentrasi spora yang diinokulasikan maka akan makin cepat fase log jamur pada media tersebut. Pada penelitian ini, percobaan penggunaan konsentrasi spora starter yang bervariasi diamati pada saat panen yang sama, yaitu 4 hari. Pada saat itu dimungkinkan pertumbuhan jamur telah melewati fase log sehingga menghasilkan aktivitas hidrolitik lipase yang relatif sama. Hal ini diperkuat pada percobaan penentuan waktu fermentasi optimum yang menghasilkan informasi waktu optimum fermentasi *R. oligosporus* RG2 menggunakan fermentasi cair dalam media basal yang mengandung bungkil wijen sebagai ganti pepton dan ekstrak khamir adalah 3 hari.

Variasi Media Tumbuh

Pada tahap ini dipelajari pengaruh jenis nutrient dengan sumber C dan N yang berbeda-beda. Ekstrak khamir (sumber C dan N) dan pepton (sumber N) pada media basal disubsitisi oleh nutrient sumber C dan N yang lain. Jenis nutrient tersebut antara lain biji wijen dan bungkil wijen (sumber C dan

N), minyak wijen dan minyak zaitun (sumber C), dan NH_4Cl (sumber N anorganik). Kandungan C (minyak) dari masing-masing nutrient substitusi tersebut diberikan dalam jumlah yang relatif sama tetapi dengan kandungan N yang berbeda (Tabel 2). Pengaruh nutrient yang ditambahkan kedalam *basal salt medium* sebagai pengganti pepton terhadap produksi lipase dari isolat *R. oligosporus* dapat memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) (Gambar 2).

Pada penelitian ini diketahui bahwa biji wijen atau bungkil wijen sangat potensial sebagai bahan pensubstitusi pepton dan ekstrak khamir pada media basal untuk produksi lipase dari *Rhizopus oligosporus* RG2, bahkan memberi pengaruh yang lebih baik ($P < 0,05$). Hasil analisa proksimat biji dan bungkil wijen yang digunakan sebagai pensubstitusi pepton dan ekstrak khamir yang digunakan pada penelitian ini dihitung berdasarkan berat kering untuk biji adalah 2,30; 59,11; 26,27; dan 12,33 % masing-masing untuk kadar abu, lemak, protein dan karbohidrat. Sedangkan bungkil wijen adalah 3,99; 38,22; 43,46; dan 14,23 % masing-masing untuk kadar abu, lemak, protein, dan karbohidrat.

Table 2. Nutrition content of growth medium for lipase production of *R. oligosporus* RG2

Type of medium	Composition	% w/w (dry weight)		
		Protein	Total N	Oil
A	BSM + sesame seed 3,5 %	0.92	0.16	2.07
B	BSM + press cake of sesame seed 5 %	2.17	0.36	1.92
C	BSM + press cake of sesame seed 2,5 % + sesame oil 1 %	1.09	0.19	1.96
D	BSM + sesame oil 2 %	-	0.02	2.00
E	BSM + NH_4Cl 0,75 % + sesame oil 2 %	-	0.22	2.00
F	BSM + NH_4Cl 2 % + sesame oil 2 %	-	0.55	2.00
G	BM + olive oil 2 %	0.91	0.16	2.00
H	BM + sesame oil 2 %	0.91	0.16	2.00

Note:

Basal Salt Medium (BSM): NaNO_3 0.1 %, KH_2PO_4 0.1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %

Basal Medium (BM): NaNO_3 0.1 %, KH_2PO_4 0.1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %, pepton 1 %, yeast extract 0.1 %

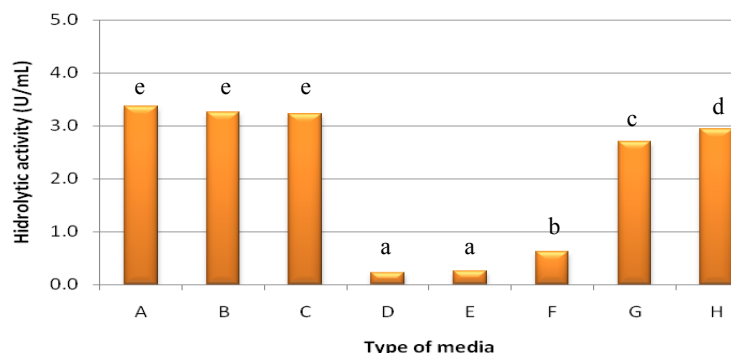


Figure 2. Effect of type of growth media on lipase production from *R. oligosporus* RG2. Condition of hydrolytic activity test: temp 50°C, pH 7.0 for 20 min. Bar followed by the same character is not significantly differ at LSD test at $\alpha = 5\%$

Dari Tabel 2, diketahui bahwa N memegang peranan sangat penting dalam produksi lipase, sebaliknya trigliserida berupa minyak zaitun dan minyak wijen, hanya sedikit berperan. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Hiol *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa *rape oil* memberikan efek *inducer* yang sangat baik kepada *Mucor hiemalis f hiemalis* terhadap produksi lipasena. Lima *et al.* (2003) melaporkan bahwa minyak zaitun memberi efek yang lebih baik dibanding minyak jagung, minyak bunga matahari, dan minyak kedelai. Konsentrasi minyak zaitun sebesar 0,5 % dalam media mempunyai efek *inducer* produksi lipase ekstraselluler dari *Penicillium aurantiogriseum* 2 kali lebih besar dibanding kadar minyak zaitun 1,0 % dalam media, penambahan kadar minyak akan menurunkan produksi lipase.

Dalam hal ini terlihat bahwa tidak ada perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) antara aktivitas lipase yang berasal dari media BSM + biji wijen 3,5 % (media A), media BSM + bungkil wijen 5 % (media B) dan media BSM + bungkil wijen 2,5 % + minyak wijen 1 % (media C), masing-masing sebesar 3,36 U/mL, 3,26 U/mL dan 3,22 U/mL. Hasil ini diperkuat dari data media D (BSM + minyak wijen 2 %), yaitu media tanpa sumber N organik maupun anorganik, yang memberikan hasil terendah sebesar 0,22 U/mL. Pada penelitian selanjutnya, medium B digunakan untuk tahap optimasi berikutnya.

Ditunjukkan pula bahwa N organik (pepton, ekstrak khamir, biji wijen, bungkil wijen) memberi efek produksi lipase yang lebih baik dari *Rhizopus oligosporus* RG2 dibanding N anorganik (NH_4Cl 0,75% dan NH_4Cl 2%). Miranda *et al.* (1999) melaporkan sumber N dari NH_4Cl dengan konsentrasi 0,75% memberikan aktivitas yang lebih tinggi dibanding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,75% maupun Urea 0,75%. Kenaikan aktivitas hidrolitik lipase sebesar 5 kali dapat dideteksi bila N anorganik (media F) digantikan dengan pepton dan ekstrak khamir (media H). Hal yang sama juga dilaporkan oleh Salleh *et al.* (1993), sedangkan Hiol *et al.* (2000) menambahkan bahwa untuk produksi lipase dari *R. oryzae*, media dengan kandungan nutrient yang mempunyai komposisi C/N ratio 0,1 memberikan hasil yang paling baik. Hal yang berbeda, dilaporkan oleh Lima *et al.* (2003) untuk *Penicillium aurantiogriseum* dimana N anorganik mempunyai efek yang lebih baik dalam produksi lipase dibanding N organik, dan media yang mempunyai C/N rasio sebesar 5 memberikan efek pada produksi lipase ekstraselluler yang lebih baik dibanding media yang C/N rasionya 2,5 atau 10.

Variasi Lama Fermentasi

Untuk 100 mL media yang diinokulasi dengan starter sebanyak 10 % (10 mL) dengan konsentrasi awal spora adalah 10^4 (starter diinkubasikan selama 24 jam terlebih

dahulu), lama fermentasi yang memberikan aktivitas lipase optimum adalah 3 hari. Dari selang lama fermentasi yang dipelajari (1-5 hari), aktivitas lipase yang dideteksi menunjukkan kecenderungan parabolik dengan titik optimum adalah fermentasi selama 3 hari. Lama fermentasi ini berbeda sangat nyata secara statistik ($P < 0,05$) dibandingkan dengan lama fermentasi yang lain. Data pengaruh lama fermentasi terhadap produksi lipase dari isolat *Rhizopus oligosporus* RG2 disajikan pada Gambar 3.

Selain lama fermentasi faktor lain yang sangat mempengaruhi produksi lipase ekstraseluler adalah frekuensi pengocokan yang dilakukan selama fermentasi tersebut. Untuk *R. oryzae* mesofilik dilaporkan bahwa pengocokan sebesar 300 rpm memberikan hasil yang terbaik (Razak dalam Salleh *et al.*, 1993), dan *R. oryzae* termofilik hanya memerlukan 100 rpm (Salleh *et al.*, 1993), dilain pihak Nahas dalam Salleh *et al.* (1993) melaporkan bahwa *R. oligosporus* memerlukan inkubasi tanpa pengocokan untuk mencapai produksi lipase ekstraseluler, seperti juga kondisi yang diperlukan oleh khamir *Yarrowia lipolitica* (Corzo dan Revah, 1999). Pada penelitian ini dilakukan pengocokan sebesar 150 rpm, sehingga sangat menarik untuk melakukan studi pengaruh pengocokan terhadap produksi isolat *R. oligosporus* yang diperoleh pada studi ini.

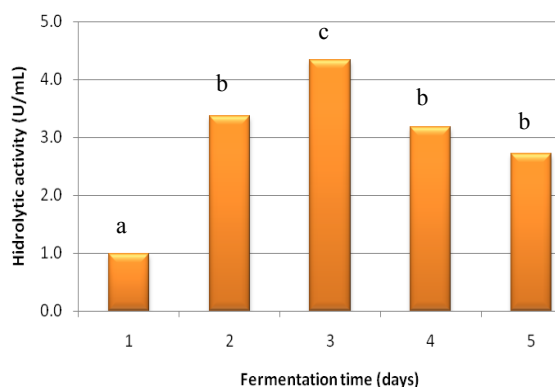


Figure 3. Effect of fermentation time on production of lipase from *Rhizopus oligosporus* RG2 isolate. Condition test: temp 50°C, pH 7.0 for 20 min. Growth condition: BSM + 5 % sesame cake, pH 6.0, suhu 30 °C, 150 rpm. Bar followed by the same character is not significantly differ at $\alpha = 5\%$.

Variasi pH Media Pertumbuhan

Mikroorganisme yang ditumbuhkan pada media dengan pH yang mendukung pertumbuhannya dengan sendirinya akan memacu produksi enzim dari mikroorganisme tersebut (Corzo dan Revah, 1999). Pada tahap ini dipelajari pH pertumbuhan yang tepat untuk isolat RG2 (*Rhizopus oligosporus*) pada 100 mL media B (media BSM + bungkil wijen 5 %) yang mempunyai pH antara 5,56-6,96. Tingkat keasaman (pH) media pada selang 5,56-6,96 memberikan pengaruh yang signifikan dan memberikan efek parabolik pada produksi lipase isolat *Rhizopus oligosporus* RG2. Produksi lipase tertinggi diperoleh dari media basal dengan pH 6,6 sebesar 8,49 U/mL. Nilai ini berbeda sangat nyata dengan nilai yang lain secara statistik ($P < 0,05$). Data pengaruh pH media pertumbuhan ini disajikan pada Gambar 4.

Tingkat keasaman (pH) media untuk produksi lipase jamur *R. oryzae* termofil optimum pada pH 5 (Salleh *et al.*, 1993), sedangkan Mukhamedzanova dan Bezborodov dalam Salleh *et al.* (1993) melaporkan pH antara 7,0 dan 7,2 untuk *R. oryzae* 1414. Nahas dalam Salleh *et al.* (1993) melaporkan pH optimum untuk produksi lipase dari *R. oligosporus* adalah 6,0.

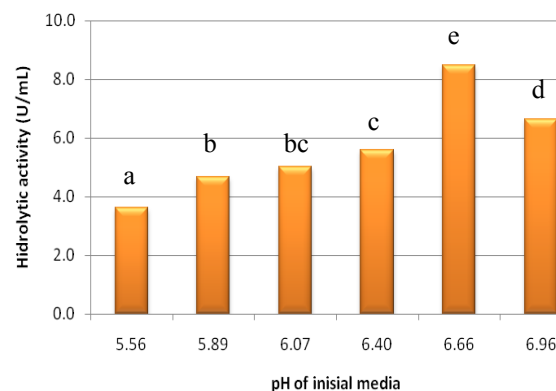


Figure 4. Effect of pH media on lipase production from *Rhizopus oligosporus* RG2 isolate. Test condition: suhu 50 °C, pH 7.0. Growth condition: medium BSM + 5 % sesame cake, temp 30 °C for 3 days, shaken using rotary shaker at 150 rpm. Data followed by the same character is not significantly differ under LSD test at $\alpha = 5\%$

Variasi Suhu Pertumbuhan

Percobaan dilakukan menggunakan 100 mL media B (pH 6,6) diinokulasi dengan 10 mL starter sehingga konsentrasi akhir spora adalah 10⁴ yang ditumbuhkan selama 3 hari dengan goyangan menggunakan rotary shaker 150 rpm. Suhu yang dipelajari adalah 30, 40 dan 50 °C.

Isolat *Rhizopus oligosporus* dapat tumbuh pada suhu 30 dan 40 °C, tetapi tidak pada suhu 50 °C. Pada suhu 50 °C isolat *Rhizopus oligosporus* juga tidak dapat tumbuh pada media padat. *R. oligosporus* yang ditumbuhkan dalam media B pada suhu pertumbuhan 30 dan 40 °C memberikan perbedaan produksi lipase, walaupun inkubasi pada suhu 40 °C menurunkan produksi lipase, tetapi perbedaan ini tidak signifikan secara statistik (P > 0,05). Data pengaruh suhu pertumbuhan terhadap

produksi lipase dari *R. oligosporus* disajikan pada Tabel 3.

Produksi lipase maksimum untuk ekstraselluler lipase dari *R. oryzae* termofil diperoleh pada suhu 45 °C setelah 72 jam inkubasi (Salleh *et al.*, 1993), sedangkan *R. oryzae* sp. yang lain memproduksi lipase optimum pada suhu inkubasi 25-30 °C (Nahas dalam Salleh *et al.*, 1993).

Table 3. Effect of growth temperature on lipase production from *Rhizopus oligosporus* RG2 isolate

Suhu pertumbuhan (°C)	Aktivitas hidrolitik (U/mL)
30	8,53
40	7,19
50	(isolat tdk tumbuh)

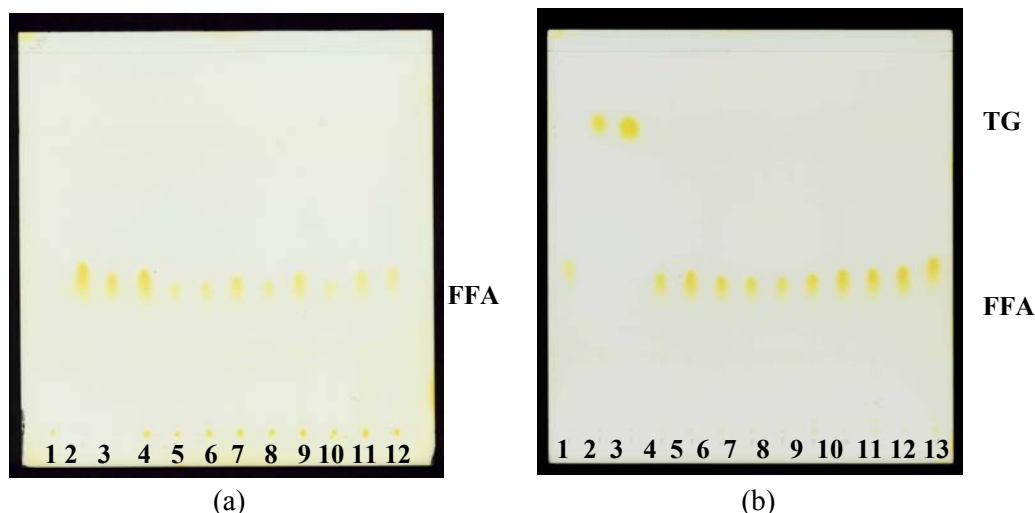


Figure 5. Diagram TLC of esterification of crude extracellular from *R. oligosporus* RG2

Note (a):

- | | | |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1. Gliserol 10 % | 6. Control 150 µL, 12 h | 10. Control 150µL, 36 h |
| 2. Oleic acid 10 % | 7. Sampel 150 µL, 24 h | 11. Sampel 150 µL, 48 jam |
| 3. Oleic acid 10 % | 8. Control 150 µL, 24 h | 12. Control 150µL, 48 jam |
| 4. Sampel 150 µL, 0 h | 9. Sampel 150 µL, 36 h | |
| 5. Sampel 150µL, 12 h | | |

Note (b)

- | | | |
|------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1. Oleic acid 10 % | 6. Control 150 µL, 8 h | 10. Control 600 timun laut |
| 2. Olive oil 10 % | 7. Sampel 150 µL, 8 h | 11. Sampel 600 µL, 48 h |
| 3. Triolein 10 % | 8. Control 300 µL, 48 h | 12. Sampel 900µL, 48 h |
| 4. Control 150 µL, 4 h | 9. Sampel 300 µL, 50 h | 13. Sampel 900µL, 48 jam |
| 5. Sampel 150µL, 4 h | | |

Kontrol = aquadest; sampel = lipase ekstraseluler kasar dari *R. oiligosporus* RG2; 0-48 jam = lama fermentasi

Aktivitas Esterifikasi Lipase dari Isolat *R. oligosporus*

Dalam penelitian ini proses esterifikasi gliserol dengan asam oleat dilaksanakan dalam pelarut organik isooktan dengan penambahan 5 % lipase ekstraseluler kasar dari isolat *R. oligosporus* RG2 yang diproduksi pada kondisi produksi optimum. Hasil reaksi dengan lama inkubasi (0, 4, 8, 12, 36, dan 48 jam) menunjukkan tidak adanya produk / ester yang terbentuk (Gambar 5a), demikian pula setelah jumlah lipase ekstraseluler kasar yang digunakan ditingkatkan sampai 30 % (lama inkubasi 48 jam) tidak memperlihatkan adanya ester yang terbentuk (Gambar 5b).

Pada Gambar 5a, terlihat bahwa spot dengan nomor 4-12 (menunjukkan berbagai variasi waktu esterifikasi), setelah melalui proses pemisahan pada plat TLC dengan larutan pengembang campuran PE/DE/Asam asetat glasial = 85:35:1, memiliki nilai Rf yang sama dengan Rf asam oleat standar (spot nomor 2 dan 3). Tidak terdeteksi adanya senyawa lain yang nilai Rf nya berbeda. Demikian pula terlihat pada Gambar 5b, dengan spot nomor 8-13 menunjukkan berbagai variasi jumlah enzim yang ditambahkan ke dalam campuran reaksi esterifikasi (10, 20 dan 30 %), nilai Rf nya sama dengan Rf asam oleat standar pada spot nomor 1. Tidak terdeteksi adanya nilai Rf yang sama dengan Rf minyak zaitun dan triolein standar (spot nomor 2 dan 3). Hal ini menunjukkan tidak terjadinya proses esterifikasi antara asam oleat dan gliserol.

Yesiloglu dan Kilic (2004) melaporkan bahwa reaksi esterifikasi gliserol dengan asam oleat yang dikatalisis oleh lipase dari *Candida rugosa* dipengaruhi oleh pelarut organik, kandungan air, jumlah gliserol dan suhu reaksi, dimana kondisi optimum diperoleh jika menggunakan pelarut organik isooktan, kandungan air 5 % dari volume pelarut organik, jumlah gliserol sebesar 2 g dan suhu 30 °C. Lipase yang digunakan dalam bentuk bubuk kering murni (0,1 g). Dari data yang telah dilaporkan oleh Yesiloglu dan Kilic (2004) tersebut ada kemungkinan tidak terbentuknya produk ester pada penelitian ini disebabkan karena lipase yang digunakan adalah lipase kasar sehingga jumlah yang diperlukan untuk dapat

menjalankan aktivitas esterifikasi belum mencukupi. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut dengan menggunakan lipase ekstraseluler isolat *R. oligosporus* RG2, yang telah dimurnikan dan diperlukan optimasi kondisi esterifikasinya.

KESIMPULAN

Konsentrasi spora awal tidak mempengaruhi produksi lipase dari *R. oligosporus* RG2 pada fermentasi cair, sedangkan jenis media, lama fermentasi dan suhu pertumbuhan memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$). Sumber N organik (biji dan bungkil wijen wijen) memberikan produksi lipase yang lebih tinggi dibanding sumber N anorganik (NH_4Cl), demikian pula terhadap sumber N organik lain seperti pepton dan ekstrak khamir. Metode produksi lipase ekstraseluler dari *R. oligosporus* RG2 dengan cara fermentasi cair, yang paling baik adalah menggunakan media mengandung bungkil wijen 5 %, pH media 6,6, lama fermentasi 3 hari dan pengocokan 150 rpm serta suhu pertumbuhan antara 30-40 °C. Tidak terdeteksi adanya aktivitas esterifikasi dari enzim ekstraseluler kasar yang dihasilkan oleh *R. oligosporus* RG2.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigor RD, Uadia PO, Foglia TA, Hass MJ, Scott K, Savary BJ (2002) Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. *JAOCs* 79(11): 1123-1126.
- Badan Pusat Statistik (2002) Statistik perdagangan luar negeri Indonesia: Ekspor. Vol. 1. Badan Pusat Statistik Indonesia, Jakarta.
- Badan Pusat Statistik (2003) Statistik perdagangan luar negeri Indonesia: Ekspor. Vol. 1. Badan Pusat Statistik Indonesia, Jakarta.
- Cardenas F, de Castro MS, Sanchez-Montero JM, Sinistera JV, Valmaseda M, Elson SW, Alvarez E (2001) Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 145-154.

- Corzo G, Revah S (1999) Production and characterization of the lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 70: 173-180.
- Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C (2000) Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 657-663.
- Gunstone FD (1996) Fatty acid and lipid chemistry. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Hiol A, Jonzo MD, Druet D, Comeau L (1999) Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbiol Technology* 25: 80-87.
- Kohno M, Kugiyama W, Hashimoto Y, Morita Y (1994) Purification, characterization, and Crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. *Biosci Biotech Biochem* 58(6): 1007-1012.
- Lima VMG, Krieger N, Sarquis MIM, Mitchel DA, Ramos LP, Fontana JD (2003) Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol* 41(2): 105-110.
- Marseno DW, Indrati R, Ohta Y (1998) A simplified method for determination of free fatty acids for soluble and immobilized lipase assay. *Indonesian Food and Nutrition Progress* 5(2): 79-83.
- Miranda OA, Salgueiro AA, Pimentel, MCB, Lima Filho JL, Melo EHM, Durán N (1999) Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technol* 69:145-147.
- Mohamed MA, Mohamed TM, Mohamed SA, Fahmy AS (2000) Distribution of lipases in the *Gramineae*. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technol* 73: 227-234.
- Ruiz B, Farrés A, Langley E, Masso F, Sánchez S (2001) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. *Lipids* 36(3): 283-289.
- Salleh AB, Musani R, Basri M, Ampon K, Yunus WMZ, Razak CNA (1993) Extra- and intracellular lipases from a thermo-philic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can J Microbiol* 39: 978-981.
- Thirstrup K, Carrière F, Hjorth S, Rasmussen PB, Wöldike H, Nielsen PF, Thim L (1993) One-step purification and characterization of human pancreatic lipase expressed in insect cells. *FEBS* 327(1): 79-84.
- Valero F, del Rio JL, Poch M, Solà C (1991) Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. *J Ferment and Bioeng* 72(5): 399-401.
- Yesiloglu Y, Kilic I (2004) Lipase-catalyzed esterification of glycerol and oleic acid. *JAACS* 81(3): 281-284.

PEDOMAN PENULISAN

Jurnal Teknologi Pertanian

Universitas Mulawarman

Pengiriman

Jurnal Teknologi Pertanian Universitas Mulawarman menerima naskah berupa artikel hasil penelitian dan ulasan balik (*review*) yang belum pernah dipublikasikan pada majalah/jurnal lain. Penulis diminta mengirimkan tiga eksemplar naskah asli beserta *softcopy* dalam disket yang ditulis dengan program *Microsoft Word*. Naskah dan disket dikirimkan kepada:

Editor Jurnal Teknologi Pertanian

d. a. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian
Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian
Universitas Mulawarman
Jalan Pasir Belengkong
Samarinda 75123

Format

Umum. Naskah diketik dua spasi pada kertas A4 dengan tepi atas dan kiri 3 centimeter, kanan dan bawah 2 centimeter menggunakan huruf *Times New Roman 12 point*, maksimum 12 halaman. Setiap halaman diberi nomor secara berurutan. Ulasan balik ditulis sebagai naskah sinambung tanpa subjudul Bahan dan Metode, Hasil dan Pembahasan. Selanjutnya susunan naskah dibuat sebagai berikut :

Judul. Pada halaman judul tuliskan judul, nama setiap penulis, nama dan alamat institusi masing-masing penulis, dan catatan kaki yang berisi nama, alamat, nomor telepon dan faks serta alamat E-mail jika ada dari *corresponding author*. Jika naskah ditulis dalam bahasa Indonesia tuliskan judul dalam bahasa Indonesia diikuti judul dalam bahasa Inggris.

Abstrak. Abstrak ditulis dalam bahasa Inggris dengan judul "ABSTRACT" maksimum 250 kata. Kata kunci dengan judul "Key word" ditulis dalam bahasa Inggris di bawah abstrak.

Pendahuluan. Berisi latar belakang dan tujuan.

Bahan dan Metode. Berisi informasi teknis sehingga percobaan dapat diulangi dengan teknik yang dikemukakan. Metode diuraikan secara lengkap jika metode yang digunakan adalah metode baru.

Hasil. Berisi hanya hasil-hasil penelitian baik yang disajikan dalam bentuk tubuh tulisan, tabel, maupun gambar. Foto dicetak hitam-putih pada kertas licin berukuran setengah kartu pos.

Pembahasan. Berisi interpretasi dari hasil penelitian yang diperoleh dan dikaitkan dengan hasil-hasil penelitian yang pernah dilaporkan (publikasi).

Ucapan Terima Kasih. Digunakan untuk menyebutkan sumber dana penelitian dan untuk memberikan penghargaan kepada beberapa institusi atau orang yang membantu dalam pelaksanaan penelitian dan atau penulisan laporan.

Daftar Pustaka. Daftar Pustaka ditulis memakai sistem nama tahun dan disusun secara abjad. Beberapa contoh penulisan sumber acuan:

Jurnal

Wang SS, Chiang WC, Zhao BL, Zheng X, Kim IH (1991) Experimental analysis and computer simulation of starch-water interaction. *J Food Sci* 56: 121-129.

Buku

Charley H, Weaver C (1998) *Food a Scientific Approach*. Prentice-Hall Inc USA

Bab dalam Buku

Gordon J, Davis E (1998) Water migration and food storage stability. Dalam: *Food Storage Stability*. Taub I, Singh R. (eds.), CRC Press LLC.

Abstrak

Rusmana I, Hadioetomo RS (1991) *Bacillus thuringiensis* Berl. dari peternakan ulat sutera dan toksisitasnya. Abstrak Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. Bogor 2-3 Des 1991 hA-26.

Prosiding

Prabowo S, Zuheid N, Haryadi (2002) Aroma nasi: Perubahan setelah disimpan dalam wadah dengan suhu terkendali. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional PATPI*. Malang 30-31 Juli 2002 hA48.

Skripsi/Tesis/Disertasi

Meliana B (1985) Pengaruh rasio udang dan tapioka terhadap sifat-sifat kerupuk udang. Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian UGM Yogyakarta.

Informasi dari Internet

Hansen L (1999) Non-target effects of Bt corn pollen on the Monarch butterfly (Lepidoptera: Danaidae). <http://www.ent.iastate.edu/entsoc/ncb99/pr og/abs/D81.html> [21 Agu 1999].

Bagi yang naskahnya dimuat, penulis dikenakan biaya Rp 75.000,00 (tujuh puluh lima ribu rupiah).

Hal lain yang belum termasuk dalam petunjuk penulisan ini dapat ditanyakan langsung kepada REDAKSI JTP