

TEKNIK AMOBILISASI LIPASE DI DALAM PORI-PORI MEMBRAN POLIMER SEBAGAI NANOREAKTOR

Achmadin L. Machsun¹, Misri Gozan¹, Mohammad¹, Renny S. Mokodongan² dan
Siswa Setyahadi²

¹Departemen Teknik Kimia - UI
Kampus Baru UI, Depok

²Pusat Teknologi Bioindustri - BPPT
Jl. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta 10340
e-mail: achmadin@webmail.bppt.go.id

ABSTRAK

TEKNIK AMOBILISASI LIPASE DIDALAM PORI-PORI MEMBRAN POLIMER SEBAGAI NANOREAKTOR. Penelitian ini bertujuan untuk merancang sistem nanoreaktor dengan memanfaatkan membran sebagai media nanopori. Struktur nano tersebut dikembangkan dengan metode dua tahap: adsorpsi sederhana dan dilanjutkan dengan filtrasi bertekanan. Dua tipe membran polimer yaitu *Mixed Cellulose Ester (MCE)* dan *Polyethersulfone (PES)* digunakan sebagai matriks untuk amobilisasi lipase dari *Pseudomonas fluorescens*. Larutan lipase mengalir melalui membran dan molekul lipase teradsorpsi pada dinding pori. Porositas dan matriks membran berpengaruh terhadap nilai *enzyme loading*. Penggunaan membran *PES* dengan waktu inkubasi 18 jam menghasilkan nilai *enzyme loading* paling besar yaitu 3,75 g/m². Selanjutnya membran *PES* dipilih untuk studi transesterifikasi kontinyu. Dievaluasi aktifitas transesterifikasi dengan mengkonversi triolein dan metanol menjadi metil oleat dan gliserol. Reaksi dilakukan secara *in situ* di dalam pori-pori membran yang berperan sebagai reaktor. Nilai derajat konversi triolein dengan menggunakan nanoreaktor ini sekitar 80 % dengan waktu tinggal 30 menit. Produktifitas lipase amobil di dalam pori 40 kali lipat lebih tinggi dibandingkan lipase *free*.

Kata kunci: Biokatalis, Lipase, Membran, Transesterifikasi, Amobilisasi

ABSTRACT

TECHNIQUE FOR IMMOBILIZATION OF LIPASE WITHIN MEMBRANE PORES AS NANOREACTOR. The objective of this study was to design of nanoscale biocatalyst system by utilizing the membrane as nanoporous media. The nanostructure was modified by two step methods: simple adsorption and continue with pressure driven filtration. Two types of polymeric membranes *Mixed Cellulose Ester (MCE)* and *Polyethersulfone (PES)* were used as matrices for immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens*. The lipase solution was allowed to permeate through the membrane and lipase molecule adsorbed on the inner wall of pores. The porosity and membrane matrices influenced the enzyme loading. The best result for enzyme loading in membrane matrix is 3.75 g/m² using *PES* membrane with incubation time of 18 hours. *PES* membrane was selected for further continuous transesterification studies. We evaluated the transesterification activity by converting triolein and methanol to methyl oleate and glycerol. The reaction was carried out *in situ* within the pores of membrane matrix, so that its pores act kind of nanoreactor during formation of product material. The degree of triolein conversion using this kind of nanoreactor was about 80 % with 30 minutes of residence time. The productivity of immobilized lipase within the pores were 40 fold higher than that of native free lipase.

Key words: Biocatalyst, Lipase, Membrane, Transesterification, Immobilization

PENDAHULUAN

Penggunaan enzim sebagai biokatalis telah memegang peranan yang sangat penting pada industri kimia dan farmasi [1]. Salah satu biokatalis yang potensial digunakan pada berbagai industri detergen, pangan, tekstil, pulp, kertas dan farmasi adalah lipase [2]. Untuk mendukung keberhasilan aplikasi enzim pada skala industri diperlukan rekayasa

yang dapat meningkatkan stabilitas dan produktivitas enzim.

Sampai saat ini telah banyak strategi untuk meningkatkan stabilitas enzim seperti: amobilisasi biokatalis, modifikasi enzim, rekayasa protein dan rekayasa medium [3]. Amobilisasi enzim merupakan strategi yang banyak dipilih karena memiliki keuntungan

seperti penggunaan kembali, kemudahan pengendalian proses secara kontinyu dan perancangan reaktor [4,5].

Dalam beberapa dekade terakhir telah banyak studi yang membahas berbagai metode amobilisasi, masing-masing memiliki derajat kompleksitas dan efisiensi yang berbeda [6,7]. Walaupun demikian, desain protokol amobilisasi yang dapat meningkatkan karakteristik enzim masih menjadi tujuan yang menarik [5]. Dilaporkan perkembangan dibidang nanoteknologi untuk peningkatan stabilitas enzim [3]. Berbagai material nano seperti partikel dan serat nano telah menunjukkan peran penting dalam rekayasa biokatalis secara revolusioner [8]. Sistem biokatalis skala nano memperlihatkan sifat-sifat unik yang berbeda dengan sistem amobilisasi tradisional.

Pada penelitian sebelumnya telah dikembangkan metode sederhana amobilisasi enzim pada membran asimetrik menggunakan teknik adsorpsi pada *sponge layer* dan dilanjutkan dengan filtrasi bertekanan melewati *thin layer* [9]. Membran memiliki struktur asimetrik dengan *thin layer* pada bagian atas dan *sponge layer* sebagai *support* pada bagian bawah. Suatu membran dapat dianggap sebagai makrosistem spesifik yang dihasilkan dari banyak mikrosistem [10]. Walaupun selama ini membran didefinisikan sebagai media filtrasi, namun pada penelitian ini membran tidak hanya bertindak sebagai matriks saja tetapi setiap porinya berfungsi sebagai nanoreaktor dengan lipase di dalamnya.

Pada penelitian ini dipelajari penggunaan membran dengan NMWL 300 kDa dengan ukuran pori 20 nm. Setelah membran diaktivasi dengan lipase kemudian dilakukan evaluasi untuk reaksi transesterifikasi secara enzimatik. Penggunaan lipase sebagai katalis dalam transesterifikasi untuk produksi biodiesel telah banyak dipelajari selama dekade terakhir karena merupakan proses ramah lingkungan dan tidak menimbulkan limbah [11].

Pada studi produksi biodiesel dengan katalis lipase, masalah utama adalah inaktivasi enzim akibat metanol berlebih [12]. Untuk memecahkan masalah tersebut biasanya proses transesterifikasi dilakukan dengan aliran tiga tahap pada sebuah bioreaktor *fixed bed*. Tetapi reaksi berjalan dengan sangat lambat, memerlukan waktu selama 36 jam, untuk menyempurnakan reaksi produksi biodiesel [13]. Oleh karena itu dengan penggunaan sistem biokatalis skala nano diharapkan dapat diperoleh sistem yang efektif untuk komersialisasi penggunaan enzim dalam industri biodiesel.

Studi ini melaporkan konsep baru penggunaan sistem biokatalis skala nano yang dikembangkan untuk proses transesterifikasi. Metode untuk menanggulangi masalah metanol berlebih dalam campuran minyak yang dapat menyebabkan inaktivasi lipase dengan cara melakukan amobilisasi lipase di dalam pori-pori membran asimetrik. Selain itu, dengan menggunakan pori membran sebagai *carrier* enzim, efisiensi enzim amobil dapat

ditingkatkan [13], karena pengurangan ukuran matriks membran dapat menghasilkan jarak difusi yang pendek. Pada studi ini, digunakan sel filtrasi sebagai wadah penampung substrat dengan membran asimetris yang mengandung lipase sebagai sistem biokatalis skala nano.

METODE PERCOBAAN

Bahan

Matriks amobilisasi yang digunakan adalah membran asimetrik NMWL 300 kDa dari bahan polietersulfon dengan diameter 63,5 mm dan ketebalan 280 μm , yang disebut PES 300 (Milipore Inc., USA). Berdasarkan spesifikasi pembuatnya, *sponge layer* merupakan bahan polimer *non woven* yang porinya jauh lebih besar dibandingkan *thin layer*. Lipase AY dari *Candida rugosa* diperoleh dari *Sigma Aldrich* (Jepang). Lipase PS *Pseudomonas cepacia* dan Lipase AK *Pseudomonas fluorescens* diperoleh dari *Amano Enzyme* (Nagoya, Jepang). Triolein dari *Sigma Aldrich* (Belgia) digunakan sebagai substrat trigliserida. Semua bahan kimia merupakan grade analitik dan digunakan tanpa pemurnian lanjut.

Cara Kerja

Mula-mula membran PES 300 dipasang pada sel filtrasi dan dibersihkan dengan air *reverse osmosis* kemudian disimpan semalaman hingga kering. Karena sebagian lipase akan ditempatkan dalam *sponge layer*, membran diletakkan terbalik pada dasar sel dengan bagian *sponge* menghadap ke atas. Sel diisi dengan larutan lipase yang mengandung 0,50 g hingga 0,75 g lipase dalam 10 mL *buffer* fosfat 50mM (pH 7,0). Sampel membran diinkubasi dengan larutan lipase selama 18 jam pada 20 °C untuk pengendapan dan adsorpsi. Setelah 18 jam, larutan lipase dialirkan melewati *sponge layer* kemudian menuju *thin layer* dengan cara filtrasi dengan tekanan 3 kPa menggunakan gas nitrogen. Membran disimpan semalaman hingga kering kemudian dibilas dua kali dengan 10 mL *buffer* fosfat 50 mM (pH 7,0). Membran yang mengandung lipase diambil dari sel filtrasi dan digunakan sebagai reaktor enzimatik.

Untuk menghitung enzim yang terisi dalam membran (*enzyme loading*), filtrat dikumpulkan dan diukur absorbansinya. Jumlah protein yang terdapat dalam membran nanostruktur (p) ditentukan dari selisih konsentrasi protein sebelum dan setelah amobilisasi, sesuai Persamaan (1).

$$p \left(\frac{\text{g}}{\text{m}^2} \right) = \frac{(C_0 - C).V}{A} \dots\dots\dots (1)$$

Dimana:

C_0 = Konsentrasi larutan lipase sebelum amobilisasi (kg/m^3)

- C = Konsentrasi larutan lipase setelah amobilisasi (kg/m³)
- V = Volume mula-mula larutan lipase (m³)
- A = Luas membran (m²)

$$HRT = \frac{V_m}{F} \dots\dots\dots (2)$$

Dimana:

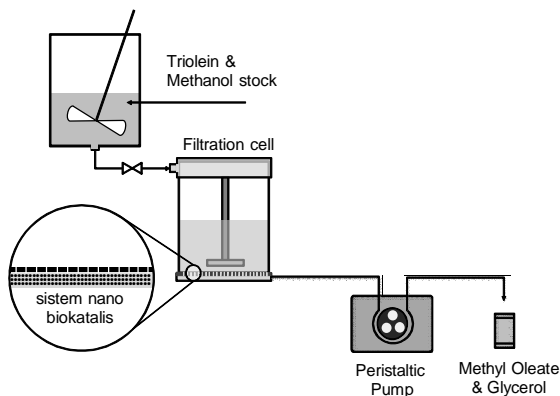
- V_m = Volume membran (mL)
- F = Laju alir permeat (mL/jam)

Percobaan Untuk Transesterifikasi Kontinyu

Gambar 1 adalah diagram percobaan yang terdiri dari sel filtrasi, pengaduk magnetis dan pompa peristaltik untuk membantu permeasi. Reaktor membran dirancang pada membran asimetrik sebagai material pembawa enzim. Mikoreaktor membran terdiri dari lipase yang terikat pada membran dengan luas efektif 28,7 cm² dan dioperasikan dengan menempatkannya pada sel filtrasi dengan *thin layer* menghadap ke atas. Suhu sistem dipertahankan pada (35 ± 1) °C. Reaksi transesterifikasi dimonitor dengan mengukur kadar triolein dengan HPLC.

Reaktor membran dioperasikan pada mode *flow through*. Proses transesterifikasi dimulai ketika larutan melewati mikoreaktor membran dan produk dipompa keluar dari sel. Membran dapat dianggap sebagai makrosistem spesifik yang dibentuk dari sekumpulan mikrosistem [10]. Tiap pori dapat dilihat sebagai sebuah nanoreaktor. Reaksi terjadi secara *in situ* dalam pori membran, sehingga pori tersebut bertindak sebagai reaktor selama pembentukan produk. Campuran triolein dan metanol didifusikan melalui reaktor membran kemudian dikonversi secara enzimatik menjadi metil oleat dan gliserol. Agitasi kontinyu diberikan tepat di atas permukaan membran dengan pengaduk magnetis dari bagian atas sel dan diatur oleh pengaduk magnetik eksternal. Pompa peristaltik diatur pada laju alir 5 mL/menit. 50 mL larutan yang mengandung triolein dan metanol digunakan sebagai umpan. Tangki umpan dan penampung diatur pada suhu konstan (35 ± 1) °C. Eksperimen dilakukan secara kontinyu selama 16 jam.

Reaksi transesterifikasi terjadi sebagai hasil dari aksi katalitik lipase amobil di dalam membran. Produk diambil dari reservoir untuk pengukuran laju alir dan konsentrasi triolein. Berdasarkan volume membran, waktu tinggal (*HRT*) larutan substrat didefinisikan seperti pada Persamaan (2).



Gambar 1. Perlengkapan percobaan untuk proses reaksi transesterifikasi kontinyu

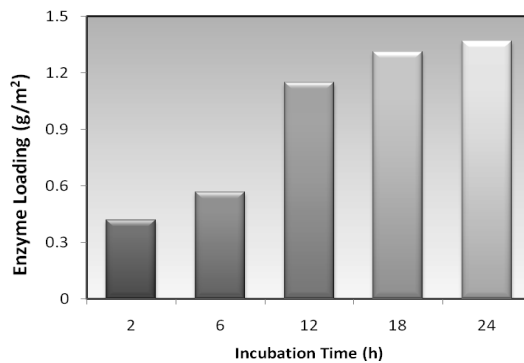
Karakterisasi

Konsentrasi metil oleat dan triolein sisa dalam produk permeat ditentukan menggunakan HPLC dengan detektor UV pada 205 nm. Sistem HPLC analitik mengandung dua pompa LC 9A (Shimadzu) dan detektor UV SPD 10A (Shimadzu, Kyoto). Kolom yang digunakan LiChroCART RP C18 250/4 mm (Merck, Darmstadt, Jerman). Fasa gerak terdiri dari tiga komponen yaitu n-heksana, isopropanol dan metanol. Reservoir A mengandung metanol dan reservoir B mengandung campuran isopropanol dan n-heksana dengan perbandingan 5 : 4 (v/v). Elusi dilakukan secara *gradien* dari 100% A ke 50% A dan 50% B selama 30 menit. Laju alir fasa gerak = 1 mL/menit dan volume injeksi sampel = 10 µL. Metode *nonaqueous RP-HPLC* ini dimodifikasi dari metode yang dilaporkan peneliti sebelumnya [14].

HASIL DAN PEMBAHASAN

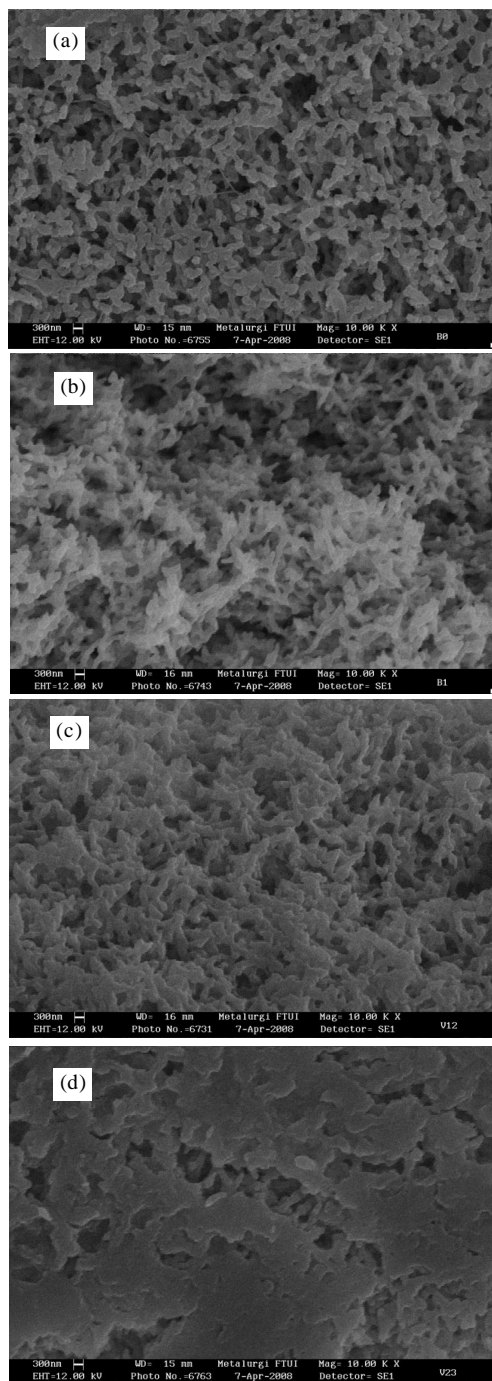
Pengaruh Waktu Inkubasi

Amobilisasi enzim lipase pada membran dengan metode dua tahap sudah pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, namun tanpa inkubasi [15]. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi dengan menambahkan inkubasi sebagai salah satu faktor yang berpengaruh terhadap nilai *enzyme loading*. Waktu inkubasi dilakukan dengan konsentrasi lipase 25 mg/mL pada membran *Mixed Cellulose Ester (MCE)*. Variasi waktu adsorpsi yang dilakukan yaitu 2 jam, 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam.



Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi selama proses amobilisasi terhadap jumlah lipase amobil (*enzyme loading*). Membran yang digunakan adalah *Mixed Cellulose Ester (MCE)* dengan ukuran pori 0,22 µm dan enzim yang digunakan adalah Lipase AK dengan konsentrasi awal 25 mg/mL

Gambar 2 menunjukkan pengaruh waktu inkubasi terhadap jumlah lipase amobil (g/m^2). Jumlah lipase amobil didalam membran semakin besar dengan bertambahnya waktu inkubasi kemudian mencapai maksimal pada waktu inkubasi 18 jam dan nilainya mendekati konstan pada waktu inkubasi 24 jam. Jumlah lipase amobil ini semakin jelas ketika diamati dengan *Scanning Electron Microscope (SEM)*. Gambar 3



Gambar 3. Foto SEM matriks membran MCE dengan ukuran pori 0,22 mikrometer dan lipase amobil dengan perlakuan inkubasi yang berbeda : (a). membran baru, (b). inkubasi 2 jam, (c). inkubasi 12 jam dan (d). inkubasi 24 jam

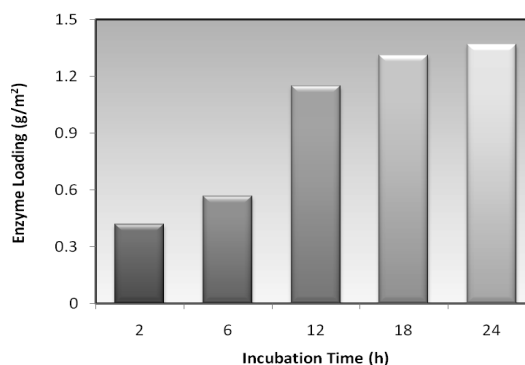
memperlihatkan perbedaan banyaknya lipase amobil pada membran dengan waktu inkubasi yang berbeda-beda. Semakin lama waktu inkubasi semakin banyak lipase yang amobil.

Pengaruh Jenis Matriks Membran

Amobilisasi lipase dengan konsentrasi yang berbeda (25 mg/mL 50 mg/mL dan 75 mg/mL) dilakukan pada dua jenis matriks membran, yaitu MCE dan PES. Pada studi ini hanya matriks membran PES yang digunakan sebagai mikroreaktor. PES dipilih karena strukturnya yang asimetris dan memiliki kesesuaian yang baik dengan enzim. Ketika larutan enzim dilewatkan pada membran, maka terjadilah adsorpsi enzim di dalam *sponge layer* dan pori membran. Metode adsorpsi merupakan metode yang paling luas digunakan untuk amobilisasi enzim karena denaturasi enzim dapat dihindari. Kesesuaian ukuran antara pori membran dan molekul enzim memiliki peranan penting dalam mencapai stabilitas enzimatik yang tinggi [16].

Membran dengan NMWL 300 kDa mempunyai ukuran pori kira-kira 20 nm. Diameter lipase H \approx 3 nm (sama dengan 15 kDa) dan diameter pori membran $d_p \approx$ 20 nm (sama dengan 300 kDa). Jika $d < d_p$, maka protein dapat memasuki tiap pori dan tersimpan pada dinding pori sehingga meningkatkan jumlah lipase amobil [17]. Jumlah lipase amobil ditentukan dari selisih konsentrasi protein, sebelum dan sesudah amobilisasi. Dengan menggunakan Persamaan (1), jumlah lipase yang terikat pada strukturmikro membran terdapat dalam rentang 2,0 g/m^2 hingga 3,2 g/m^2 .

Gambar4 menunjukkan bahwa jenis membran juga berpengaruh terhadap jumlah lipase amobil, dimana jumlah lipase amobil pada membran PES lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah lipase amobil pada membran MCE. Hal ini mudah dipahami karena membran PES memiliki ketebalan yang lebih besar dibandingkan membran MCE. Gambar 4 juga memberi informasi bahwa jumlah lipase yang amobil semakin meningkat dengan semakin besarnya konsentrasi lipase. Didapat lipase amobil yang tinggi pada membran



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi awal enzim terhadap jumlah lipase amobil (*enzyme loading*). Membran yang digunakan adalah PES 300 kDa dan MCE 0,22 μm .

polyethersulfone dengan konsentrasi 75 mg/mL, yaitu sebesar 3,75 g/m².

Gambar 5 menunjukkan foto SEM membran kosong dan lipase amobil pada membran terlihat pada sisi penampang. Foto ini memperlihatkan struktur morfologi membran dengan dan tanpa lipase. Perubahan struktur morfologi secara jelas terlihat bahwa ada adsorpsi lipase pada membran baik di bagian *thin layer* dan maupun *sponge layer*. Jadi amobilisasi lipase dalam membran diperkirakan dapat

meningkatkan stabilitas operasional enzim dan bukan stabilitas intrinsik yang mewakili stabilitas molekul enzim itu sendiri.

Transesterifikasi Kontinyu dan Stabilitas Operasional

Sel filtrasi digunakan sebagai reaktor *flow-through* yang dilengkapi dengan membran yang telah dimodifikasi menjadi sistem biokatalis skala nano. Untuk mempelajari konversi pada sistem kontinyu, dilakukan selama 16 jam. Derajat konversi triolein (X_c) ditentukan menggunakan Persamaan (3).

$$X_c = \left(1 - \frac{C_s}{C_i}\right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

Dimana:

- C_i = Jumlah mula-mula triolein dalam umpan
- C_s = Konsentrasi triolein yang tidak terkonversi pada produk

Permeabilitas produk pada mikroreaktor membran ditentukan dari laju alir per luas membran dan ditunjukkan sebagai fluks (J_s) dalam L/m².jam. Derajat konversi triolein dan fluks permeat produk sebagai fungsi waktu ditunjukkan pada Gambar 6. Nilai fluks cenderung konstan pada 0,9 L/m².jam yang mengindikasikan hampir tidak terjadi adsorpsi gliserol pada permukaan enzim lipase amobil selama operasi kontinyu selama 16 jam.

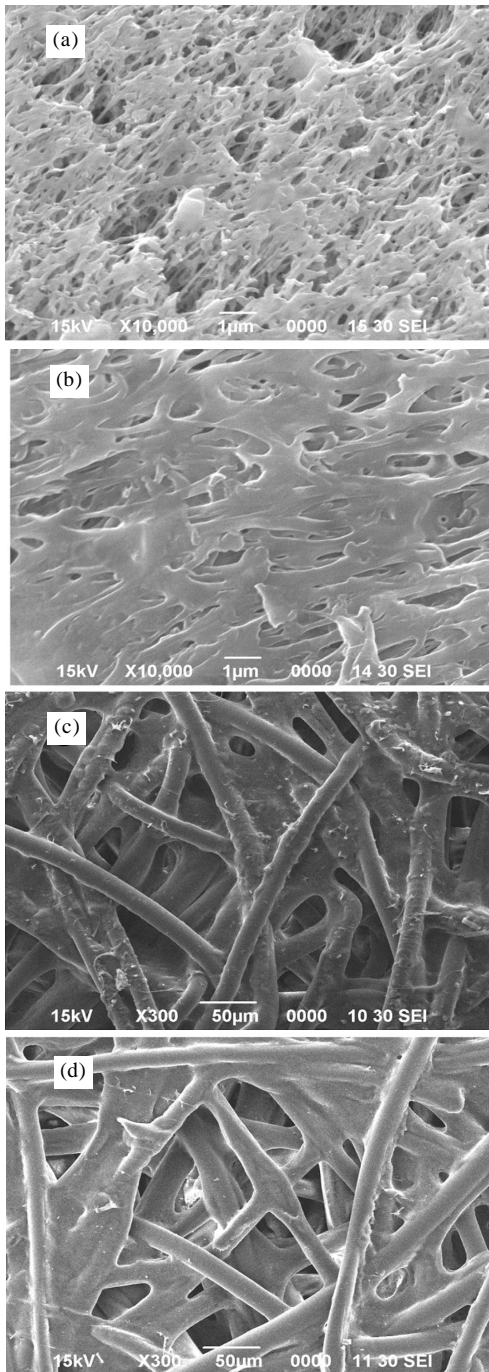
Sedangkan nilai konversi triolein konstan diatas 60% dan transesterifikasi triolein menjadi metil oleat diamati dengan *enzyme loading* 3,2 g/m² pada mikroreaktor *flow through* dan waktu tinggal 18 menit seperti yang didefinisikan pada Persamaan (2). Reaktor pada τ konstan dipertahankan selama 16 jam. Selama percobaan tidak terjadi penurunan aktifitas lipase. Untuk menentukan produktivitas (P_{cat}) dari sistem biokatalis dalam penelitian ini menggunakan Persamaan (4).

$$P_{cat} \left(\frac{mmol}{h.mg_{lipase}} \right) = \frac{C_p \times F}{p_m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

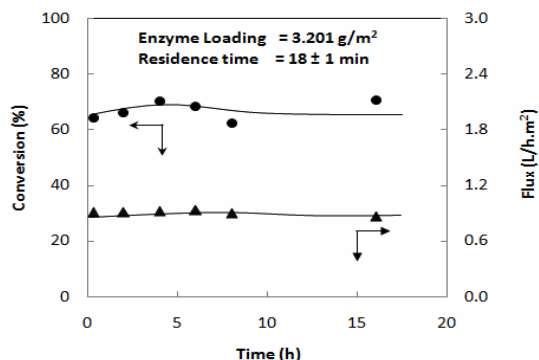
Dimana :

- C_p = Konsentrasi metil oleat (mmol/mL)
- F = Laju alir larutan (mL/jam) dan
- p_m = Jumlah lipase amobil pada membran yang digunakan (mg)

Pada reaksi *batch* aktifitas lipase didefinisikan sebagai laju pembentukan metil oleat per kilogram lipase (mmol/jam.mg_{lipase}). Produktivitas sistem biokatalis dalam penelitian ini 40 kali lebih tinggi dibandingkan lipase asli. Hasil ini memperlihatkan bahwa penggunaan membran sebagai sistem biokatalis dapat meningkatkan produktivitas reaksi transesterifikasi.



Gambar 5. Foto SEM cross section membrane asimetris Polyethersulfone NMWL 300 kDa : (a). *thin layer* membran kosong, (b). *thin layer* lipase amobil, (c). *sponge layer* membrane kosong dan (d). *sponge layer* lipase amobil.

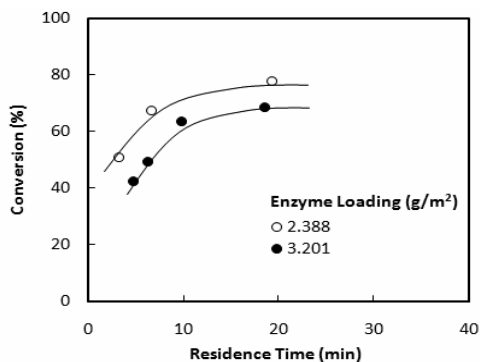


Gambar 6. Karakteristik reaktor selama 16 jam untuk reaksi transesterifikasi dengan enzyme loading 3,2 g/m² dan waktu tinggal 18 menit

Pengaruh Waktu Tinggal

Waktu tinggal merupakan parameter yang penting pada tipe operasi ini [18]. Reaksi dilakukan dengan 10 gram triolein dan 3 gram metanol, skala pompa divariasikan 1 hingga 3, atau waktu tinggal 5 menit hingga 30 menit. Gambar 7 menunjukkan bahwa konversi triolein terhadap nilai waktu tinggal. Jumlah enzim amobil merupakan parameter lain yang juga penting untuk dipertimbangkan. Berdasarkan Gambar 7, hasil reaksi transesterifikasi dengan lipase amobil lebih besar tidak selalu menghasilkan konversi lebih tinggi. Sebagaimana data yang diperoleh dalam penelitian ini bahwa enzyme loading 2,3 g/m² menghasilkan konversi triolein lebih tinggi dibandingkan dengan enzyme loading 3,2 g/m².

Gambar 7 juga menunjukkan bahwa pada waktu tinggal yang lebih lama konversi turut meningkat, dan pengaruhnya terlihat jelas untuk enzim amobil dengan enzyme loading 2,3 g/m² dan 3,2 g/m². Dari nilai-nilai tersebut waktu dilaporkan bahwa konversi triolein maksimum berkisar pada 80% dengan waktu reaksi 19 menit. Hasil ini dengan jelas menunjukkan bahwa waktu reaksi transesterifikasi biokatalitik pada sistem mikroreaktor membran lebih cepat dibandingkan pada sistem konvensional, yakni untuk menghasilkan ≥ 90% produk, diperlukan waktu reaksi lebih dari 40 jam [19].



Gambar 7. Pengaruh waktu tinggal terhadap konversi triolein. Enzyme loading 2,4 g/m² (○) dan 3,2 g/m² (●)

KESIMPULAN

Pada studi ini, konsep baru sistem biokatalis skala nano dapat diterapkan untuk reaksi transesterifikasi. Pori-pori membran berperan sebagai reaktor dan membran bukan bertindak sebagai barrier selektif tetapi sebagai sistem biokatalis dengan lipase di dalamnya. Konversi triolein menjadi metil oleat terjadi selama permeasi substrat melewati membran biokatalitik. Konversi triolein maksimum dengan mikroreaktor sekitar 80 % dengan waktu reaksi 19 menit. Reaktor membran dengan sistem biokatalis skala nano menunjukkan aktifitas yang jauh lebih unggul dibandingkan lipase native. Aktifitas lipase amobil dalam mikroreaktor terhadap satuan massa lipase (mol/jam.kg_{lipase}) yang ditetapkan lebih tinggi 40 kali dibandingkan aktifitas lipase native. Dalam reaktor packed bed aktifitas enzim menurun akibat gliserol yang dihasilkan teradsorpsi pada support enzim, tetapi dengan menggunakan reaktor membran, tidak terjadi penurunan aktifitas selama periode 16 jam operasi kontinyu. Sistem biokatalis skala nano ini berpotensi untuk diterapkan pada proses transesterifikasi trigliserida (produksi biodiesel komersial) yang tidak menghasilkan limbah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterimakasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi (KRT) dan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) untuk bantuan finansial. (Kontrak No: KP-2009-1658 and KP-2010-722).

DAFTAR ACUAN

- [1]. X. S. ZHAO, X. Y. BAO, W. GUO and F. Y. LEE, *Materials Today*, **9** (3) (2006) 32 -39
- [2]. F. O. M. ALONSO, E. B. L. OLIVEIRA, G. M. DELLAMORA-ORTIZ and F.V. PEREIRA-MEIRELLES, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **22** (01) (2005) 9 -18
- [3]. U. T. BORNSCHEUER, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42** (2003) 3336-3337
- [4]. P. VILLENEUVE, J. M. MUDERHWA, J. GRAILLE and M. J. HAAS, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **9** (2000) 113-148
- [5]. F. X. MALCATA, H. R. REYES, H. S. GARCIA, C. G. HILL and C. H. AMUNDSON, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67** (12) (1990) 890 -910
- [6]. C. MATEO, J. M. PALOMO, G. F. LORENTE, J. M. GUISAN and R. F. LAFUENTE, *Enzym. Microb. Technol.*, **40** (2007) 1451-1463
- [7]. A. LUTHFI, S. SETYAHADI, M. GOZAN, and M. NASIKIN, Continuous Transesterification by Biocatalytic Membrane Microreactor for Synthesis of Methyl Ester, *Proceeding of the 11th International Conference on QiR (Quality in Research)*, Depok (2009)

- [8]. G. M. RIOS, M. P. BELLEVILLE, D. PAOLUCCI and J. SANCHEZ, *J. Memb. Sci.*, **242** (2004) 189-196
- [9]. V. M. BALCAO, A. L. PAIVA and F. X. MALCATA, *Enzyme Microb. Technol.*, **18** (1996) 392 - 416
- [10]. VICENTE, G. M. MARTINEZ and J. ARACIL, *Bioresour. Technol.*, **92** (3) (2004) 297 - 305
- [11]. Y. WATANABE, Y. SHIMADA, A. SUGIHARA and Y. TOMINAGA, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78** (2001) 703 - 707
- [12]. J. W. CHEN and W. T. WU, *J. Biosci. Bioeng.*, **95** (5) (2003) 466 - 469
- [13]. J. KIM, J. W. GRATE and P. WANG, *Chem. Eng. Sci.*, **61** (2006) 1017-1026
- [14]. M. HOLCAPEK, P. JANDERA, J. FISHER and B. PROKES, *J. Chromatogr.*, **858** (1999) 13-31
- [15]. N. HILAL, KOCHKODAN, V. NIGMATULLIN, R. GONCHARUK and V. AL-KHATIB, L., *Journal of Membrane Science*, **268** (2006) 198-207
- [16]. H. TAKAHASHI, B. LI, T. SASAKI, C. MIYAZAKI, T. KAJINO and SHINJI INAGAKI, *Chem. Mater.*, **12** (2000) 3301-3305
- [17]. P. AIMAR, M. MEIRELES, P. BACCHIN and V. SANCHES, *In Membrane Process in Separation and Purification*, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherland, (1994)
- [18]. L. GIORNO, E. DRIOLI, G. CARVOLI, A. CASSANO, and L. DONATO, *Biotech. Bioeng.*, **72** (1) (2001) 77-84
- [19]. A. HSU, K.C. JONES, T.A. FOGLIA, and W.N. MARMER, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81** (8) (2004) 749-752
- [20]. V. DOSSAT, D. COMBES and A. MARTY, *Enzym. Microb. Technol.*, **25** (1999) 194-200