

## Khamir Penghasil Lipase dan Karakterisasi Parsial Morfologinya

### Lipase Producing-Yeasts and Partial Characterization of Their Morphology

Bodhi Dharma<sup>1</sup>, Eggi Mallisa<sup>2</sup> dan Linda Oktavianingsih<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman. Jl. Barong Tongkok No. 4. Kampus Gn Kelua Universitas Mulawarman, Samarinda 75123.*

<sup>2</sup> *Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman. Jl. Barong Tongkok No. 4. Kampus Gn Kelua Universitas Mulawarman, Samarinda 75123.*

Dharma B., Mallisa E., Oktavianingsih L. 2022. Khamir Penghasil Lipase dan Karakterisasi Parsial Morfologinya – Jurnal Mikologi Indonesia Vol 6, No 1 (2022): 15–28. doi: 10.46638/jmi.v6i1.180

#### Abstrak

Dalam studi bioprospeksi, khamir penghasil lipase lebih mudah diisolasi dari substrat yang mengandung lipid. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi khamir penghasil lipase dari limbah lipid, dan melakukan perbandingan karakter fenotip khamirnya berdasarkan nilai dissimilaritas dari dendrogram dengan algoritma UPGMA. Pengisolasian *strain-strain* khamir dilakukan dari limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS), yang disampling pada tiga lokasi berbeda dan ditumbuhkan pada medium YEPDA. Sebanyak 54 isolat khamir berhasil diisolasi, kemudian dilakukan skrining dengan penggoresan titik pada medium *Tributyryn agar* (TBA) dilanjutkan inkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Karena isolat yang terisolasi besar jumlahnya, maka dipilih hanya lima *strain* yang memiliki nilai *Enzymatic Index* (EI) tertinggi untuk dianalisis lebih lanjut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelima *strain* khamir-lipolitik yang diisolasi tersebut mampu menghasilkan lipase dengan nilai EI bervariasi yaitu *strain* C.4.3.1 dengan EI = 4,47; C.3.3.2 dengan EI = 4,14; C.3.1.1 dengan EI = 3,72; D.3.3.1 dengan EI = 3,59; dan C.1.2.2 dengan EI = 3,43. Berdasarkan nilai jarak disimilaritas dan kluster dendrogram terhadap kelima *strain*, terdapat dua kluster besar yaitu kluster pertama (node 1) yaitu C.3.1.1 dan C.1.2.2, kluster kedua yang terdiri dari dua subkluster yaitu node 2 (*strain* C.3.3.2 dan D.3.3.1), dan node 3 (*strain* C.4.3.1). Dendrogram yang dihasilkan menunjukkan adanya perbedaan jarak disimilaritas antar *strain*, yang berarti kelima *strain* merupakan jenis yang berbeda.

**Kata kunci** – fenotip – khamir-lipolitik – kluster – skrining – TKKS

#### Abstract

*In bioprospecting lipase-producing yeasts, preferable to isolate the yeasts from lipid-containing substrates. The purpose of this study was not only to isolate lipase-producing yeasts from lipid-containing waste but also to compare the phenotypic traits of the yeasts using dissimilarity values and dendrogram with the UPGMA algorithm. Palm Oil Empty Fruit Bunch (POEFB) wastes as the sources of yeast isolates, which sampled at three different locations were inoculated on YEPDA medium. A total of 54 yeasts were successfully isolated. The isolates were then screened by colony-spotting method on Tributyrin agar (TBA) medium, followed by 48 hours of incubation at 30°C to determine the Enzymatic Index (EI). Due to so many isolates being collected, only the top five strains with the highest EI values were chosen for further study. According to the findings, the five isolated lipolytic-yeast strains, i.e. C.4.3.1, C.3.3.2, C.3.1.1, D.3.3.1, and C.1.2.2 were enabling to produce lipases with different EI values, i.e. 4.47, 4.14, 3.72, 3.59, and 3.43. Based on dissimilarity distance values and the dendrogram clusters, there were shown two major clusters: the first cluster (node 1), which includes the strains C.3.1.1 and C.1.2.2, and the second cluster, which includes the strains C.3.3.2 and D.3.3.1 in node 2, and strain C.4.3.1 in node 3. The resulting dendrogram reveals variations in the dissimilarity distance between strains, indicating that the five strains comprise various species.*

**Keywords** – cluster – lipolytic-yeast – phenotype – POEFB – screening.

## Pendahuluan

Industri bioteknologi menghasilkan banyak produk-produk pangan, tekstil, farmasi dan pakan ternak. Enzim merupakan salah satu produk industri bioteknologi yang sebagian besar dihasilkan dari mikroorganisme. Kebutuhan dalam negeri terhadap enzim baik yang digunakan dalam pengolahan pangan, pakan, tekstil, dan kebutuhan industri farmasi saat ini sangat tinggi. Untuk mencukupi kebutuhan tersebut, Indonesia masih mengimpor hampir seluruh kebutuhan enzim (sekitar 90%). Sebagai contoh, impor enzim untuk bahan industri farmasetika tahun 2007 adalah sebesar 2,988 triliun rupiah, tahun 2008 menjadi 3,391 triliun rupiah, dan pada tahun 2011 menjadi 4,55 triliun rupiah. Kebutuhan enzim dunia seiring kebutuhan dalam negeri Indonesia juga terus meningkat yaitu sebesar 6,5 % per tahun menjadi US\$ 5,1 miliar pada tahun 2009 (Badan Pusat Statistik, 2008; Trismilah dkk., 2014).

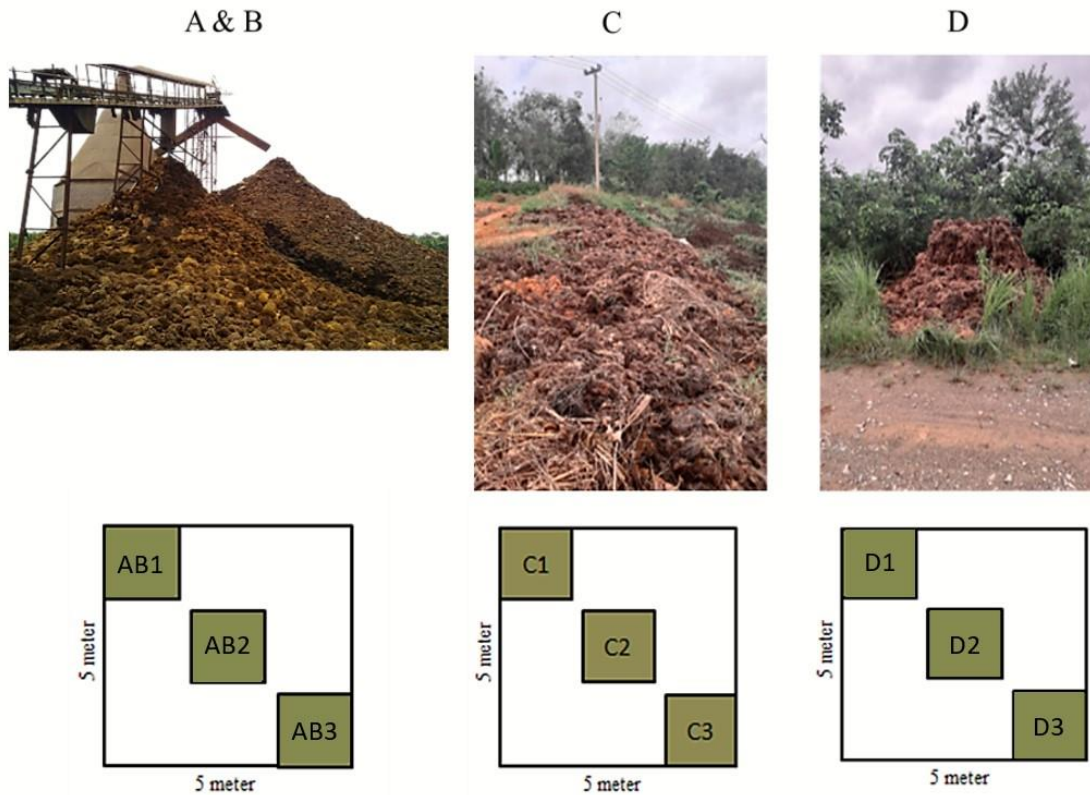
Salah satu enzim yang permintaan pasarnya tinggi baik di dunia ataupun didalam negeri, dan sering digunakan dalam proses industri adalah lipase. Lipase merupakan enzim yang dapat mengkatalis beragam reaksi misalnya hidrolisis trigliserida dan reaksi transesterifikasi sehingga memiliki peranan penting dalam biodegradasi limbah dan digunakan untuk aditif detergen, industri farmasi, biomedis, kosmetik, industri makanan, industri kulit, hidrolisis minyak, industri petrokimia minyak bumi, pengolahan limbah, dan oleokimia (produksi asam lemak dan turunannya) (Ramos-Sánchez *et al.*, 2015; Nadhilah, 2017; Rahayu, 2018). Lipase yang bersumber dari mikroorganisme lipolitik memiliki spesifisitas substrat dan kemampuan enzimatis aktif dalam pelarut organik (Sharma *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2012). Mikroorganisme yang digunakan dalam industri bioteknologi enzim adalah dari golongan prokariot yaitu bakteri, dan fungi dari golongan eukariot. Khamir yang merupakan kelompok fungi, juga merupakan penghasil lipase yang sangat baik, seperti *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, *Geotrichum candidum*, *Candida wickerhamii*, *Aerobasidium pullulans*, *Williopsis californica*, dan *Candida boidinii* (Pandey *et al.*, 1999; Ciafardini *et al.*, 2006; Goncalves *et al.*, 2014; Kamaladevi *et al.*, 2014).

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil *Crude Palm Oil* (CPO) dan turunannya dalam jumlah besar dari industri perkebunan kelapa sawit. Didalam industri kelapa sawit, proses produksi CPO akan selalu dihasilkan beberapa jenis limbah yang masih mengandung minyak. Pada limbah minyak hasil proses pembuatan CPO umumnya terdapat mikroorganisme lipolitik yang memiliki kecenderungan tumbuh di lingkungan yang memiliki kadar minyak tinggi dengan memanfaatkan sumber karbon dari minyak limbah tersebut (Nurdini, 2010; Swandi, 2015). Menurut Musa (2017), selain pada limbah cair minyak, Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) juga mengandung cukup banyak minyak yang merupakan residu hasil pemerasan tandan segar buah sawit, sehingga diperkirakan terdapat cendawan, kapang dan khamir-lipolitik yang hidup dan tumbuh pada residu minyak tersebut, dan dari penelitian, telah berhasil diisolasi beberapa jenis kapang yang merupakan *strain-strain Trichoderma* yaitu *Trichoderma* sp. dan *Hypocrea* sp. yang menghasilkan lipase dengan aktivitas cukup baik. Nwuche *et al.* (2013), berhasil mengisolasi dan menggunakan kapang *Aspergillus terreus* yang diisolasi dari *palm oil mill effluent* (POME) untuk penghasil lipase yang diimobilisasi pada *Luffa sponge*. Walaupun telah cukup banyak riset terdahulu terkait cendawan dan kapang penghasil lipase dari limbah pengolahan kelapa sawit, namun belum terdapat informasi terkait khamir-lipolitik yang pernah diisolasi dari daerah Kalimantan Timur, sehingga proses isolasi, skrining khamir-lipolitik, dan karakterisasi khamir tersebut menjadi suatu yang sangat penting dilakukan. Selain mengisolasi khamir, tahapan pembedaan *strain* juga penting dilakukan untuk memastikan bahwa isolat-isolat khamir terisolasi adalah *strain-strain* yang berbeda atau *strain* yang sama. Dengan penelitian ini telah berhasil diisolasi beberapa *strain* khamir-lipolitik penghasil lipase yang sangat potensial dan telah dikarakterisasi dan dikelompokkan berdasarkan karakter morfologi/fenotipnya, serta telah dikonfirmasi pengelompokan berdasarkan jarak disimilaritasnya. Informasi ini dapat menjadi referensi dasar yang berguna untuk mengembangkan khamir-lipolitik sebagai penghasil biokatalis dalam industri bioteknologi enzim, lebih jauh lagi dapat dilakukan karakterisasi enzimnya, modifikasi secara genetik untuk mengoptimalkan kemampuan khamir-lipolitik tersebut selanjutnya, serta *scale-up* produksi lipase juga diperlukan saat hilirisasinya.

## Metode Penelitian

### *Pengambilan Sampel Limbah TKKS*

Pengambilan sampel Limbah TKKS dilakukan secara *purposive sampling* dari tiga lokasi berbeda di Perkebunan Sawit PT. SUAN, di Kecamatan Muara Badak, Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur. Masing-masing lokasi dibedakan dari perbedaan waktu limbah TKKS keluar dari mesin penggilingan. Ilustrasi penyamplingan terdapat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Ilustrasi dan skema pengambilan sampel TKKS di Perkebunan Sawit PT. SUAN. (A&B) pengambilan sampel umur satu hari yang baru keluar dari mesin pengepresan kelapa sawit; (C) pengambilan sampel umur tiga hari; dan (D) pengambilan sampel umur 30 hari di area perkebunan kelapa sawit.

### Isolasi Strain Khamir Penghasil Lipase

Dalam proses isolasi dan skrining digunakan dua jenis medium yaitu *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* (YEPDA) dengan komposisi 10 g *yeast extract*, 20 g *peptone*, 20 g *dextrose*, 0,05 g *chloramphenicol* dan 20 g agar yang dilarutkan menjadi 1000 ml dengan akuades destilata, dan medium 1% Tributyrin Agar (TBA 1%), dengan komposisi 0,5% *peptone*, 0,3% *yeast extract*, 2% agar, 0,1% Tributyrin (Sigma Aldrich), dalam 1000 ml akuades dengan pH 7 (Kurtzman & Fell, 1998; Rai *et al.*, 2014). Kedua medium disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs.

Isolasi khamir dilakukan dengan metode inokulasi langsung. TKKS dipotong-potong menjadi ukuran kecil (2–3 cm) lalu diletakkan diatas medium YEPDA secara aseptis, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setiap koloni yang tumbuh dimurnikan dengan *streak* pada YEPDA, lalu diinkubasi kembali pada 30°C selama 24 jam. Setiap *strain* khamir yang telah murni digoreskan pada medium YEPDA miring dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 30°C selama satu malam, lalu biakan disimpan pada suhu 4°C (Thomas *et al.*, 2015; Patra *et al.*, 2020).

### ***Skrining Khamir Penghasil Lipase***

Skrining dilakukan dengan cara mentotolkan koloni *strain* khamir terpilih menggunakan tusuk gigi steril dengan pola *grid* pada lempeng medium 1% Tributyrin Agar (TBA) dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 48 jam. Kemudian, dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona bening (halo) dan diameter koloni (Gopinath, 2005; Griebeler *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2014). Indeks lipolitik atau *Enzymatic Index* (EI) dihitung dengan menggunakan rumus:

$$EI = \frac{\text{Diameter zona hidrolisis}}{\text{Diameter koloni}}$$

(Florencio *et al.*, 2012)

Dari seluruh khamir yang diisolasi dan diskriming, hanya lima *strain* khamir yang memiliki nilai EI terbesar dan diasumsikan sebagai *strain* khamir potensial penghasil lipase yang akan dikarakterisasi (Ngara & Zhang, 2018).

### **Karakterisasi Strain Khamir Potensial**

Karakterisasi *strain* khamir meliputi pengamatan makroskopis morfologi koloni dan pengamatan mikroskopis sel *strain* khamir potensial. Masing-masing *strain* khamir (5 *strain* potensial) digoreskan pada medium YEPDA, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Koloni yang tumbuh diamati dan didokumentasikan, selanjutnya ditentukan karakter bentuk, tepi, elevasi, tekstur, warna, dan konsistensi koloni (Yarrow, 1998). Selain itu dilakukan juga pengukuran diameter koloni dengan metode penotolan (tiga kali ulangan) menggunakan tusuk gigi steril pada medium YEPDA, setelah itu dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Pengukuran diameter koloni dilakukan dengan menggunakan jangka sorong digital (Ruusuvoori *et al.*, 2014). Pengamatan mikroskopis meliputi pengamatan bentuk sel, tipe *budding* sel dan ukuran sel yang dilakukan dengan cara membuat preparat apus sel khamir, lalu diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400× (mikroskop Zeiss-Primostar dengan kamera AxioCam ICc1 Rev.4 dan *software* ZEN). Semakin banyak deskripsi setiap *strain* khamir akan dapat mempermudah proses klasifikasi dan identifikasi (Ruusuvoori *et al.*, 2014). Hasil pengamatan koloni dan mikroskopis dicocokkan dengan buku acuan *The Yeast Taxonomic Study* (Kurtzman & Fell, 2011) dan informasi dari jurnal terkait.

### ***Analisis Kluster Karakterisasi Morfologi Khamir Potensial***

Pembuatan dendrogram UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages) dilakukan dengan menggunakan data karakterisasi morfologi (fenetik) yang didapat dari *strain* khamir potensial yang diubah menjadi data *scoring* menggunakan *software* MS Excel, kemudian di-inputkan kedalam *software* MVSP (Multi Variate Statistical Package) dan dijalankan untuk menghasilkan diagram dendrogram dengan analisis euklidian (Ohnuki *et al.*, 2017).

### **Hasil**

Penelitian dilakukan dengan menggunakan sampel TKKS di tiga tempat berbeda (empat ulangan dari setiap *site*) dalam lokasi Perkebunan PT. SUAN di Kecamatan Muara Badak, Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur, menggunakan metode *purposive sampling*. Sampel yang dikumpulkan kemudian langsung dibawa ke laboratorium. Setelah proses isolasi dengan metode inokulasi langsung yang diikuti dengan pemurnian biakan *strain* khamir, dan didapatkan *strain* khamir sebanyak 54 isolat khamir.

### **Skrining Penghasilan Lipase dengan Medium 1% Tributyrin Agar (TBA)**

Koloni-koloni yang diskriming pada medium TBA 1% menunjukkan terdapatnya zona bening disekeliling koloni, yang menandakan adanya aktivitas enzimatis lipase. Dari hasil

pertumbuhan koloni dan zona bening, dilakukan perhitungan diameter zona bening dibanding diameter koloni dengan tiga ulangan untuk menghitung nilai *Enzymatic Index* (EI) yang akan menunjukkan *strain-strain* khamir yang menghasilkan lipase ekstraselular. Berikut ini dipertelakan nilai EI dari keseluruhan *strain*. Kemudian juga diinformasikan pengelompokan berdasarkan aktivitas enzim yang terbagi dua, yaitu kelompok/kelas menengah ( $2 < EI < 5$ ) dan rendah ( $2 < EI$ ). Terdapat delapan *strain* yang mempunyai nilai EI dibawah angka dua yaitu *strain-strain* C.3.2.1, A.1.1.1, B.1.1.6, B.3.3.2, B.4.1.3, B.4.3.2, A.3.1.2, B.2.1.2, B.3.2.1.

**Tabel 1.** Nilai *Enzymatic Index* (EI) dari 54 *strain* khamir yang diisolasi dari limbah TKKS.

No.	Strain	EI	No.	Strain	EI	No.	Strain	EI
1	C.4.3.1	4,47±0,12**	19	A.4.1.1	2,96±0,24**	37	A.3.3.2	2,52±0,28**
2	C.3.3.2	4,14±0,20**	20	A.2.3.1	2,89±0,03**	38	B.1.3.1	2,46±0,19**
3	C.3.1.1	3,72±0,59**	21	A.2.2.5	2,84±0,33**	39	C.1.2.1	2,44±0,06**
4	D.3.3.1	3,59±0,45**	22	D.2.2.6	2,83±0,15**	40	B.1.1.3	2,41±0,26**
5	C.1.2.2	3,43±0,53**	23	B.1.1.8	2,83±0,18**	41	A.4.1.2	2,38±0,67**
6	D.1.3.3	3,40±0,23**	24	C.1.1.1	2,82±0,37**	42	A.3.3.4	2,34±0,75**
7	D.4.2.1	3,31±0,42**	25	B.2.2.2	2,82±0,48**	43	A.3.2.4	2,33±0,15**
8	D.3.2.1	3,29±0,25**	26	B.4.3.3	2,77±0,36**	44	C.2.1.1	2,32±0,33**
9	C.2.3.1	3,28±0,18**	27	C.2.2.2	2,76±0,80**	45	A.1.2.2	2,16±0,04**
10	A.1.3.1	3,25±0,22**	28	B.1.2.2	2,75±0,07**	46	C.3.2.1	2,13±0,25**
11	D.2.2.1	3,21±0,30**	29	A.2.2.1	2,73±0,14**	47	A.1.1.1	1,93±0,09*
12	A.2.1.1	3,17±0,31**	30	C.4.3.2	2,73±0,16**	48	B.1.1.6	1,85±0,12*
13	B.1.1.4	3,13±0,25**	31	C.2.2.3	2,70±0,33**	49	B.3.3.2	1,83±0,14*
14	A.1.2.1	3,13±0,27**	32	A.3.2.2	2,68±0,27**	50	B.4.1.3	1,83±0,05*
15	D.1.3.2	3,03±0,19**	33	A.1.1.6	2,68±0,76**	51	B.4.3.2	1,78±0,35*
16	A.1.1.4	3,00±0,34**	34	A.2.1.4	2,58±0,26**	52	A.3.1.2	1,71±0,09*
17	A.2.3.4	2,98±0,21**	35	A.2.1.3	2,57±0,37**	53	B.2.1.2	1,58±0,14*
18	D.4.3.1	2,97±0,29**	36	A.1.3.2	2,54±0,13**	54	B.3.2.1	1,50±0,11*

**Keterangan:** Kelas EI yaitu (\*) = rendah, (\*\*) = sedang, (\*\*\*) = tinggi (Goldbeck & Filho, 2013)

Dari setiap lokasi sampel diambil (sampel A, B, C dan D; notasi isolat berdasarkan lokasi didapatkan khamir), terdapat beberapa *strain* khamir yang sama-sama dapat menghasilkan zona bening, namun hanya dari sampel lokasi TKKS C dan D saja yang memiliki khamir dengan nilai EI tertinggi. TKKS sampel C dan D merupakan TKKS yang kondisinya tidak segar yang didapatkan di lahan perkebunan berumur satu minggu sampai satu bulan setelah keluar dari pabrik, sedangkan pada lokasi A dan B terdapat sampel TKKS yang masih segar dan panas, serta belum mengalami fermentasi sempurna setelah keluar dari alat pemeras tandan sawit.

Berdasarkan nilai hasil penghitungan *Enzymatic Index* (EI) dari lima *strain* khamir terbaik yang dilengkapi data diameter zona bening dan koloni serta kelas EI, dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini.

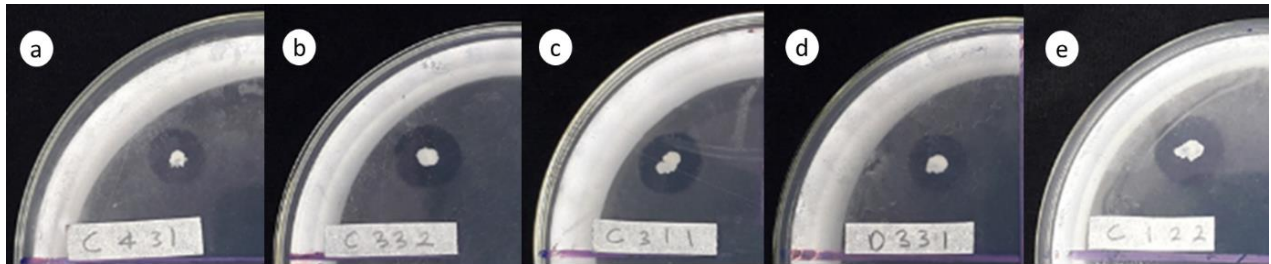
**Tabel 2.** Nilai *Enzymatic Index* (EI) dari 5 *strain* khamir terpilih yang diisolasi dari limbah TKKS.

No.	Strain	Ø Zona Bening (mm)	Ø Koloni (mm)	EI	Kelas EI
1.	C.4.3.1	14,54	3,25	4,47±0,12	**
2.	C.3.3.2	15,94	3,85	4,14±0,20	**
3.	C.3.1.1	15,89	4,28	3,72±0,59	**
4.	D.3.3.1	14,42	4,01	3,59±0,45	**
5.	C.1.2.2	17,33	5,05	3,43±0,53	**

**Keterangan:** (Ø) = Diameter; Kelas EI yaitu (\*) = rendah, (\*\*) = sedang, (\*\*\*) = tinggi (Goldbeck & Filho, 2013)



Dari 54 *strain* yang diskriming, untuk analisis lebih lanjut, diatasi hanya lima *strain* khamir saja yang memiliki nilai EI tertinggi antara lain *strain* C.4.3.1 sebesar 4,47; *strain* C.3.3.2 sebesar 4,14; *strain* C.3.1.1 sebesar 3,72; *strain* D.3.3.1 sebesar 3,59; dan *strain* C.1.2.2 sebesar 3,43. Penampakan zona bening dari kelima *strain* tersebut dapat dilihat pada Gambar 2 dan karakter morfologi koloninya dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.



**Gambar 2.** Hasil pengamatan Zona bening dan koloni *strain* yeast. (a). C.4.3.1 (EI = 3,47); (b). C.3.3.2 (EI = 3,14); (c). C.3.1.1 (EI = 2,71); (d). D.3.3.1 (EI = 2,60) dan (e). C.1.2.2 (EI = 2,43).

Lebarnya diameter ( $\emptyset$ ) zona bening menunjukkan bahwa adanya sekresi lipase secara ekstraselular, yang kemudian akan memutus ikatan asam lemak pada lipid (Tributyryn) dalam medium TBA 1%. Karena adanya terlepasnya tiga gugus asam lemak dengan tiga karbon (asam butirat) dari ikatannya dengan gliserol yang menghasilkan tiga oligomer asam lemak yaitu asam butirat (yang tidak berwarna dan menimbulkan bau khas) dan gliserol, maka akan menimbulkan perubahan warna pada TBA 1% dari warna yang buram (lipid) menjadi tidak berwarna (berupa asam lemak/ asam butirat).



**Gambar 3.**

*Strain* khamir penghasil lipase tertinggi hasil isolasi dari limbah TKKS yaitu *strain* (a) C.4.3.1; (b) C.3.3.2; (c) C.3.1.1; (d) D.3.3.1; (e) C.1.2.2.

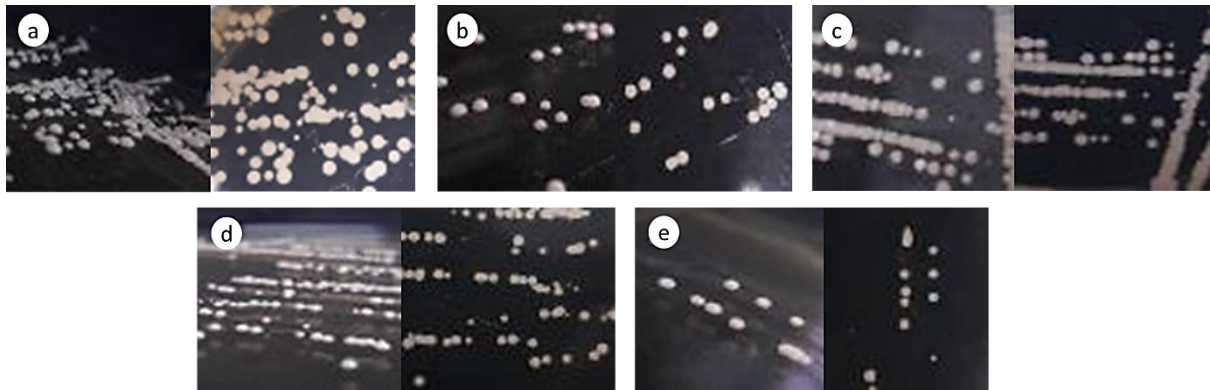
### Morfologi Koloni, Bentuk dan Ukuran Sel, dan Sel Budding Strain Khamir

Hasil pengamatan morfologi bentuk dan ukuran sel, serta tipe sel *budding* dari strain-strain khamir yang terseleksi dipertelakan pada Tabel 3, Tabel 4, dan Gambar 4 dibawah ini.

**Tabel 3.** Hasil pengamatan morfologi koloni lima *strain* khamir-lipolitik penghasil lipase.

No <i>Strain</i>	Bentuk	Elevasi	Tepi	Konsistensi	Permukaan	Tekstur	Warna	Diameter koloni (mm)
1. C.4.3.1	Circular	Pulvinate	Entire	Lembab	Mengkilap	Butyrous	Putih	5,54
2. C.3.3.2	Circular	Pulvinate	Entire	Kering	Mengkilap	Butyrous	Putih	5,61
3. C.3.1.1	Circular	Umbonate	Entire	Kering	Tidak Mengkilap	Butyrous	Krem	7,25
4. D.3.3.1	Circular	Pulvinate	Entire	Kering	Mengkilap	Butyrous	Putih	5,71
5. C.1.2.2	Circular	Convex	Entire	Kering	Buram	Butyrous	Krem	5,58

Bentuk morfologi koloni yang terlihat hanya satu tipe yaitu *circular*, bentuk tepi *entire* dan tekstur *butyrous*, sedangkan elevasi terdiri dari beberapa tampilan berbeda yaitu *pulvinate*, *umbonate*, dan *convex*, kemudian, konsistensi permukaan ada dua tipe yaitu *wet* (lembab) dan *dry* (kering). Bentuk permukaan ada dua tipe yaitu mengkilap dan tidak mengkilap (buram), sedangkan warna koloni adalah putih dan krem. Bentuk dan penampilan koloni dari kelima *strain* khamir dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 4 berikut ini.



**Gambar 4.** Morfologi koloni khamir-lipolitik penghasil lipase. (a-e). Koloni *strain* C.4.3.1, C.3.3.2, C.3.1.1, C.3.3.1, C.1.2.2 pada petri dengan medium YEPDA.

Untuk pengamatan bentuk, ukuran dan *budding* sel dilakukan dengan membuat preparat swab lima *strain* khamir, yang diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 $\times$ . Beberapa macam bentuk sel khamir yaitu bulat, bunder telur, silinder atau batang, poligonal, segitiga melengkung, botol, *apiculate* atau seperti lemon dan pseudomiselium seperti yang dipertelakan pada Tabel 4 dibawah ini.

**Tabel 4.** Hasil pengamatan sel dan pengukuran sel lima *strain* khamir.

No,	<i>Strain</i>	Bentuk sel	Tipe <i>Budding cell</i>	Panjang sel ( $\mu\text{m}$ )	Lebar sel ( $\mu\text{m}$ )	Diameter sel ( $\mu\text{m}$ )
1.	C.4.3.1	Oval	Multilateral	3,699 – 6,523	2,793 – 4,809	0,000
2.	C.3.3.2	Bulat	Multilateral	0,000	0,000	3,244 – 6,430
3.	C.3.1.1	Oval	Polar	3,074 – 6,162	2,040 – 4,631	0,000
4.	D.3.3.1	Oval	Polar	2,972 – 6,527	2,525 – 5,316	0,000
5.	C.1.2.2	Oval	Polar	4,157 – 5,321	2,635 – 4,303	0,000

#### **Deskripsi Strain-strain Khamir**

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan diatas, maka dapat dideskripsikan kelima *strain* khamir-lipolitik tersebut sebagai berikut:

**Strain khamir C.4.3.1**, merupakan *strain* khamir yang diinokulasi dari TKKS yang berumur tiga hari, *strain* ini memiliki nilai EI paling tinggi di antara jenis *strain* yang lain yaitu 4,47. *Strain* ini memiliki karakteristik morfologi koloni bentuk *circular*, elevasi *pulvinat*, tepi *entire*, konsistensi lembab, permukaan mengkilap, tekstur *butyrous*, berwarna putih dan memiliki diameter koloni sebesar 5,54 mm. Berdasarkan pengamatan sel, khamir *strain* C.4.3.1, *strain* ini memiliki bentuk sel oval dengan panjang 6,523–3,699  $\mu\text{m}$ , dan lebar 4,809–2,793  $\mu\text{m}$ . Didapati juga sel khamir yang sedang mengalami fase reproduksi aseksual multilateral *budding cell*.

**Strain khamir C.3.3.2**, merupakan *strain* yang didapatkan dari TKKS yang telah berumur 30 hari, memiliki EI sebesar 4,14 dengan karakteristik morfologi koloni bentuk *circular*, elevasi *pulvinat*, tepi *entire*, konsistensi kering, permukaan mengkilap, tekstur *botyrous*, berwarna putih dan memiliki diameter koloni sebesar 5,61 mm. Pada pengamatan mikroskopis, sel *strain* khamir C.3.3.2 memiliki bentuk bulat dengan diameter sebesar 6,430–3,244  $\mu\text{m}$ . *Strain* C.3.3.2 ini mempunyai reproduksi aseksual multilateral *budding*.

**Strain khamir C.3.1.1**, adalah *strain* yang diisolasi dari TKKS yang sudah berumur tiga hari, memiliki EI sebesar 3,72 dengan ciri morfologi koloni bentuk *circular*, elevasi *umbonate*, tepi *entire*, konsistensi kering, permukaan tidak mengkilap, tekstur *botyrous*, berwarna krem dan memiliki diameter koloni sebesar 7,25 mm. Pada pengamatan mikroskopis *strain* khamir C.3.1.1 didapatkan hasil bentuk sel oval dengan ukuran panjang sel 6,162–3,074  $\mu\text{m}$ , lebar sebesar 4,631–2,040  $\mu\text{m}$  dan memiliki tipe reproduksi polar *budding cell*. *Strain* ini mempunyai bentuk pembelahan aseksual berupa polar *budding*.

**Strain khamir D.3.3.1**, adalah *strain* yang diperoleh dari TKKS yang berumur 30 hari, memiliki EI sebesar 3,59 dengan ciri morfologi koloni bentuk *circular*, elevasi *pulvinate*, tepi *entire*, konsistensi kering, permukaan mengkilap, tekstur *butyrous*, berwarna putih dan memiliki diameter koloni sebesar 5,71 mm. Hasil pengamatan mikroskopis *strain* khamir D.3.3.1 menunjukkan bentuk sel oval dengan panjang 6,527–2,972  $\mu\text{m}$ , lebar 5,316–2,525  $\mu\text{m}$  dan memiliki tipe reproduksi polar *budding cell*.

**Strain khamir C.1.2.2**, didapatkan dari sampel TKKS berumur tiga hari, dengan nilai EI sebesar 3,43 dan memiliki ciri koloni bentuk *circular*, elevasi *convex*, tepi *entire*, konsistensi kering, permukaan tidak mengkilap, tekstur *botyrous*, berwarna krem dan memiliki diameter koloni sebesar 5,58 mm. Sedangkan pengamatan sel *strain* khamir C.1.2.2 didapatkan bentuk sel oval dengan panjang 5,321–4,157  $\mu\text{m}$ , lebar 4,303–2,635  $\mu\text{m}$  dan memiliki tipe reproduksi polar *budding cell*.

#### **Pengelompokan Strain-strain Khamir Penghasil Lipase**

Semua karakter morfologi baik berupa karakter-karakter penampakan koloni beserta ukurannya, dan hasil pengamatan morfologi sel baik berupa tipe *budding* serta bentuk sel khamir, selanjutnya dilakukan skoring *binary* yaitu angka nol bagi karakter yang tidak muncul dan angka satu bagi karakter yang terlihat. Semua data diinputkan kedalam MS Excel dan selanjutnya dikonversikan kedalam aplikasi MVSP. Terhadap hasil konversi dilakukan *running* untuk mengkonstruksi matrik disimilaritas yang selanjutnya dendrogram yang berbasis algoritma UGPMMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages*). Hasil olahan komputer dapat dilihat pada Tabel 5 dan Tabel 6.

**Tabel 5.** Matrik jarak disimilaritas dari analisis kluster antar *strain* khamir penghasil lipase.

<i>Distance matrix</i>	C.4.3.1	C.3.3.2	C.3.1.1	D.3.3.1	C.1.2.2
C.4.3.1	0.000				
C.3.3.2	4.472	0,000			
C.3.1.1	5.916	5.916	0,000		
D.3.3.1	3.651	3.651	4.655	0,000	
C.1.2.2	5.916	5.916	3.162	4.655	0.000

**Tabel 6.** Nilai disimilaritas analisis kluster antar *node*.

<i>Node</i>	Objek			
	Grup 1	Grup 2	Disimilaritas	<i>In group</i>
1	C.1.2.2	C.3.1.1	3.162	2
2	D.3.3.1	C.3.3.2	3.651	2
3	<i>Node 2</i>	C.4.3.1	4.062	3
4	<i>Node 3</i>	<i>Node 1</i>	5.496	5



## Pembahasan

Dalam tahap seleksi khamir penghasil lipase dibutuhkan substrat lipid analog seperti minyak olive yang berupa minyak alami dan substrat sintesis. Tributyrin merupakan salah satu substrat pada medium seleksi yang umum digunakan dalam proses skrining lipolitik-mikrobia penghasil lipase ekstraselular. Tributyrin memiliki struktur molekul dengan sifat permukaan substrat yang sangat aktif sehingga membuat substrat ini mudah untuk bereaksi dengan lipase ekstraselular yang dihasilkan oleh *strain-strain* khamir-lipolitik. Jumlah dan aktivitas lipase diindikasikan dengan munculnya zona bening yang berupa asam butirat di sekitar koloni *strain* khamir pada suhu 30<sup>0</sup>C setelah masa inkubasi 48 jam (Wu & Tsai, 2004; Rai *et al.*, 2014; Bharathi *et al.*, 2019). Nilai aktivitas dan jumlah lipase ditentukan dengan menghitung *Enzyme Index* (EI) yang dipertelakan pada persamaan oleh Florencio *et al.* (2012).

Hasil pengamatan dan penghitungan nilai EI dari 54 *strain* khamir (Tabel 1), terlihat bahwa secara garis besar terbagi menjadi dua kelas rasio nilai EI yaitu kelas rendah dan kelas menengah. Lima *strain* khamir dengan nilai EI tertinggi diasumsikan memiliki aktivitas lipase ekstraseluler lebih tinggi dibanding *strain* lain. Nilai EI dapat digunakan untuk mengelompokkan *strain* khamir menjadi tiga kelas rasio yaitu rendah (EI < 2), medium (2 < EI < 5), dan tinggi (EI > 5) (Anagnostakis & Hankin, 1975; Goldbeck & Filho, 2013; Paludo *et al.*, 2018). Berdasarkan kelas rasio ini, kelima *strain* khamir yang terpilih digolongkan ke dalam kelompok medium.

Dalam proses pengisolasian isolat, hasil aktivitas lipolitik dari isolat menunjukkan lokasi penyamplangan TKKS mempengaruhi *strain* isolat yang diisolasi. Pada semua lokasi penyamplangan, didapatkan *strain* khamir yang semuanya menunjukkan terdapatnya zona bening, namun hanya dari dibandingkan dengan khamir dari lokasi sampel lainnya, khamir-khamir dari sampel lokasi TKKS C dan D memiliki nilai EI tertinggi. Berdasarkan kondisi sampel TKKS, pada lokasi C dan D terdapat TKKS yang sudah tidak segar yang berumur satu minggu sampai satu bulan setelah pemerasan dan ditempatkan diluar pabrik. Kemungkinan *strain* khamir yang menunjukkan aktivitas lipolitik yang tinggi, karena telah beradaptasi dengan baik dalam waktu yang cukup lama, sehingga aktivitas lipolitiknya sudah cukup optimal. Menurut Obire (2015), fungi dan khamir banyak didapatkan pada proses pemanenan dan fermentasi kelapa sawit karena berperan penting dalam pembusukan kelapa sawit melalui aktivitas lipolitik.

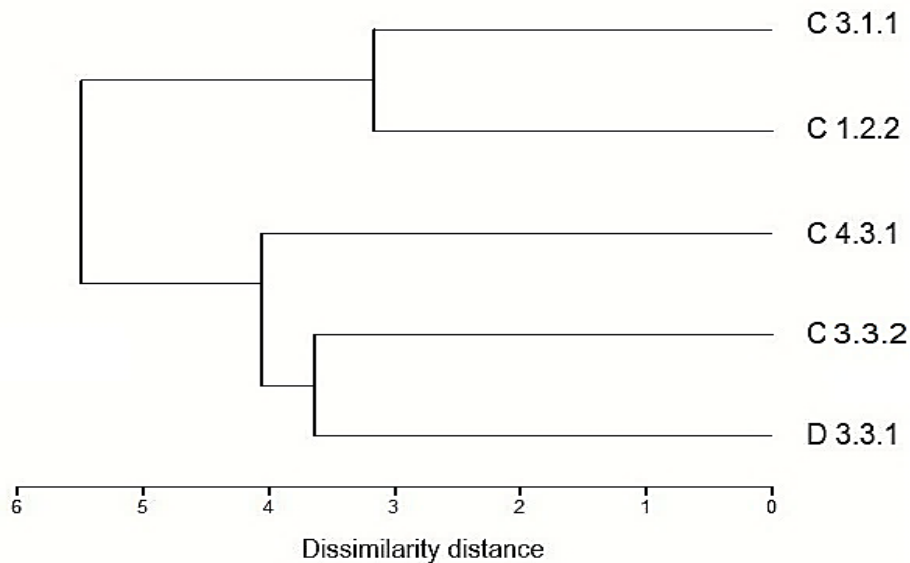
Berdasarkan reproduksi aseksualnya *strain* khamir C.4.3.1 dan C.3.3.2 mempunyai reproduksi aseksual multilateral *budding*, sehingga berdasarkan sistem klasifikasi khamir kedua *strain* ini diperkirakan memiliki kedekatan dengan *Pichia* sp., dan berdasarkan manual identifikasi (Boekhout & Kurtzman, 1996; Kurtzman *et al.*, 2011), keduanya diduga mendekati jenis *P. nakasei*. Kemudian tiga *strain* khamir yaitu C.3.1.1, D.3.3.1, dan *strain* C.1.2.2 memiliki sistem pembelahan aseksual berupa *polar budding*. Berdasarkan pedoman identifikasi khamir yaitu dalam Boekhout & Kurtzman (1996) dan Kurtzman & Fell (2011), karakteristik tersebut didapatkan pada genus *Cryptococcus* spp. Pendapat Yarrow (1998) lebih memperjelas pendekatan jenis dengan menggunakan tipe reproduksi, bahwa tipe reproduksi sangat penting sebagai ciri khusus dari suatu khamir untuk dapat diidentifikasi karena beberapa khamir memiliki tipe reproduksi yang spesifik.

Beberapa penelitian terdahulu telah mencantumkan kedua genera diatas (*Pichia* dan *Cryptococcus*) sebagai genera khamir penghasil lipase ekstraselular. Dalam penelitian Hou (1997), yang telah menyeleksi 25 khamir pada medium skrining lipase mendapatkan sembilan jenis *Pichia* spp. yaitu *P. americana* Y-2156, *P. bimundalis* Y-5343, *P. candensis* Y-2340, *P. holstii* Y-7914, *P. lynferdii* Y-7723, *P. muscicola* Y-7005, *P. muscicola* Y-7006, *P. petersanii* YB-3808, *P. sydowiorum* Y-7130. Kemudian, dari sejumlah 427 *strain* khamir yang diisolasi

dari air laut, sedimen tanah laut, lumpur garam, saluran pencernaan ikan-ikan laut, dan alga laut, Wang *et al.* (2007) mendapatkan satu strain *Pichia* yaitu *Pichia guilliermondii* strain N12c selain strain *Candida intermedia* YA01a, *C. parapsilosis* 3eA2, *Lodderomyces elongisporus* YF12c, *C. quercitrusa* JHSb, *C. rugosa* w18, *Yarrowia lipolytica* N9a, *Rhodotorula mucilaginosa* L10-2 dan *Aureobasidium pullulans* HN2.3. Zullo & Ciafradini (2008), juga mendapatkan dua strain khamir yang menyerupai *Pichia mexicana* dan *P. minuta* dari isolasi yeast penghasil lipase dari *virgin olive oil* komersial. Penelitian Bussamara *et al.* (2010), terhadap khamir *phylloplane* dari tumbuhan *Hibiscus rosa-sinensis* L. berhasil mengisolasi 29 khamir yang beberapa diantaranya potensial dalam *scaling-up* produksi lipase dan salah satunya adalah dari genus *Cryptococcus* yaitu *Cryptococcus* sp. HB80 selain khamir *Pseudozyma hubeiensis* HB85A, *Debaryomyces occidentalis-like* HB83, dan *P. hubeiensis* HB85A, serta *C. humicola-like* strain HB76A, *C. laurentii* strain HB18. Dalam dekade terakhir, Kuncharoen *et al.* (2020), berhasil untuk pertama sekali mengisolasi beberapa strain khamir penghasil lipase yang sangat potensial dari limbah makanan berlemak dan limbah pengolahan minyak kelapa sawit di Thailand. Beberapa strain *Pichia* berhasil diisolasi diantaranya strain-strain *Pichia kudriavzevii* yaitu *P. kudriavzevii* SKY-1, *P. kudriavzevii* FFY-2, *P. kudriavzevii* PFY-10, *P. kudriavzevii* PFY-16, *P. kudriavzevii* PFY3-2, *P. kudriavzevii* PFY7-2, *P. kudriavzevii* MFY-1, *P. kudriavzevii* MBY-1, *P. kudriavzevii* MBY-2, 4S-2T, dan *P. kudriavzevii* 2E-1D. Selain itu juga berhasil diisolasi *Candida ethanolica* 7E-1D, *C. tropicalis* (5 strain yaitu 1E-1D, 9E-1D, LJ-1, MPY-1 dan FFY-1), *Magnusiomyces capitatus* (tiga strain yaitu 5E-1T, 5E-2T, dan 5E-2D), *M. ingens* 4E-3D, *Hanseniaspora opuntiae* PFY3-1, *Lodderomyces elongisporus* 1E-1T, *Ogataea polymorpha* 3E-1T, *Saccharomyces cerevisiae* (dua strain yaitu STY1-1 dan STY1-2), *Clavispora lusitaniae* (dua strain, yaitu 8E-2T dan 5S-1T), *Yarrowia lipolytica* (dua strain yaitu Fy-12 dan Fy-13), *Trichosporon insectorum* 4E-1D, dan *T. asteroides* (dua strain, yaitu 8E-1T dan 8E-1D). Dari beberapa penelitian dalam tiga dekade tersebut dapat dinyatakan bahwa kedua genera yaitu *Pichia* dan *Cryptococcus* merupakan dua genera yang potensial sebagai penghasil lipase sampai pada tahap skala tinggi (*scale-up*) dalam industri bioteknologi enzim.

### **Analisis Kluster Karakterisasi Morfologi Strain Khamir Potensial**

Analisis kluster dilakukan dengan menggunakan data 57 variabel dalam 13 karakter (tidak dipublikasikan) dan lima sampel strain khamir potensial yang telah diubah kedalam bentuk data *scoring* untuk dilakukan analisis kluster *euclidian* sehingga didapatkan hasil analisis kekerabatan berdasarkan data karakter dalam bentuk diagram dendrogram, nilai jarak disimilaritas antar strain khamir, dan perbandingan nilai disimilaritas antar kelompok yang terbentuk. Analisis kluster dilakukan untuk mendapatkan keanekaragaman jenis dan pengelompokan berdasarkan banyak variabel dan karakter khamir khususnya berbasiskan pada pengamatan morfologi (fenetik). Analisis kluster tidak dapat memastikan identifikasi suatu jenis khamir, namun dapat menjelaskan keragaman jenis dan pengelompokannya. Menurut Yarrow (1998) dan Jumiati (2012), pengamatan morfologi merupakan salah satu cara awal untuk melakukan proses klasifikasi dan identifikasi jenis khamir. Kemudian, menurut Ruusuvoori *et al.* (2014), jumlah variabel dan karakteristik yang diamati dapat ditingkatkan pada setiap jenis yang dikarakterisasi morfologinya, sehingga dapat memperbanyak deskripsi dan akurasi pengelompokan strain khamir serta mempermudah proses klasifikasi dan identifikasi.



**Gambar 5.** Dendrogram analisis kluster *strain* khamir penghasil lipase berbasis kluster *eucladian* menggunakan algoritma UPGMA.

Hasil analisis kluster (pengelompokan berdasarkan kesamaan karakter fenetik) pada Gambar 5 dan Tabel 6, menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok besar (grup). Kelompok pertama terdiri dari dua node yaitu *node 1* dengan anggotanya khamir *strain* C.3.1.1 dan C.1.2.2, sedangkan kelompok kedua terbagi menjadi dua subkelompok yang terdiri dari *node 3* yang berupa *strain* khamir C.4.3.1 dan *node 2* yang terdiri dari dua *strain* khamir yaitu C.3.3.2 dan D.3.3.1. Hasil analisis klustering dengan jarak matriks *eucladian* menunjukkan bahwa semakin kecil nilai jarak *eucladian* (mendekati nol) maka semakin menunjukkan similaritas dari dua jenis atau *strain* khamir yang dianalisis (Ohnuki, 2017). Dua kelompok besar ini dibedakan dengan nilai ketidaksamaan sebesar 5,496. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok (grup) pertama terdiri dari node tunggal (*node 1*) dengan dua anggota *strain* khamir yaitu *strain* khamir C.3.1.1 dan C.1.2.2 dengan nilai ketidaksamaan sebesar 5,496 terhadap kelompok (grup) dua. Pada kelompok (grup) kedua *strain* khamir C.4.3.1 merupakan *strain* khamir yang ditempatkan pada kluster tersendiri atau tidak tergolong sama dengan 2 *strain* lainnya yang berada dalam satu grup. *Strain* C.4.3.1 menunjukkan perbedaan dengan anggota dari *node 2* yang berupa *strain* khamir C.3.3.2 dan D.3.3.1 dengan nilai ketidaksamaan sebesar 4,062. Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya lima *strain* khamir potensial penghasil enzim lipase yang berhasil diisolasi dari limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). Kelima *strain* khamir paling potensial tersebut memiliki karakteristik morfologi (fenetik) yang berbeda-beda dan keanekaragaman yang cukup tinggi yang ditunjukkan dari nilai jarak disimilaritasnya, sehingga menghasilkan kluster jenis yang menunjukkan adanya kemungkinan perbedaan jenis diantara kelima *strain* khamir tersebut. Karena dalam penelitian ini karakter morfologi yang diamati belum didukung oleh karakter fisiologi dan biokimia, untuk analisis selanjutnya perlu dilakukan analisis fisiologi/biokimia dan analisis molekuler untuk mengkonfirmasi perbedaan fenotip dari kelima *strain* khamir tersebut diatas. Menurut Palmann (2001), penggunaan karakter sifat morfologi adalah sarana yang berguna dan efektif pembiayaannya dan kemungkinan dapat menampilkan karakter-karakter yang dapat digunakan untuk aplikasi lanjutannya. Analisis karakteristik morfologi (fenetik) telah pernah dilakukan oleh Viana *et al.* (2017), dan sangat membantu dalam pengungkapan biodiversitas dari beberapa *strain khamir*.

Penelitian ini mempresentasikan bahwa khamir-lipolitik yang diisolasi dari limbah TKKS mempunyai kemampuan yang cukup baik dan tergolong kelompok medium dalam kemampuan hidrolis molekul tributyrin dengan lipase ekstraselular yang dihasilkannya. Kemudian, telah didapatkan lima *strain* khamir-lipolitik yang memperlihatkan kemampuan hidrolisis terhadap lipid yang berbeda-beda. Kelima *strain* diasumsikan merupakan genera *Pichia* dan/atau *Cryptococcus* berdasarkan tipe reproduksi aseksualnya. Walaupun demikian, dalam pengelompokannya tidak menunjukkan hubungan antara kemampuan hidrolisis lipid dengan keanekaragaman jenisnya.

## PUSTAKA

- Anagnostakis, S.L. & Hankin, L. (1975). Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. *Journal of Milk and Food Technology*, 38(10), 570–572.
- Badan Pusat Statistik. (2008). *Buletin statistik perdagangan luar negeri*. CV Lintama Printing.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G. & Komathi, S. (2019). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolate from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University – Science*, 31 (4), 898–901.
- Boekhout, T. & Kurtzman, C.P. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. In K. Wolf (Ed.). *Nonconventional yeasts in biotechnology, a handbook* (pp. 1–81) Springer, Berlin.
- Bussamara, R., Fuentesfria, A.M., de Oliveira, E.S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., & Vainstein, M.H. (2009). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, 101(1), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.063>.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A. & Iride, A. (2006). Lipase production by yeast from virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23(1), 60–67.
- Florencio, C., Couri, S. & Farinas, C.S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strain. *Enzyme Research*, Vol. 2012, 1–7, <https://doi.org/10.1155/2012/793708>
- Goldbeck, R. & Filho, F.M. (2013). Screening, characterization, and biocatalytic capacity of lipases producing wild yeasts from Brazil biomes. *Food Science and Biotechnology*, 22, 79–87. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0052-6>
- Gonçalves, F.A.G., Colen, G., & Takahashi, J.A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *Scientific World Journal*. Vol. 2014, Article ID 476207, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
- Gopinath, S.C.B., Anbu, P. & Hilda, A. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, 46(2), 119–126.
- Griebeler, N., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter F., Vardanega, R., Cechet, J.L., Luccio, M.D., de Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R.L., Rigo, E. & Ninow, J.L. (2009). Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 578–586.
- Jumiati, Bintari, S.H., & Mubarak, I. (2012). Isolasi dan identifikasi khamir secara morfologi di tanah kebun wisata pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika*, 4(1), 27–35.
- Kamaladevi, B., Prabhavathi, P., Sankareswaran, M., Anbalagan, S., Radhakrishnan, N. & Prabhu, D. (2014). Screening and medium optimization of lipase producing bacteria from saltpan. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 2(2), 72–77.
- Kuncharoen, N., Techo, S., Savarajara, A., & Tanasupawat, S. (2020). Identification and lipolytic activity of yeasts isolated from foods and wastes. *Mycology*, 11(4), 279–286. <https://doi/10.1080/21501203.2020.1745922>

- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout (2011). *The yeast: a taxonomic study*. (5<sup>th</sup> ed., pp. 21–44). Elsevier. Amsterdam.
- Musa, H., Han, P.C., Kasim, F.H., Gopinath, S.C.B. & Ahmad, M.A. (2017). Turning oil palm empty fruit bunch waste into substrate for optimal lipase secretion on solid state fermentation by *Trichoderma* strains. *Process Biochemistry*, 63, 35–41.
- Nadhilah, D. (2017). *Produksi dan karakterisasi lipase dari Lactobacillus plantarum SK (5) asal bekasam*. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor (IPB).
- Ngara, T.R. & Zhang, H. (2018). Recent advances in function-based metagenomic screening. *Genomic, Proteomics & Bioinformatics*, 16 (6), 405–415.
- Nurdini, A.L. (2010). *Penapisan bakteri lipolitik asal fruktosfer kelapa sawit*. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor.
- Nwuche, C.O., Aoyagi, H. & Ogbonna, J.C. (2013). Lipase production from palm oil mill effluent by *Aspergillus terreus* immobilized on Luffa sponge. *Journal of Applied Sciences*, 13 (24), 5661–5671.
- Obire, O. & Hakam, I.O. (2015). Evaluation of the microbiological quality of palm fruits in the various stages of palm oil production. *Current studies in comparative education, Science and Technology*, 2(2), 313–323.
- Ohnuki, S., Okada, H., Friedrich, A., Kanno, Y., Goshima, T., Hasuda, H., Inahashi, M., Okazaki, N., Tamura, H., Nakamura, R., Hirata, D., Fukuda, H., Shimoi, H., Kitamoto, K., Watanabe, D., Schacherer, J., Akao, T. & Ohya, Y. (2017). Phenotypic diagnosis of lineage and differentiation during sake yeast breeding. *G3 Genes Genomes Genetics*, 7(8), 2807–2820.
- Palmann, C.L. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 198–203.
- Paludo, M.P., de Oliveire, K.S.D, Trevisol, T.C. & Burkert, J.F. (2018). Isolation of lipase producing yeast from industrial oily residues in different culture media. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 2348–2362.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77(1), 149–162. <http://www.jstor.org/stable/24102923>.
- Patra, J.K., Das, G., Das S.K. & Thatoi, H. (2020). *A practical guide to environmental biotechnology*. (1<sup>st</sup> Edition., pp. 99–104). Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-6252-5>.
- Pera, L.M., Romero, C.M., Baigori, M.D. & Castro, G.R. (2006). Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 247–252.
- Rahayu, Y.P. (2018). *Uji aktivitas lipase dan biosurfaktan dari bakteri keratinolitik*. (Thesis). Universitas Sumatera Utara.
- Rai, B., Shrestha, A., Sharma, S. & Joshi, J. (2014). Screening, optimization and process scale up for pilot scale production of lipase by *Aspergillus niger*. *Biomedicine and Biotechnology*, 2(3), 54–59.
- Ramos-Sánchez, L.B., Cujilema-Quitio, M.C., Julian-Ricardo, M.C., Cordova, J. & Fickers, P. (2015). Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 5(2), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000203>.
- Romero, C.M., Pera, L.M., Loto, F., Vallejos, C., Castro, G. & Baigori, M.D. (2012). Purification of an organic solvent tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA135 and its application in ester synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 25–31.
- Ruusuvuori, P., Lin, J., Scott A.C., Tan, Z., Sorsa, S., Kallio, A., Nykter, M., Yli-Harja, O., Shmulevich, I. & Dudley, A.M. (2014). Quantitative analysis of colony morphology in yeast. *BioTechniques*, 56(1), 18–27.



- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662.
- Swandi, M.K., Periadnadi & Nurmiati. (2015). Isolasi bakteri pendegradasi limbah cair industri minyak sawit. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 4(1), 71–76.
- Thomas, P., Sekhar, A.C., Upreti, R., Mujawar, M.M. & Sadiq, S.P. (2015). Optimization of single plate serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse sample. *Biotechnology Reports*, 8, 45–55.
- Trismilah, Sumaryono, W., Malik, A. & Sadikin, M. (2014). Isolasi dan karakterisasi protease serupa tripsin (PTS) dari *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 12(1), 57–66.
- Viana, N.C., Portugal, C., & da Cruz, S.H. (2017). Morphophysiological and molecular characterization of wild yeast isolates from industrial ethanol process. *African Journal of Microbiology Research*, 11(37), 1422–1430.
- Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Liu, Z. & Li, J. (2007). Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. *Annals of Microbiology*, 57(4), 495–501.
- Wu, H.S. & Tsai, M.J. (2004). Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6–7), 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.08.002>.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeast. In C.P. Kurtzman & J.W. Fell. (Eds.). *The yeast: a taxonomic study* (4<sup>th</sup> edition., pp. 77–100). Elsevier, Amsterdam.
- Zullo, B.A., & Ciafardini, G. (2008). Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 25(8), 970–977. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.002>.