

Karakterisasi gen penyandi lipase dari kapang *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera*

Characterization of gene encoding lipase from *Rhizopus oryzae* and *Absidia corymbifera*

Riza A. PUTRANTO, Djoko SANTOSO, TRI-PANJI,
SUHARYANTO & Asmini BUDIANI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

Summary

Lipase is a group of enzymes which catalyze fat hydrolysis. Lipase is recently used to produce diacylglycerol (DAG) from triacylglycerol (TAG). Lipase can be used to produce healthy oil. Having a rich biodiversity, Indonesia has the opportunity to produce lipase using indigenous microbes, such as molds. This research aimed to detect LIPASE gene on several strains of molds employing PCR technique. Genomic DNAs were isolated from four strains of molds (M. sitophila, R. oryzae, R. microsporus, and A. corymbifera). Heterologous primers for LIPASE were designed based on the conserved region of 12 LIPASE sequences accessed from GenBank and used to amplify the genomic DNA resulted in a 466 bp fragment. BLAST analysis showed that the bands of DNAs have high homology with common lipase protein in several strains of Rhizopus.

[Key words : LIPASE gene, molds, PCR, DNA detection]

Ringkasan

Lipase merupakan kelompok enzim yang berfungsi sebagai biokatalis hidrolisis lemak. Lipase banyak digunakan untuk konversi triasilgliserol (TAG) menjadi diasilgliserol (DAG). Penggunaan lipase penting untuk produksi minyak sehat (*healthy oil*). Indonesia dengan keanekaragaman hayati tinggi berpeluang besar mengembangkan produksi lipase dari mikroba lokal, salah satunya adalah kapang. Deteksi gen merupakan langkah awal dalam

upaya peningkatan produksi lipase melalui rekayasa genetika. DNA genomik empat galur kapang (*M. sitophila*, *R. oryzae*, *R. microsporus*, dan *A. corymbifera*) telah berhasil diisolasi. Sepasang primer heterologous telah berhasil dirancang berdasarkan daerah terkonservasi 12 sekuen gen LIPASE dari GenBank. Amplikon DNA yang diperoleh pada PCR menggunakan pasangan primer RLP memiliki panjang 466 bp. Analisis BLAST memperlihatkan bahwa amplikon PCR memiliki homologi yang tinggi dengan protein LIPASE beberapa galur *Rhizopus*.

Pendahuluan

Lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis lemak, mono-, di-, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Suzuki *et al.*, 1988; Kosugi *et al.* 1990). Enzim ini juga digunakan dalam hidrolisis triasilgliserol (TAG) menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan asam lemak bebas (Winarno, 1986). DAG adalah ester gliserol dengan dua molekul asam lemak. DAG digunakan sebagai bahan pengemulsi dan penstabil produk-produk makanan, kosmetika, dan farmasetika. Lipase terbukti dapat digunakan sebagai biokatalis untuk meningkatkan kualitas *crude palm oil* (CPO) yang lebih baik yaitu minyak sehat (*healthy oil*). *Healthy Econa Cooking Oil* telah diproduksi

massal pada tahun 2001 oleh Kao Industries of Japan bekerjasama dengan Novozymes, Co. Bahan utama yang terkandung di dalam minyak ini adalah DAG yang dibuat secara enzimatis menggunakan minyak murni. Dalam jangka panjang minyak ini mampu mencegah peningkatan lemak tubuh, terutama lemak yang terdeposit dalam organ internal (Kao Corporation, 2004). Contoh lain dari *healthy oil* yang telah beredar di pasaran internasional adalah *Evona Oil* dan *Bio-Oil*.

Produksi lipase telah dilakukan di beberapa negara maju. Harga lipase impor relatif mahal, misalnya harga lipase dengan merk dagang *Lipozyme IM*, *BIO-lipase*, dan *Lipolase* mencapai 25 juta rupiah per kg (Kao Corporation, 2004). Indonesia dengan keanekaragaman hayatinya berpeluang besar untuk mengembangkan produksi lipase dari mikroba lokal. Eksplorasi mikroba lipolitik lokal telah banyak dilakukan, namun hingga saat ini lipase komersial belum terdapat di pasaran. Kondisi kultur optimum untuk mikroba sumber belum ditemukan, sehingga penggunaan isolat alami sebagai sumber lipase memiliki daya hasil yang relatif rendah. Kapang merupakan mikroba yang 80% kebutuhan substratnya dipenuhi oleh makromolekul yang memiliki rantai karbon. Beberapa jenis kapang diketahui tumbuh pada habitat yang mengandung minyak, misalnya tandan kelapa sawit. Beberapa kapang penghasil lipase antara lain adalah *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Monilia sitophila*, *Rhizopus delemar*, dan *R. javanicus* (Onions *et al.*, 1981 & Yamane, 1987).

Nining (2005) memperlihatkan bahwa *M. sitophila* mampu mengubah CPO menjadi DAG dan produk samping asam lemak. Lipase yang berasal dari mikroba umumnya bersifat ekstraseluler. Isolasi gen yang menyandi protein lipase merupakan

salah satu langkah awal produksi lipase dalam skala besar melalui rekayasa genetika. White *et al.* (1990) mengemukakan bahwa *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode deteksi yang tergolong mudah untuk mengetahui keberadaan gen target di dalam organisme uji. Pasangan primer heterologous yang dirancang berdasarkan daerah terkonservasi pada gen target dapat digunakan dalam PCR tersebut. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi dan mengkarakterisasi gen *LIPASE* pada beberapa galur kapang.

Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan adalah miselium empat galur kapang koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia yaitu *Monilia sitophila*, *Rhizopus oryzae*, *R. microsporus*, dan *Absidia corymbifera* yang berumur 48-72 jam inkubasi pada suhu 37°C dalam kultur cair *Yeast Malt Extract*. Reagen PCR yang digunakan diperoleh dari Promega (WI, USA). Primer PCR (*ITS-4*, *ITS-5*, dan *RLP*) dan bahan-bahan kimia lain diperoleh dari Sigma Chem. Co. dan perusahaan lokal.

Perancangan primer heterologous dengan menggunakan pendekatan bioinformatika

Pengumpulan data sekuen nukleotida lipase berbagai kapang diperoleh dari database di situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Konversi sekuen nukleotida menjadi sekuen asam amino dilakukan menggunakan program Bioedit 7.0 dengan memperhatikan adanya mekanisme *splicing* (penghilangan intron). Pencarian daerah konservatif (homologi tinggi) berdasarkan penjajaran sekuen asam amino, yang dianalisis menggunakan

Karakterisasi gen penyandi Lipase dari kapang....

algoritma Clustal-W. Setelah diperoleh *output* dari program Clustal-W, sekuen asam amino kembali dikonversi menjadi sekuen nukleotida. Sekuen yang mengandung daerah konservatif, diproses dengan menggunakan program Primer3 untuk perancangan primer. Dari program Primer3 diperoleh beberapa pasang sekuen primer.

Isolasi DNA genomik

Isolasi DNA genomik empat galur kapang dilakukan menggunakan metode Moller *et al.* (1992) yang dimodifikasi. Di dalam mortar, sebanyak 1-2 gram miselium ditambahkan 0,1- 0,2 gram Polyvinylpirrolidone (PVPP) dan N₂ cair kemudian digerus. Serbuk halus yang dihasilkan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5-10 mL bufer ekstraksi (1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0, 10% SDS) dan ditambahkan 0,1 gram Proteinase K kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 60 menit. Dalam kurun waktu inkubasi dilakukan dua kali vortex. Setelah dicampur dengan 1,4 mL 5N NaCl dan 650 µL 10% CTAB kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit.

Pemisahan protein dilakukan dengan penambahan 1 volume kloroform : isoamil-alkohol (24:1), diinkubasi di dalam es selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada 13000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Ekstraksi diulang sebanyak tiga kali. Supernatan (600 µL) diambil secara hati-hati dan dipindahkan ke dalam tabung mikro-sentrifugasi baru yang telah mengandung 2,25 mL 5M Ammonium asetat pH 7,0, kemudian diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah itu pengendapan DNA dilakukan dengan sentrifugasi pada 13000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Setelah

supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 500 µL isopropanol kemudian dibolak-balik beberapa kali, dan didiamkan dalam es selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan pada 13000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Ke dalam pelet ditambahkan 1 volume 70% ethanol dingin untuk pengendapan DNA. Kemudian endapan DNA dipisahkan dengan sentrifugasi pada 8000 rpm dengan suhu 4°C selama lima menit. Sisa etanol dibuang, dan pelet dikering anginkan hingga bau etanol tidak tercium lagi. Pelet DNA diresuspendikan kembali dalam 5 µL H₂O bebas nuklease. Penentuan kuantitas DNA dilakukan dengan spektrofotometer.

Reaksi PCR

Analisis PCR dilakukan dengan total reaksi 25 µL, yang mengandung 1,5 µL MgCl₂, 2,5 bufer ekstraksi 10X, 0,5 dNTPs 10µM, 0,5 µL *Taq DNA Polymerase* 5u/µL, 17 µL ddH₂O, 2 µL primer (*reverse* dan *forward*). Program PCR terdiri dari *pre-denaturation* suhu 95°C selama lima menit, dan 35 siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan pada suhu 50 °C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 90 detik. Pada tahap akhir proses PCR dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama lima menit. Sebanyak 5 µL hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,2 %.

Sekuensing dan Analisis BLAST

Sekuensing dilakukan di BPPT Puspiptek Serpong. Analisis BLAST dilakukan menggunakan program pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA genomik

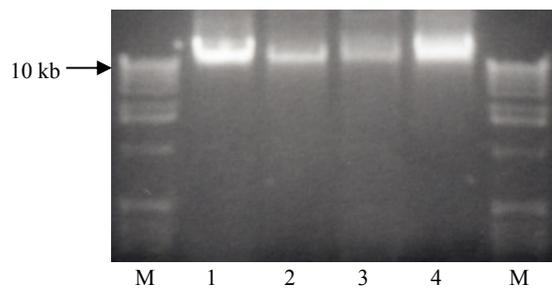
DNA genomik telah berhasil diisolasi dari empat galur kapang yaitu *M. sitophila*, *R. oryzae*, *R. microsporus*, dan *A. corymbifera*. DNA hasil isolasi dengan prosedur Moller *et al.* (1992) yang dimodifikasi disajikan pada Gambar 1. Hasil pengujian spektrofotometri (Tabel 1) menunjukkan bahwa DNA memiliki kualitas yang baik dengan tingkat kemurnian tinggi. Rasio serapan A260/280 $\geq 1,80$ menunjukkan bahwa DNA murni dari protein sedangkan rasio A260/230 $\geq 1,00$ menunjukkan bahwa DNA murni dari polisakarida (Moller *et al.*, 1992; Cote *et al.*, 2004). Pada

penelitian ini DNA dari *R. oryzae* mempunyai rasio A260/280 diatas 1,80 dan rasio A260/230 diatas satu, ini menunjukkan bahwa DNA tersebut memiliki tingkat kemurnian yang tinggi. Keempat DNA kapang tersebut memiliki rasio A260/230 diatas satu yang menunjukkan bahwa DNA telah berhasil dimurnikan dari polisakarida. Prosedur ini memiliki tingkat konsistensi yang tinggi, sehingga percobaan ulangan selalu memberikan hasil isolasi yang konsisten. Tingkat kesulitan tertinggi dalam isolasi DNA kapang adalah pada tingginya kandungan polifenol dan polisakarida yang harus dipisahkan. Secara sederhana kesulitan ini dapat diatasi dengan ekstraksi kloroform: isoamilalkohol (24:1) yang diulang

Tabel 1. Kualitas dan kuantitas DNA genomik yang diisolasi dari empat galur kapang.

Table 1. Quantity and quality genomic DNA isolated from four strains of molds.

Galur kapang (<i>Strains</i>)	Rasio serapan <i>Absorbance ratio</i> (nm)		Kuantitas (<i>Quantity</i>) ($\mu\text{g/mL}$)
	A260/280	A260/230	
<i>M. sitophila</i>	1,798	1,330	2456
<i>R. oryzae</i>	1,991	1,391	2440
<i>R. microsporus</i>	1,761	1,237	2435
<i>A. corymbifera</i>	1,489	1,067	3445



Gambar 1. Profil DNA genomik empat galur kapang. (M) marka DNA 1 kb; (lajur 1) *M. sitophila* (24,560 μg), (2) *R. oryzae* (24,400 μg), (3) *R. Microsporus* (24,350 μg), (4) *A. corymbifera* (34,450 μg).

Figure 1. Genomic DNA profile of four mold strains. (M) 1 kb marker ladder; (lane 1) *M. sitophila*, (24.560 μg), (2) *R. oryzae* (24.400 μg), (3) *R. microsporus* (24.350 μg), (4) *A. corymbifera* (34.450 μg).

Karakterisasi gen penyandi Lipase dari kapang....

sebanyak tiga kali. Masalah lain yang dihadapi adalah DNA sukar mengendap dengan sempurna. Masalah ini dapat diatasi dengan penambahan senyawa organik 5 M ammonium asetat pH 7. Secara kuantitas, rendemen DNA yang diperoleh cukup tinggi, yaitu 2000-3500 µg/mL per 1-2 gram sampel miselium.

Perancangan primer heterologous

Dua belas sekuen gen *LIPASE* dari dua belas galur kapang dengan nomer assesinya DQ080073, AY513724, AF229435, E11105, D13206, AB013496, E03934, AY303124, D90315, AF330635, AF288219, dan AF288685 digunakan untuk mendesain primer *RLP* untuk amplifikasi gen *LIPASE*. Hasil penjarangan (*alignment*) dengan Clustal-W memperlihatkan bahwa sekuen-sekuen gen *LIPASE* tersebut memiliki daerah terkonservasi yang relatif panjang. Perancangan primer disesuaikan dengan mengambil daerah terkonservasi (Hughes *et al.*, 2000). Pemilihan *melting temperature* (T_m) dan kandungan GC diusahakan tidak berbeda jauh. Tabel 2. menunjukkan karakteristik primer *RLP* hasil rancangan berdasarkan dua belas sekuen gen *LIPASE* dari *GenBank*.

Amplifikasi gen *LIPASE*

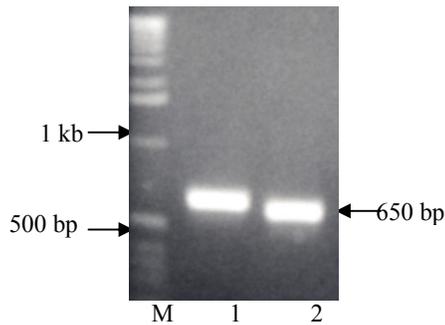
Untuk lebih memastikan kualitas DNA genomik kapang maka dilakukan PCR dengan primer *universal ITS-4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') dan *ITS-5* (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990). Amplifikasi DNA *M. sitophila* dan *R. oryzae* dengan pasangan primer tersebut menghasilkan fragmen DNA yang sangat jelas dengan ukuran sekitar 650 bp (Gambar 2). Kedua kapang lain *R. microsporus* dan *A. corymbifera* juga menunjukkan hasil yang sama (data tidak ditampilkan). Fragmen ITS tersebut digunakan sebagai marka positif reaksi PCR.

Amplifikasi DNA keempat galur kapang diuji dengan pasangan primer *RLP* hanya menghasilkan fragmen DNA pada DNA *R. oryzae* dan *A. corymbifera* (Gambar 3.). Sekuensing kedua amplicon *R. oryzae* dan *A. corymbifera* telah berhasil dilakukan. Sekuen protein selanjutnya disebut *AcLIP* dan *RoLIP*. Hasil analisis BLASTx menunjukkan bahwa kedua protein tersebut memiliki homologi tinggi (90-99% asam amino) dengan protein *Rhizopus niveus lipase*

Tabel 2. Karakteristik pasangan primer *RLP* hasil rancangan berdasarkan 12 sekuen gen *LIPASE* dari *GenBank*.

Table 2. Characteristics *RLP* primer pair design based on 12 sequences *LIPASE* gene from *GenBank*.

Sekuen/Sequences	T_m (°C)	Konsentrasi Quantity (nmol)	%GC	Produk/ Product size (bp)
<i>RLP-F</i> : 5'-ACTTGGTTGGTGGCATGACTTT-3'	66,5	46,9	45,45	466
<i>RLP-R</i> : 5'-TGTTCTTGGACGACAGGGAAT-3'	66,6	41,8	45,45	

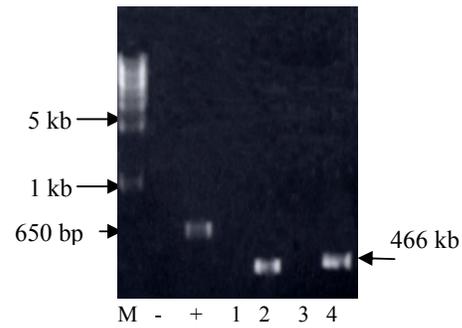


Gambar 2. Amplifikasi DNA kapang dengan primer ITS-4 dan ITS-5 (M) marka DNA 1 kb (1) *M. sitophila* (2) *R. oryzae*.

Figure 2. Amplification of mold DNA using ITS-4 and ITS-5 primers (M) 1 kb marker ladder, (1) *M. sitophila*, (2) *R. oryzae*.

RNL (AAC60540.2), lipase *Rhizopus niveus* (BAA31548.1), lipase precursor *R. oryzae* (AAF32408.1), dan lipadyou-2 *R. oryzae* (AAS84458.1) (Gambar 4). Hasil penjajaran protein menunjukkan bahwa urutan asam amino berbeda di tiga posisi yaitu asam amino ke-257, 348, dan 377 (Gambar 4). Fadiloğlu & Erkmen (1999) mengemukakan perbedaan pada asam amino kemungkinan berpengaruh pada bentuk, struktur, dan reaktivitas protein tersebut.

Dari dua fragmen gen penyandi protein lipase yang telah diketahui identitasnya (AcLIP dan RoLIP), pohon filogenetis lebih memperjelas hubungan kekerabatan keduanya. Keduanya berada dalam *cluster* yang sama (Gambar 5). AcLIP lebih dekat dengan *cluster R. niveus* dan RoLIP lebih dekat dengan *R. oryzae*. Meskipun demikian hasil penjajaran Clustal-W sebelumnya memperlihatkan tingkat homologi yang tinggi (96-99%) antara kedua gen-gen dalam *cluster*. Boleh dikatakan kedua gen tersebut adalah satu jenis protein yang sama apabila



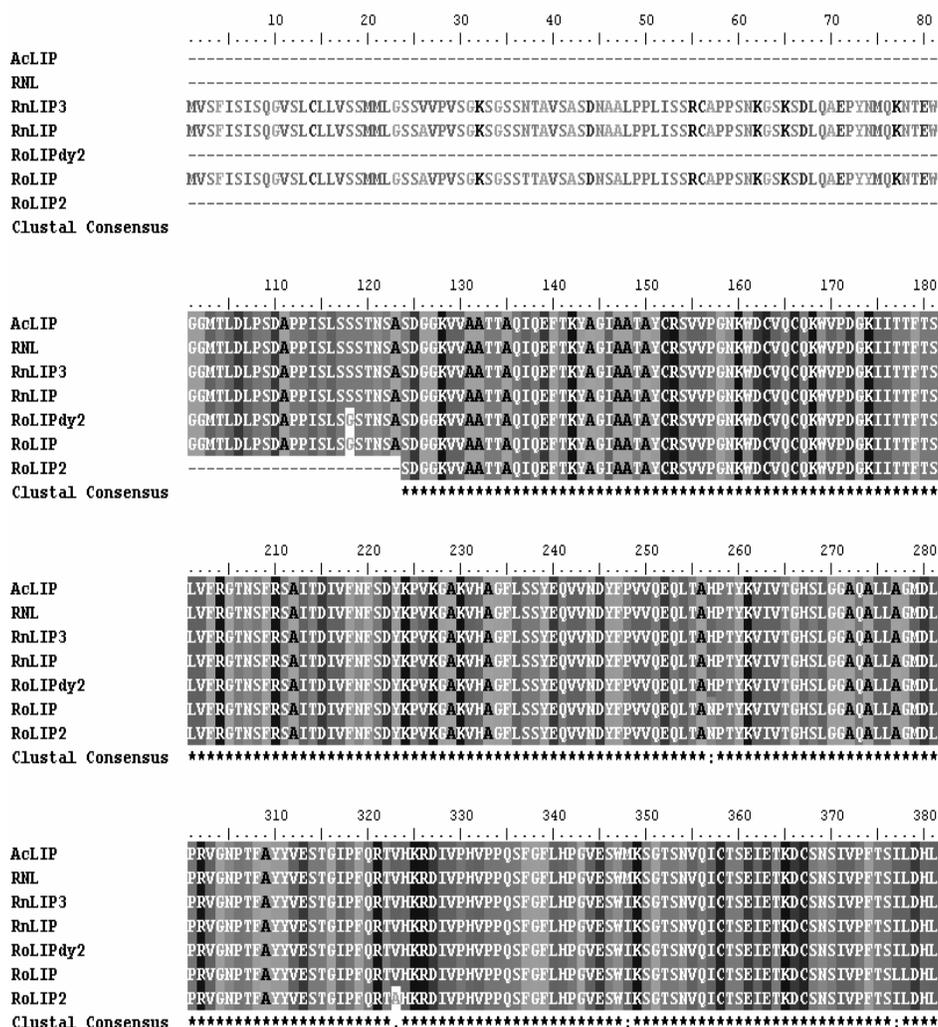
Gambar 3. Amplifikasi DNA kapang dengan pasangan primer RLP, suhu penempelan 60°C (M) marka DNA 1 kb, (-) kontrol negatif, (+) kontrol positif (1) *M. sitophila* (2) *R. oryzae*, (3) *R. microsporus* (4) *A. corymbifera*.

Figure 3. Amplification mold with pair of RLP primers, annealing at 60°C (M) 1 kb marker ladder, (-) negative control, (+) positive control, (1.) *M. sitophila*, (2) *R. oryzae*, (3.) *R. microsporus*, (4) *A. corymbifera*

ditranslasikan. Lipase merupakan enzim yang memiliki karakter spesifik tergantung organisme penghasilnya. Beberapa lipase yang dihasilkan organisme-organisme dalam satu genus juga memiliki karakter berbeda meskipun secara umum memiliki motif asam amino yang sama untuk tiap organisme. Motif asam amino ini berupa urutan asam amino Glisin-X-Serin-X-Glisin (G-X-S-X-G) yang juga merupakan sisi aktif dari enzim ini, dimana X dapat digantikan oleh Histidin, Leusin, atau Tirosin (Salomon, 2003). Pengaruh lingkungan kemungkinan turut memberikan peranan terhadap organisme penghasil lipase.

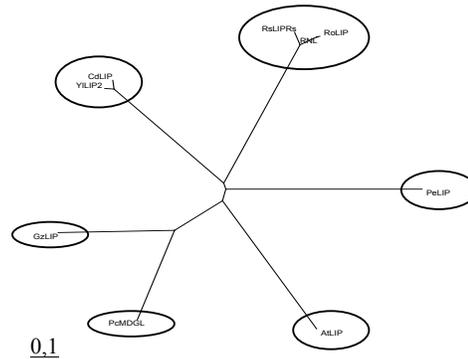
Usaha untuk mendapatkan produk *healthy oil* memerlukan spesifitas kinerja enzim lipase. Penggunaan lipase yang lebih spesifik akan memperkecil kemungkinan

Karakterisasi gen penyandi Lipase dari kapang....



Gambar 4. Penjajaran asam amino dari AcLIP, RoLIP dan homolognya (untuk nomor asesi, lihat text). RNL = lipase *Rhizopus niveus*; RnLIP3 = lipase-3 *R. niveus*; RnLIP = lipase prekursor *R. niveus*; RoLIPdy2 = lipadyou-2 *R. oryzae*; RoLIP2 = lipase prekursor *R. oryzae*.

Figure 4. Amino acid alignment of AcLIP and its closest homologues (for accession numbers, see the text). RNL = *Rhizopus niveus* lipase; RnLIP3 = *R. niveus* lipase-3; RnLIP = *R. niveus* lipase precursor; RoLIPdy2 = *R. oryzae* Lipadyou-2; RoLIP2 = *R. oryzae* lipase precursor.



Gambar 5. Pohon filogenetis dari RoLIP terhadap beberapa protein lipase pada beberapa galur mikroba terdekat. RNL= lipase *Rhizopus niveus*; RoLIP = lipase prekursor *R. oryzae*; RnLIPRs = lipase lipRs *R.stolonifer*; CdLIP = lipase *Candida deformans* untuk DAG; YILIP2=*Yarrowia lipolytica* YILIP2; PeLIP= lipase prekursor *Penicillium expansum*; GzLIP = lipase *Gibberella zeae*; PcMDGL = lipase *Penicillium camembertii* m1A untuk mono- dan DAG; AtLIP = lipase *Aspergillus tubingensis*

Figure 5. Phylogenetic tree of RoLIP and several lipase protein of closest microbe strains. RNL=Rhizopus niveus lipase; RoLIP =R. oryzae lipase precursor; RnLIPRs =R. stolonifer lipase lipRs; CdLIP =Candida deformans DAG lipase; YILIP2=Yarrowia lipolytica YILIP2; PeLIP =Penicillium expansum lipase precursor; GzLIP =Gibberella zeae lipase; PcMDGL =Penicillium camembertii m1A for mono- and DAG lipase; AtLIP =Aspergillus tubingensis lipase.

kesalahan pada produk diperoleh. Rekayasa secara molekuler lebih mudah dilakukan daripada melakukan perubahan secara fisik menggunakan enzim regiospesifik (Elisabeth *et al.*, 1998). Penggunaan enzim regio-spesifik memerlukan biaya yang tidak sedikit sehingga nilai penting menemukan gen lipase spesifik dalam genom sangat tinggi. Sebagai contoh, *LIPASE* 1,3-digliserida merupakan gen yang menyandi 1,3-diasilgliserol (1,3-DAG). Produk spesifik *healthy oil* yang sekarang ini beredar di pasaran luar negeri memiliki kandungan DAG sekitar 60-80% (AOCS, 2004). AcLIP dan RoLIP merupakan fragmen gen yang menyandi lipase non-spesifik. Berdasarkan pohon filogenetis, fragmen gen *LIPASE* nampaknya memiliki homologi yang rendah

dengan gen *PcMDGL* (*Penicillium camembertii* m1A untuk mono- dan DAG lipase) yang menyandi lipase spesifik 1,3-digliserida (Gambar 5). Yamaguchi & Mase (1990) mengemukakan bahwa lipase yang dihasilkan dari gen *PcMDGL* memiliki dua bentuk yaitu tipe A dan tipe B dengan berat molekul yang hampir sama (37,000–39,000 Da). Motif asam amino kedua tipe lipase tersebut identik, namun tipe B lebih spesifik dalam menghasilkan DAG. Amplifikasi gen *PcMDGL* akan memberikan informasi yang baik dalam usaha mendapatkan produk lipase spesifik. Sesuai hasil pada penelitian ini, nampaknya homologi merupakan faktor yang penting untuk mendapatkan amplifikasi produk yang diinginkan.

Kesimpulan dan Saran

Fragmen DNA gen penyandi lipase dari kapang *R. oryzae* dan *A. corymbifera* dengan panjang 466 bp telah berhasil diamplifikasi menggunakan pasangan primer PCR *RLP*. Analisis BLAST memperlihatkan bahwa fragmen tersebut memiliki homologi yang tinggi dengan protein lipase beberapa galur *Rhizopus*.

Deteksi untuk mendapatkan amplifikasi gen *PcMDGL* memerlukan pendekatan ke arah homologi sekuen antara lain dengan penggunaan kapang yang dekat secara taksonomi. Langkah ini merupakan pendekatan yang sebaiknya dilakukan untuk tahap penelitian selanjutnya.

Daftar Pustaka

- Kao Corporation. (2004). General properties and cooking characteristic of diacylglycerol as an edible oil *In* Y. Katsuragi (ed.) *Diacylglycerol Oil*. Chapter 19-22, AOCS Press. p. 197-252.
- Cote, M. J., M.C. Tardif & A. J. Meldrum. (2004). Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fruticola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiples PCR. *Plant Dis.*, 88, 1219-1225.
- Elisabeth, J., A. Jatmika & E. Nainggolan, (1998). Preparasi mono- dan digliserida dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatik. *J. Penel. Kelapa Sawit*, 6 (1), 79-87.
- Fadiloğlu, S. & O. Erkmen (1999). Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1936-1938.
- Hughes, K. J. D., C. E. Fulton, D. McReynold & C. R. Lane. (2000). Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *In* EPPO Conference on *Diagnostic Techniques for Plant Pests*. Wageningen. NL. pp. 2000-2004.
- Kosugi Y., H. Tanaka & N. Tomizuka. (1990). Continuous hydrolysis of oil by immobilized lipase in a countercurrent reactor. *Biotechnol. & Bioengin.*, 36 (6), 617-622.
- Moller, E. M., G. Bahnweg, H. Sandermann & H. H. Geiger (1992). A simple and efficient protocols for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.*, 20, 6115-6116.
- Nining, A. (2005). Isolasi dan penapisan mikroba penghasil lipase spesifik -gliserida serta penentuan kondisi optimum produksi diasilgliserol menggunakan minyak sawit mentah. *Tesis*. Jakarta, Universitas Indonesia. 60 p.
- Onions, A.H.S., D. Allsopp & H.O.W. Eiggins (1981). *Smith's Introduction to Industrial Mycology*. 7th (eds.). British, Edwards Arnold. p. 140-142.
- Salomon, S. (2003). *A Secreted Lipase as a Virulence Factor of Fusarium graminearum*. Hamburg, Dept Molecular Phytopathology & Genetics. Univ.of Hamburg. 19 P.
- Suzuki, T., Y. Mushiga, T. Yamane & S. Shimizu (1988). Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol.Technol.*, 27, 417-422.
- White, T. J., T. Burns, S. Lee & J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M. A. Innis, D. H. Gefland, J. J. Sninsky & T. J. White (eds). *PCR Protocols*. San Diego, Academic Press. CA. p. 315-322.
- Winarno, F.G. (1986). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta, PT. Gramedia. 253 p.
- Yamaguchi, S. & T. Mase. (1990). Purification and characterization of mono-and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. *Appl. Microbiol. Technol.*, 34 (6), 720-725.
- Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipids industry: An Engineering overview. *In* Applewhite, T. H. (ed.). *Proceeding of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry*. AOAC. Champaign, p.17-22.