

TRANSESTERIFIKASI ENZIMATIS MONO-DIGLISERIDA : EFEK PENINGKATAN RASIO PELARUT n-HEKSANA TERHADAP AKTIFITAS ENZIM LIPASE IMMOBILE *Candida antarctica* DALAM MENINGKATKAN KONVERSI SUBSTRAT

Eka Kurniasih^{1,2}, Rahmi Rahmi³, Darusman Darusman⁴, Muhammad Dani Supardan⁵

¹Program Studi Doktor Ilmu Pertanian, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111

²Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Lhokseumawe, Lhokseumawe 24301

³Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Alam,

Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111

⁴Departemen Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111

⁵Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111

E-mail: eka_k@mhs.unsyiah.ac.id

Abstrak

Mono-digliserida (MGDG) disintesis melalui reaksi transesterifikasi enzimatis menggunakan minyak inti sawit mentah (MISM) dan gliserol sebagai substrat. Reaksi berlangsung pada temperatur 30°C, rasio mol MISM : gliserol = 1:2 mol, waktu reaksi 8 jam dan rasio enzim Candida antarctica : MISM = 0,05% (b/b). MISM dan gliserol tidak mudah larut sebab memiliki polaritas yang berbeda. Untuk meningkatkan homogenitas kedua substrat, ditambahkan n-heksana sebagai pelarut dalam berbagai rasio, yaitu 1:1 – 1:10 (% b/v) terhadap massa MISM. Tujuan penelitian ini adalah mengamati pengaruh n-heksana terhadap aktifitas katalitik dari enzim Candida antarctica untuk meningkatkan konversi substrat. Konversi substrat diukur secara kuantitatif berdasarkan persentase penurunan bilangan asam. Sebagai kontrol terhadap reaksi enzimatis, dilakukan reaksi non enzimatis dengan menggunakan kondisi reaksi yang sama. Dari hasil penelitian diketahui bahwa enzim Candida antarctica mampu menahan n-heksana dalam sistem campuran reaksi hingga batasan tertentu. Konversi substrat optimal diperoleh pada rasio MISM : n-heksana = 1:3 (b/v) sebesar 58,29% dengan kadar bilangan asam akhir = 2,28%. Penggunaan rasio MISM : n-heksana diatas 1:3 (b/v) menunjukkan penurunan konversi substrat karena terjadi toksisitas pada enzim Candida antarctica yang meningkatkan rigiditas sisi aktif enzim. Produk dengan konversi optimal kemudian dianalisis menggunakan metode kromatografi gas dan diperoleh total yield MGDG sebesar 56,91%, dengan komposisi MG = 8,96% dan DG = 47,95%.

Kata kunci: *Candida antarctica, Enzimatis, n-Heksana, Mono-digliserida, Minyak Inti Sawit Mentah.*

1. PENDAHULUAN

Mono-digliserida (MGDG) adalah salah satu pengemulsi non ionik. MGDG memiliki aplikasi luas pada industri yang memproduksi bahan-bahan kebutuhan hidup manusia (Kaewthong dkk., 2005). Berdasarkan panjang rantai asam lemak yang digunakan sebagai bahan baku, maka MGDG dibagi atas MGDG rantai pendek, menengah dan panjang. MGDG golongan rantai menengah seperti mono-dilaurat, mono-dimiristat dikenal sebagai pengemulsi yang bermanfaat bagi kesehatan karena memiliki aktifitas antimikroba. Sebagai pengemulsi, MGDG mampu mempertahankan emulsi antara air yang terdispersi dalam minyak, sehingga MGDG disebut sebagai pengemulsi golongan (w/o) atau *water in oil* (Hudson, 1993). Emulsi yang terdiri dari air yang terdispersi dalam minyak atau lemak sangat banyak ditemukan di industri pangan, seperti dalam pembuatan margarin, mayones, *whipped cream*, cake dan roti. MGDG memiliki rentang *Hidrophilic Lipophilic Balance* (HLB) yang cukup lebar dari 3,7-9,2 bergantung pada kelarutannya (Mintarti & Kusumah, 2017; Murod dkk., 2019).

Dalam skala industri, MGDG diproduksi melalui transesterifikasi kimia melibatkan katalis basa pada temperatur 200-250°C menggunakan bahan baku trigliserida atau asam lemak nabati dan hewani (Cetina dkk., 2011). Temperatur tinggi meningkatkan proses kelarutan, sehingga dalam metode kimia penggunaan pelarut dapat diabaikan. Berbeda halnya dengan transesterifikasi enzimatis yang berlangsung pada temperatur moderat. Untuk meningkatkan kelarutan bahan baku, dibutuhkan suatu

pelarut yang bertindak sebagai penghubung antara kedua substrat. Meskipun demikian, transesterifikasi kimia memiliki kelemahan antara lain : terdapat residu dari produk samping (sabun), warna produk yang lebih gelap hingga aroma terbakar. Selektifitas produk yang diperoleh melalui transesterifikasi kimia juga rendah berkisar 30-40%. Untuk mendapatkan MGDG dengan kemurnian $\geq 90\%$ memerlukan tahap pemurnian lebih lanjut, salah satunya dengan distilasi molekuler (Kaewthang, 2004; Kaewthong dkk., 2005), pemisahan metode kromatografi kolom (Rosita, 2016). MGDG komersial biasanya mengandung 45-55% monogliserida (MG), 38-45% digliserida (DG), dan 8-12% trigliserida (TG) (Scrimgeour and Harwood, 2007). Aplikasi reaksi enzimatik untuk sintesis MGDG dapat menjadi solusi untuk mengatasi masalah pada transesterifikasi kimia. Sintesis MGDG melalui transesterifikasi enzimatik dilakukan menggunakan enzim lipase *Candida antarctica* sebagai katalis organik. Enzim *Candida antarctica* bekerja secara spesifik pada minyak inti sawit mentah (MISM) karena mengandung asam lemak rantai pendek dan menengah sebesar 85,525%. Berbeda dengan katalis anorganik, penggunaan enzim *Candida antarctica* sebagai biokatalis tidak menyebabkan terbentuknya sabun, sehingga MGDG memiliki karakteristik sensori yang lebih baik dan tahap pemurnian produk yang panjang dapat dihindari. Meskipun pada transesterifikasi enzimatik terjadi penambahan pelarut, tetapi pada akhir reaksi dapat dilakukan *recovery* pelarut menggunakan metode evaporasi atau distilasi. Sehingga pelarut dapat digunakan berulang kali dan efisiensi biaya pengadaan pelarut. Dalam penelitian ini, pemilihan n-heksana sebagai pelarut berdasarkan beberapa pertimbangan, yaitu :

1. Dibandingkan dengan tert-butanol (Log P = 0,3), maka n-heksana (Log P > 2) memiliki kelarutan yang lebih tinggi dalam MISM dan MGDG, sehingga peluang untuk tercapainya homogenitas campuran lebih besar (Collaço dkk., 2021)
2. Senyawa n-heksana tergolong dalam pelarut organik yang bersifat hidrofobik, sehingga mampu melindungi enzim lipase *Candida antarctica* dari pengaruh air.
3. Penggunaan pelarut organik golongan alkohol seperti tert-butanol, etanol, isopropil alkohol berpeluang membentuk senyawa ester akibat reaksi antara trigliserida dan alkohol
4. Titik didih n-heksana lebih rendah dari pelarut organik lainnya, sehingga proses *recovery* dapat dilakukan dengan proses penguapan pada temperatur didih yang lebih rendah dibandingkan pelarut organik lainnya
5. Harga n-heksana relatif lebih ekonomis dan mudah untuk diperoleh

Beberapa penelitian telah menggunakan n-heksana sebagai pelarut dalam transesterifikasi enzimatik, diantaranya oleh (Purnama dkk, 2021) yang menggunakan substrat *palm fatty acid distillate* (PFAD) dan menghasilkan yield MGDG 61%, tetapi menggunakan temperatur reaksi 65°C (>30°C). Berikutnya adalah penelitian (Palilingan, 2023), yang menghidrolisis *crude palm oil* (CPO) menjadi MGDG menggunakan lipase immobil dengan penambahan n-heksana. Dari hasil penelitian diperoleh konversi MGDG sebesar 33% dengan waktu reaksi 21 jam. Penggunaan n-heksana sebagai pelarut dapat memberikan dampak positif bagi reaksi. Tetapi keberadaan n-heksana sebagai pelarut dalam campuran reaksi juga dapat menyebabkan toksisitas pada enzim *Candida antarctica* dan menurunkan yield produk. Untuk itu dibutuhkan suatu penelitian guna menentukan rasio n-heksana yang tepat pada sintesis MGDG secara enzimatik. Sehingga tujuan dalam penelitian ini adalah mengamati pengaruh rasio n-heksana terhadap aktifitas katalitik dari enzim *Candida antarctica* untuk meningkatkan konversi substrat.

2. METODOLOGI

1.1. Bahan

MISM yang berasal dari pabrik pengolahan kelapa sawit (PKS), PTPN IV Pabatu, Kecamatan Tebing Tinggi, Kabupaten Serdang Bedagai, Sumatera Utara. Gliserol yang digunakan dalam penelitian ini merupakan produk samping dari sintesis metil ester yang telah dipurifikasi. Enzim *Candida antarctica* berasal dari Novozyme Inc. Bahan kimia berasal dari PT. Merck meliputi n-heksana p.a,

C₂H₅OH p.a (etanol), KOH p.a (kalium didroksida), Na₂S₂O₃.5 H₂O p.a (natrium tiosulfat), indikator phenolphthalein p.a dan aquadest.

1.2. Prosedur Kerja Sintesis Mono-digliserida

Campuran substrat terdiri dari 50 gr MISM dan 8,6 mL gliserol dimasukkan dalam reaktor kaca berbentuk labu leher tiga dan dihomogenkan dengan 50 mL n-heksana (rasio MISM : n-heksana = 1:1 b/v). Selanjutnya enzim *Candida antarctica* dimasukkan secara perlahan dan diaduk dengan kecepatan 400 rpm selama 8 jam. Selama reaksi berlangsung, temperatur reaksi dijaga konstan pada 30°C. Untuk mencegah penguapan n-heksana, reaktor dilengkapi dengan kondensor tegak untuk proses kondensasi pelarut. Setelah 8 jam reaksi, dilakukan pemisahan produk dari enzim *Candida antarctica* menggunakan filtrasi vakum. Untuk memudahkan proses filtrasi, campuran reaksi dapat diencerkan dengan n-heksana bila diperlukan. Filtrat yang mengandung MGDG dipisahkan dari pelarut n-heksana dengan metode penguapan pada temperatur 90°C. Selanjutnya melakukan analisis bilangan asam pada produk akhir MGDG (Balqis & Kurniasih, 2020; Kurniasih, 2014). Ulangi percobaan dengan perlakuan rasio pelarut berikutnya dan perlakuan tanpa enzim *Candida antarctica*.

1.3. Perhitungan Konversi Substrat

Penurunan bilangan asam dapat digunakan sebagai indikator utama adanya pembentukan MGDG. Sehingga konversi substrat dihitung berdasarkan selisih bilangan asam di awal reaksi dengan bilangan asam di akhir reaksi. Analisis bilangan asam dilakukan secara kuantitatif sesuai metode AOCS Ca 5a-40 (1998). Perhitungan konversi substrat, dilakukan mengikuti rumus berikut ini (Satyawali dkk., 2021).

$$\text{Konversi Substrat (\%)} = \frac{\text{ALB}_{\text{awal}} - \text{ALB}_{\text{akhir}}}{\text{ALB}_{\text{awal}}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 Analisis Komposisi Mono-Digliserida Menggunakan Kromatografi Gas

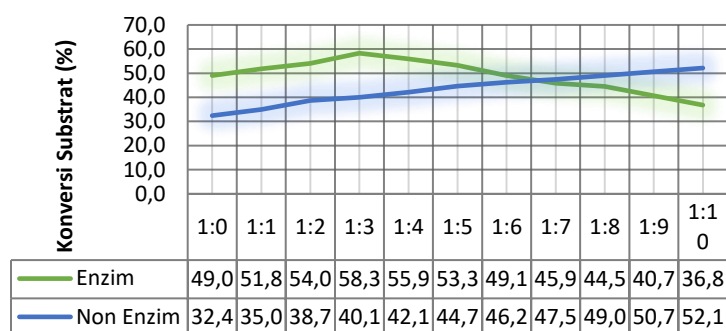
Produk MGDG dengan konversi optimal dikonfirmasi menggunakan GC untuk mengetahui komposisi MG dan DG yang terbentuk. Sebanyak 0,05 gr sampel MGDG ditambahkan 100µL N-metil-trimethylsilyl-trifluoroacetalmida (MSTFA) dan internal standard (tricaprin 0,04 g, 5 mL piridin), tetra hidro furan (THF) 0,1 mL kemudian di vortex selama 1-2 menit. Lalu sampel didiamkan ditempat gelap selama 1-10 menit, lalu ditambahkan n-heptana 2,5 mL dan divortex kembali selama 1-2 menit. Sampel kemudian sampel dipipet sebanyak 1µL dan diinjeksikan kedalam GC 2010 Plus (Shimadzu Corp, Kyoto, Jepang) dengan spesifikasi peralatan yaitu detektor FID, kolom DB 5HT dengan panjang 15 meter dan diameter dalam (ID) 0,25 mm, tebal film 0,1 µm menggunakan gas N₂ dan H₂. Temperatur injektor 320°C, injektor split rasio 1:5 dan temperatur detektor 350°C. Temperatur pada saat injeksi hingga analisis selesai berkisar antara 50-380°C selama 30 menit (Kuntom et.al., 2005).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penggunaan pelarut bertujuan untuk meningkatkan homogenitas dari sistem campuran, karena MISM memiliki kepolaran yang berbeda dengan gliserol sehingga sulit untuk bercampur. Beberapa pelarut organik telah digunakan dalam reaksi enzimatik, antara lain tert-butanol, aseton, n-heksana, isopropil alkohol dan etanol. Pelarut organik secara general digunakan untuk membentuk sistem dua fase aqueous-senyawa organik, sehingga meningkatkan homogenitas dari campuran (gliserol-asam lemak-lipase) atau campuran gliserol-minyak-lipase (Miao & Lin, 2018). Tidak semua senyawa organik dapat digunakan sebagai pelarut dalam reaksi enzimatik, karena harus mempertimbangkan efek sampingnya

terhadap kinerja enzim lipase. Selain itu, harus dipastikan bahwa pelarut yang digunakan tidak akan menyebabkan reaksi samping yang mengakibatkan terbentuknya senyawa lain yang bukan merupakan produk utama. Dalam penelitian sebelumnya, n-heksana adalah salah satu pelarut organik yang banyak digunakan dalam berbagai reaksi antara lain reaksi esterifikasi, transesterifikasi, hidrolisis ataupun amidasi yang melibatkan enzim lipase (Ahmad dkk., 2019; Foukis dkk., 2018; Vidya & Chadha, 2010). Penggunaan pelarut organik dalam sintesis enzimatis memiliki kelebihan antara lain : (1) kelarutan substrat (biasanya adalah senyawa organik) dan enzim dalam pelarut organik lebih tinggi dibandingkan dengan H₂O, (2) kestabilan enzim meningkat dan mudah mengisolasi produk (Yandri & Suhartati, 2018). Meskipun pelarut organik dapat bersifat toksik bagi makhluk hidup, tetapi dengan kemudahan dalam proses pemurnian produk akhir maka efisiensi pemisahan produk utama dengan pelarut dapat mencapai 90-99%.

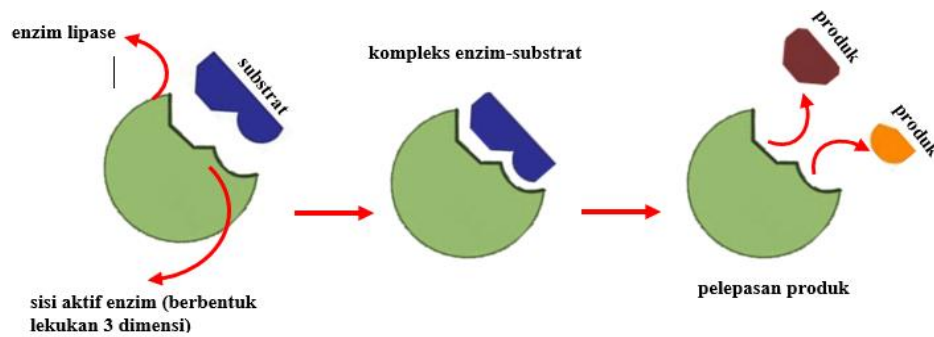
Untuk mengetahui pengaruh n-heksana terhadap transesterifikasi enzimatis, maka dalam penelitian ini dilakukan percobaan dengan variasi rasio MISM : n-heksana dari 1:1 hingga 1:10 (b/v) dengan faktor lain dalam kondisi konstan. Untuk melihat sejauh mana pengaruh yang dapat diberikan oleh penggunaan pelarut dalam reaksi, dilakukan percobaan tanpa menggunakan pelarut n-heksana. Sedangkan untuk mengamati pengaruh n-heksana terhadap aktifitas enzim *Candida antarctica*, dilakukan percobaan tanpa menggunakan enzim *Candida antarctica* (non enzim). Tujuannya adalah untuk mengetahui toleransi dari *Candida antarctica* terhadap n-heksana. Karena penggunaan pelarut, tidak hanya untuk membantu meningkatkan homogenitas campuran reaksi, namun juga harus berdampak positif bagi kinerja enzim lipase. Performa enzim *Candida antarctica* dalam pelarut n-heksana diukur berdasarkan konversi substrat, dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Konversi Substrat Pada Berbagai Variasi n-heksana (Waktu Reaksi = 8 Jam, Konsentrasi Enzim *Candida antarctica* = 0,05% b/b, Rasio MISM : Gliserol = 1:2 mol)

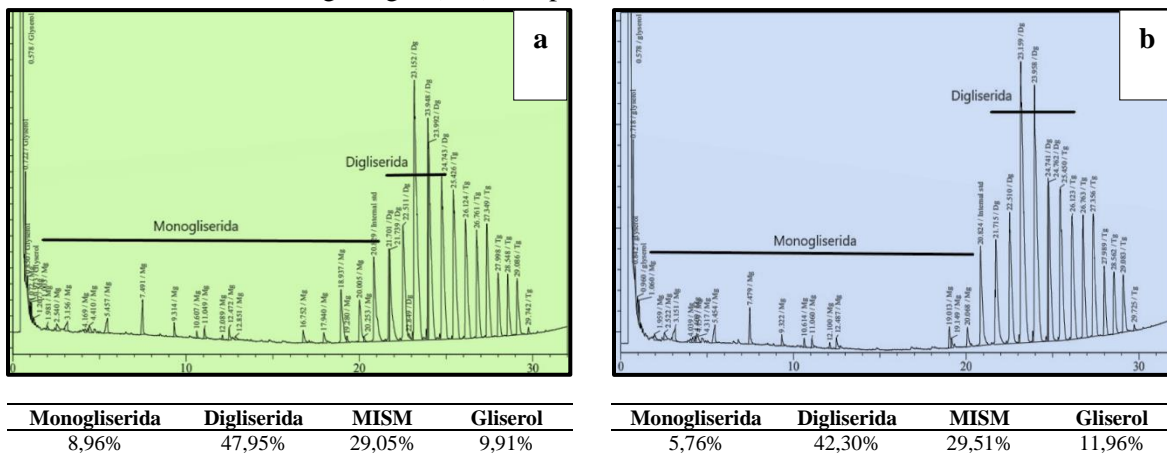
Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan atas penggunaan pelarut terhadap peningkatan konversi substrat. Pada reaksi enzimatis, untuk rasio pelarut n-heksana 1:0 (b/v) diperoleh konversi substrat sebesar 32,4% setelah 8 jam reaksi. Sementara pada reaksi enzimatis dengan penambahan pelarut n-heksana dengan rasio 1:1 (b/v), diperoleh peningkatan konversi substrat yang cukup signifikan sebesar 51,8%. Sementara pada reaksi non enzim, diketahui bahwa peningkatan rasio pelarut menunjukkan peningkatan konversi substrat secara linier. Hal ini disebabkan oleh peningkatan rasio pelarut dapat meningkatkan homogenitas campuran reaksi, sehingga peluang kontak antara molekul MISM dan gliserol semakin besar. Selain itu, n-heksana adalah senyawa organik yang bersifat inert sehingga tidak mereduksi salah satu reaktan. Konversi substrat maksimal untuk reaksi non enzim berada pada rasio pelarut 1:10 (b/v) sebesar 52,1%. Walaupun reaksi non enzim menunjukkan peningkatan konversi substrat, tetapi penggunaan enzim lipase *Candida antarctica* sebagai bioakalis tetap memberikan konversi substrat yang lebih tinggi.

Pada rasio MISM : n-heksana pada 1:1 (b/v), enzim *Candida antarctica* = 0,05% (b/b), rasio MISM : gliserol = 1:2 mol diperoleh konversi substrat optimal sebesar 51,8%. Sementara dengan peningkatan rasio n-heksana pada 1:2 (b/v) telah diperoleh konversi substrat yang lebih tinggi dari reaksi non enzim pada rasio n-heksana = 1:10 (b/v) sebesar 54,0%. Pada reaksi enzimatik, konversi substrat mencapai kondisi optimal sebesar 58,29% diperoleh pada rasio n-heksana = 1:3 (b/v). Sementara peningkatan rasio pelarut diatas 1:3 (b/v) telah menunjukkan penurunan konversi substrat. Hal ini terjadi karena peningkatan rasio pelarut diatas 1:3 (b/v) telah menyebabkan toksisitas pada enzim lipase *Candida antarctica*. Toksisitas terjadi karena volume n-heksana yang berlebihan menyebabkan perubahan spesifitas enzim lipase terhadap substrat. Spesifitas enzim terhadap substrat berubah karena adanya peningkatan rigiditas atau kekakuan dari sisi aktif enzim. Rigiditas sisi aktif enzim menjadikan substrat tidak dapat berikatan membentuk kompleks enzim-substrat (Hariyadi, 1996). Berikut mekanisme pembentukan kompleks enzim-substrat dalam sisi aktif enzim.



Gambar 2. Mekanisme Pembentukan Kompleks Enzim Substrat Hingga Pelepasan Produk

Enzim *Candida antarctica* bekerja spesifik sehingga mekanisme pembentukan kompleks enzim-substrat mengikuti teori *lock and key*. Saat terjadi rigiditas, sisi aktif enzim tidak lagi fleksibel dan substrat tidak dapat masuk ke sisi aktif enzim sebab ukuran substrat yang lebih besar dibandingkan luas sisi aktif enzim. Untuk mengetahui yield MGDG yang dihasilkan dari pengaruh n-heksana, maka dilakukan analisis kromatografi gas (GC) dua perlakuan berbeda.



Gambar 3. Kromatogram Mono-Diglisericida Pada Rasio MISM : n-heksana Berbeda, (a) 1:3 b/v, (b) 1:0 b/v (Tanpa Pelarut)

Dari kromatogram GC (Gambar 3) menunjukkan profil peak yang sama sebab disintesis dari substrat yang sama. Pada rasio MISM : n-heksana = 1:3 b/v terlihat banyak peak MG dengan intensitas yang kuat. Peak MG mulai terdeteksi pada waktu retensi ± 1 menit hingga ± 21 menit. Peak DG terdeteksi pada waktu retensi ± 22 menit. Sedangkan pada menit awal terdeteksi peak gliserol dan peak MISM terdeteksi pada waktu retensi diatas 25 menit yang menunjukkan adanya substrat yang belum terkonversi menjadi MGDG. Pada perlakuan tanpa pelarut terdeteksi senyawa MG dan DG tetapi dengan jumlah peak yang lebih sedikit dibandingkan perlakuan dengan penambahan pelarut n-heksana. Total yield pada perlakuan dengan pelarut sebesar 56,91%, sedangkan tanpa pelarut total yield sebesar 48,06%. Hal ini memperkuat bahwa penambahan pelarut n-heksana sebagai perantara kelarutan antara MISM dan gliserol memiliki pengaruh signifikan terhadap peningkatan yield MGDG, dan enzim *Candida antarctica* mampu menahan n-heksana hingga batas rasio 1:3 b/v.

4. KESIMPULAN

Enzim *Candida antarctica* masih dapat mentoleransi keberadaan n-heksana hingga rasio MISM : n-heksana = 1:3 (b/v). Penggunaan n-heksana diatas 1:3 (b/v) menyebabkan penurunan konversi substrat karena meningkatnya rigiditas dari sisi aktif enzim. Pada rasio MISM : n-heksana = 1:3 (b/v) diperoleh konversi substrat sebesar 58,29%. Berdasarkan analisis GC diperoleh total yield MGDG = 56,91% dengan komposisi MG = 8,9574% dan DG = 47,9542%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian bekerja sama dengan Pusat Penelitian Kelapa Sawit-Medan (PPKS), khususnya Laboratorium Hasil dan Mutu (PAHAM) dan Laboratorium Minyak Sawit. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Bioteknologi Pangan dan Laboratorium Pengujian, Politeknik Negeri Lhokseumawe.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, F., Kurniasih, E., Faridah, F., & Ariefin, A. (2019). Applications Of Lipase Enzyme In Fatty Monoethanolamide Synthesis Based On Palm Fatty Acid Distillate. <https://doi.org/10.4108/eai.20-1-2018.2282449>.
- AOCS. (1998). Official Methods And Recommended Practices of The AOCS (6th ed). American Oil Chemist Society.
- Balqis, Putri., Kurniasih, E. (2020). Pemanfaatan Stearin Hasil Samping Teaching Factory Sebagai Bahan Baku Mono-digliserida. Teknik Dan Teknologi Baristand, Vol 15, Issue 30.
- Cetina, D. M., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2011). Application of Response Surface Design to Solvent, Temperature and Lipase Selection for Optimal Monoglyceride Production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 72(1-2), 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04017>.
- Collaço, A. C. A., Aguiéiras, E. C. G., Cavalcanti, E. D. C., & Freire, D. M. G. (2021). Development of An Integrated Process Involving Palm Industry Co-Products For Monoglyceride/Diglyceride Emulsifier Synthesis: Use of Palm Cake and Fiber For Lipase Production and Palm Fatty-Acid Distillate as Raw Material. Lwt, 135 (August 2020), 110039. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110039>.
- Foukis, A., Gkini, O. A., Stergiou, P., & Papamichael, E. M. (2018). New Insights And Tools For The Elucidation Of Lipase Catalyzed Esteri Fi Cation Reaction Mechanism In N -Hexane : The Synthesis Of Ethyl Butyrate. Molecular Catalysis, 455 (June), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.06.004>.

- Hariyadi, P. (1996). Katalisis Enzimatis Dalam Pelarut Organik. *Jurnal Ilmu Dan Teknik Pangan*, 1(1), 52–60. <https://www.researchgate.net/publication/259239985>.
- Hudson, B. J. F. (1993). Fatty Acids: Contents Properties Metabolism Gamma-linolenic Acid Analysis Dietary Importance Trans-fatty Acids: Health Effects Properties. 2297–2300.
- Kaewthang, W. (2004). Continuous Production of Monoacylglycerols by Glycerolysis of Palm Olein With Immobilized Lipase. Prince of Songkla University.
- Kaewthong, W., Sirisansaneeyakul, S., Prasertsan, P., & H-Kittikun, A. (2005). Continuous Production of Monoacylglycerols by Glycerolysis of Palm Olein With Immobilized Lipase. *Process Biochemistry*, 40(5), 1525–1530. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.002>.
- Kuntom, ainie., Lin, Siew Wai., ai, tan Yew., Idris, Nor Aini., Yusof, Mohtar., Sue, Tang Thin., Ibrahim, N. A. (2005). Malaysian Palm Oil Board (MPOB) Test Methode : A Compendium of Tests on Palm Oil Products Palm Kernel Products, Fatty acid, Food Related, Product and Other. Malaysian of Plantation Industries and Commodities, Malaysia.
- Kurniasih, E. (2014). Sintesa Mono-Digliserida Melalui Reaksi Gliserolisis. *Teknik Dan Teknologi Reaksi*, 14(1), 25–28.
- Miao, S., & Lin, D. (2018). Monoglycerides: Categories, structures, properties, preparations, and applications in the food industry. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21595-3>.
- Mintarti, I. S., & Kusumah, S. H. (2017). Kajian Aktivitas Antimikroba Monoasilgliserol (MDAG) dari Minyak Kelapa dan Minyak Inti Sawit. *Jurnal Ilmiah Indonesia*, 2(2), 65–76.
- Murod, M., Jambi, U., Yernisa, Y., & Jambi, U. (2019). Sifat Fisiko-Kimia MDAG Minyak Inti Sawit Hasil Pemurnian Menggunakan Creaming Demulsification Technique Psychochemical Properties of MDAG From Palm Kernel Stearin With Purification Using Creaming Demulsification. *Prosiding Seminar Nasional FKPT-TPI Tahun 2016*, 1 (1), pp. 412-415. ISSN 9786027467019.
- Palilingan, S. (2023). Sintesis Diasilgliserol Melalui Gliserolisis Enzimatis Kontinu Menggunakan Enzim Lipase Amobil. 7(1), 31–40. <https://doi.org/10.37033/fjc.v7i1.403>.
- Purnama, K. O., Setyaningsing, D., Hambali, E., & Taniwiryono, D. (2021). Peluang Palm Fatty Acid Distillate Dari Industri Minyak Sawit Dalam Pembuatan Mono-Digliserida. *Perspektif Review Pertanian Tanaman Industri*, 20 (1), 11.
- Rosita, G. (2016). Pembuatan dan Pemurnian Monogliserida dari Hasil Reaksi Gliserolisis CPO Sebagai Bahan Baku Pembuatan Poliuretan. *Seminar Nasional IPTEK Penerbangan Dan Antariksa*, 1(20), 195–203.
- Satyawali, Y., Cauwenberghs, L., Maesen, M., & Dejonghe, W. (2021). Lipase Catalyzed Solvent Free Synthesis Of Monoacylglycerols In Various Reaction Systems And Coupling Reaction With Pervaporation For In Situ Water Removal. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 166, 108475. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108475>.
- Scrimgeour, C. M., & Harwood, J. L. (2007). The Lipid Handbook. In *The Lipid Handbook with CD-ROM, Third Edition*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton
- Vidya, P., & Chadha, A. (2010). Enzymatic Pseudomonas Cepacia Lipase Catalyzed Esterification and Transesterification of 3-(Furan-2-yl) Propanoic Acid/ Ethyl Ester : A Comparison in Ionic Liquids vs Hexane. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 65(1–4), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.032>.
- A.S Yandri & Suhartati, Tati. (2018). Peningkatan Kestabilan Enzim. Penerbit Anugrah Utama Raharja. Bandar Lampung. ISBN : 978-602-5636-32-5.