



PENINGKATAN AKTIVITAS LIPASE KAPANG LIMBAH KERNEL DAN NUT KELAPA SAWIT DENGAN RADIASI GAMA DAN ULTRAVIOLET

Enhancement of Lipase Activity of Molds Isolated from Kernel and Nut Waste of Oil Palm with Gamma and Ultraviolet Irradiation

Aris Indriawan¹, Wibowo Mangunwardoyo¹, Dadang Suhendar², Trismilah^{2*}

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok

²Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika, BPPT, Kawasan PUSPIPTK, Tangerang Selatan

*Email: trismilah@bppt.go.id

ABSTRACT

*Molds isolated from oil palm waste sampled from Malingping, Lebak, Banten, West Java have the potential for lipase production. This study aimed to increase the fungal lipase activity with gamma radiation and ultraviolet light (UV). NA and KC mold spores were exposed to various gamma radiation doses of 1, 2, 3 and 4 kGy. The best of these NA and KC resulted mutants were subsequently subjected to ultraviolet mutations for 1, 2, 3, and 4 hours, at dose of 0.1 J/cm², 254 nm, 20 cm. Lipase activity was tested by the Lindfield method. Results showed that gamma radiation affected the lipase activity of NA1kGy mutants (8.58 U/mL) and KC1 kGy (8.25 U/mL), each increased the lipase activity by 4.6% and 3.13% higher than the wild type, respectively. Mutations with ultraviolet had an effect on mutant lipase activity of KC4H 10U/mL and NA3H 9.25 U/mL, each increased the lipase activity by 25% and 15.63% higher than the wild type, respectively. Based on phenotypic and phylogenetic (28srRNA) approaches, KC mold had a 100% similarity with *Aspergillus fumigatus* strain RA204.*

Keywords: *gamma radiation, KC mold, lipase, NA mold, ultraviolet light*

ABSTRAK

Kapang dari limbah kelapa sawit diisolasi dari Malingping, Lebak, Banten, Jawa Barat berpotensi untuk menghasilkan lipase. Penelitian ini bertujuan meningkatkan aktivitas lipase kapang dengan radiasi sinar gama dan sinar ultraviolet (UV). Spora kapang NA dan KC dipaparkan pada berbagai radiasi gama dosis 1, 2, 3 dan 4 kGy. Hasil terbaik dari mutan NA dan KC dilanjutkan dengan mutasi ultraviolet dengan lama inkubasi 1, 2, 3, dan 4 jam, dosis 0,1 J/cm², 254 nm, 20 cm. Aktivitas lipase diuji dengan metode Lindfield. Hasil penelitian menunjukkan bahwa radiasi gama berpengaruh pada aktivitas lipase mutan NA 1kGy 8,58 U/mL dan KC1 kGy 8,25 U/mL, masing-masing menaikkan aktivitas lipase sebesar 4,6% dan 3,13% dari *wild type*-nya. Hasil mutasi dengan ultraviolet berpengaruh pada aktivitas lipase mutan KC4H 10U/mL dan NA3H 9,25 U/mL, masing-masing menaikkan aktivitas lipase sebesar 25% dan 15,63% dari *wild type*-nya. Berdasarkan pendekatan fenotipik dan filogenetik (28s rRNA), isolat kapang kernel C memiliki similiaritas 100% dengan spesies *Aspergillus fumigatus* strain RA204.

Kata Kunci: kapang KC, kapang NA, lipase, radiasi sinar gama, sinar ultraviolet

PENDAHULUAN

Lipase merupakan enzim yang dapat ditemukan pada mikroorganisme, tumbuhan dan hewan. Lipase mampu mengkatalis hidrolisis dan sintesis rantai panjang *acylglycerols* (triacylglycerol acyl-hydrolases, EC 3.1.1.3) (Andualema dan Gessesse 2012). Enzim tersebut dapat menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol dengan melepas gugus asam dan alkohol. Lipase merupakan salah satu enzim yang memiliki potensial besar untuk aplikasi komersial karena memiliki selektifitas yang luas dan substrat yang spesifik. Selain itu, lipase dapat mengkatalis beberapa reaksi kimia seperti hidrolisis, esterifikasi dan transesterifikasi (Prasad dan Manjunath 2012). Produksi biodiesel memerlukan biokatalis seperti lipase untuk mempercepat reaksi transesterifikasi dengan mengkonversi minyak menjadi ester esensial seperti metil oleat, metil linoleat dan metil stearat (Crabbe et al. 2001).

Lipase dapat diproduksi oleh beberapa mikroorganisme, yaitu bakteri, khamir dan kapang. Khamir dan kapang secara komersial digunakan untuk produksi lipase, tetapi kapang merupakan mikroorganisme yang mendapat perhatian khusus dibandingkan mikroorganisme lain, karena enzim kapang mempunyai substrat spesifik dan lebih stabil pada variasi kondisi fisik dan kimiawi (Gopinath et al. 2013). Selain itu, enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler dapat mempermudah proses ekstraksi dan pemurnian enzim yang akan mengurangi biaya produksi (Treichel et al. 2010). *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium restrictum*, *Rhizopus stolonifer* dan *R. miehei* merupakan beberapa kapang yang dapat memproduksi lipase (Kotogan et al. 2014; El-Batal et al. 2015).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan kemampuan kapang dalam menghasilkan lipase. El-Batal et al. (2015) melakukan mutasi dengan radiasi gama terhadap *A. niger* untuk meningkatkan produksi lipase. Peningkatan aktivitas lipase juga dilakukan oleh Iftikhar et al. (2010) dengan menggunakan radiasi gama terhadap *R. oligosporus*. Selain mutasi dengan radiasi sinar gama, peningkatan aktivitas lipase juga dapat dilakukan dengan radiasi ultraviolet. Prabakaran et al. (2009)

melakukan peningkatan aktivitas lipase terhadap *A. fumigatus* dan *Rhizopus* sp. dengan radiasi ultraviolet. Sinar ultraviolet dapat menyebabkan pirimidin dimer, sehingga akan memengaruhi replikasi DNA (Irfan et al. 2011).

Isolat kapang kernel C dan nut A merupakan koleksi BPPT yang diisolasi dari limbah kelapa sawit, Malingping, Lebak, Banten, Jawa Barat, Indonesia. Isolat tersebut telah diuji aktivitas lipase dan berpotensi menghasilkan lipase. Isolat kapang kernel C dan nut A mampu tumbuh pada suhu ruang (28-30°C) dan pH 6-9.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan aktivitas lipase kapang kernel C dan nut A dengan mutasi secara acak menggunakan radiasi sinar gama dan sinar ultraviolet (UV). Diharapkan lipase yang dihasilkan bisa dipakai untuk biokatalis pembuatan biodiesel. Isolat kapang yang potensial dalam menghasilkan lipase diidentifikasi secara analisis pendekatan fenotipik dan molekuler filogenetik (28S rRNA).

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme: isolat kapang dari limbah kelapa sawit *kernel C* (KC) dan *nut A* (NA) koleksi Laboratorium Pusat Teknologi Bioindustri, LAPTIAB, BPPT, PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan.

Media yang digunakan adalah potato dextrose agar (PDA), tepung kedelai [Hasil Bumiku] diperoleh dari pasar tradisional Serpong. dan minyak zaitun. Bahan kimia yang digunakan adalah aquadest, NaCl, HCL, NaOH, polivinil alkohol (PVA), *phenolphthalein* (PP), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, metanol, ekstrak ragi, *Coomassie Brilliant Blue* 6.250, etanol, asam *ortho-phosphoric* 85% Bovine serum albumin (BSA) dan alkohol.

Persiapan mutans: kapang tumbuh pada PDA miring sampai sporulasi inkubasi 7 hari. Sebanyak 10 mL air suling steril ditambahkan dalam PDA miring sebagai suspensi spora. Suspensi spora dikerok dengan jarum inokulasi, dihomogenisasi dengan vortex dan diencerkan menjadi 10^{-7} (El-Batal et al. 2015; Prabakaran et al. 2009).

Mutagenesis sinar UV: sebanyak 1 mL suspensi spora (10^7 cfu/mL) diinokulasikan

pada cawan petri yang mengandung 15 mL PDA. Setiap kapang diiradiasi dengan sinar ultraviolet (254 nm). Rentang waktu radiasi adalah 0, 1, 2, 3 dan 4 jam. Mengikuti inkubasi pada 28°C selama 5 hari. Kapang ditanam dan dikultivasikan pada PDA miring (Prabakaran et al. 2009).

Mutagenesis sinar gama: sebanyak 1 mL suspensi spora (10^7 cfu/mL) diinokulasikan pada cawan petri yang mengandung 15 mL PDA dan diinkubasi pada 28°C selama 7 hari. Setiap isolat diiradiasi dengan sinar gama. Dosis radiasi menggunakan 0, 1, 2, 3 dan 4 kGy pada kecepatan 2,325 kGy/jam. Setelah radiasi, kapang diinkubasi pada 28°C selama 5 hari. Kapang ditanam di PDA miring (El-Batal et al. 2015).

Produksi lipase dilakukan pada kultur cair dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi 50 mL medium produksi (3% tepung kedelai dan 1% minyak zaitun), disesuaikan dengan pH 7 dan disterilisasi selama 15 menit pada 121°C. Media produksi diinokulasi dengan 10% (b/v) inokulum suspensi spora 10^7 cfu/mL. Proses fermentasi diinkubasi pada rotary shaker pada 200 rpm, suhu kamar (28-30°C), 7 hari (Kotogan et al. 2014; El-Batal et al. 2015).

Uji aktivitas lipase dilakukan dengan menimbang 1,5 g *poliviny alcohol* (PVA) dalam 250 mL Erlenmeyer, ditambahkan 25 mL minyak zaitun dan 75 mL air suling dan diaduk, campuran larutan tersebut sebagai substrat. Substrat 5 mL ditambahkan 4 ml 0,05 M dapar fosfat, pH 6 dan 1mL enzim kasar, diinkubasi pada 50°C selama 20 menit dalam inkubator shaker agitasi 150 rpm. Setelah inkubasi, campuran ditambahkan 5 mL metanol untuk menghentikan reaksi. Indikator *phenolphthalein* (PP) dari 2 tetes ditambahkan ke larutan dan dititrasi dengan 0,05 M NaOH. Titrasi dihentikan ketika warna larutan menjadi merah muda dan tidak hilang, volume titrasi dicatat. Larutan kosong disiapkan dengan cara yang sama seperti sampel, metanol ditambahkan sebelum inkubasi untuk menghentikan aktivitas enzim (Lindfield et al. 1984). Aktivitas lipase dihitung menggunakan rumus:

Aktivitas unit lipase (U/mL) =

$$\frac{V2 - V1 \cdot n \text{ NaOH} \cdot 1000}{t \text{ (menit)}}$$

Keterangan:

- V1 = volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi blanko (mL)
- V2 = volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi sampel (mL)
- n = konsentrasi NaOH (N)
- t = waktu inkubasi (menit)

Kandungan protein ditentukan dengan uji Bradford. Sampel dibuat dengan menambahkan 2 mL reagen Bradford ke 40 µL enzim kasar, divortex dan diinkubasi selama 20 menit di ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm (Bradford 1976).

Penentuan berat kering biomassa dengan metode Simon (Inggrid dan Suharto 2012). Miselium dicuci dengan air suling sebanyak tiga kali pada kertas saring (Whatman No. 1), oven pada 70°C selama 24 jam.

Identifikasi isolat kapang: analisis isolat kapang berdasarkan pendekatan fenotipik. Observasi karakter fenotipik dilakukan dengan pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik meliputi warna koloni dan diameter koloni, sedangkan pengamatan mikroskopik meliputi konidia, konidiofor dan struktur lainnya dengan menggunakan mikroskop (Watanabe 2010).

Analisis isolat kapang berdasarkan pendekatan molekuler filogenetika dengan daerah gen 28SrRNA. Kapang ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama empat hari, digunakan sebagai sumber DNA. DNA diekstraksi dengan menggunakan *Phytopure™ DNA Extraction Kit* (GE Healthcare, UK) sesuai dengan standar protokol. Amplifikasi daerah gen 28S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') dan NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG.-3') (Kurtzman dan Robnett 1997). Semua amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dalam 50 µL total reaksi campuran, mengandung ±100 nanogram *template* DNA, 10 mM setiap primer, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *long buffer* dan MgCl₂ 1×, dNTPmix 0,2 mM dan *Taq polymerase* 1,5 U. Kondisi reaksi diatur sebagai berikut: denaturasi awal pada 98°C selama 2 menit, diikuti dengan 30 siklus denaturasi 98°C selama 20 detik,

penempelan pada suhu 52°C selama 20 detik, dan *extension* pada 72°C selama 2 menit. Tahap akhir *elongation* diatur pada suhu 72°C selama 4 menit. Produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) diproses dalam 1% gel agarosa dengan elektroforesis pada 100V selama 30 menit, difisualisasikan pita DNA diatas UV illuminator dan didokumentasi dengan *gel documentation system*. Produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) disekuensi dengan menggunakan *ABI 3130 Genetic Analyzer*.

Urutan nukleotida diperoleh dari primer NL1 dan NL4, dianalisa dengan Chromas Pro 1.41 (Technelysium Pty Ltd., Australia). Selanjutnya dilakukan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) terhadap sekuen nukleotida tersebut dengan DNA database (NCBI). Sekuen-sekuen yang homolog diunduh untuk dilakukan *Multiple Sequence Alignment* dengan menggunakan *Multiple Sequence Alignment* (MUSCLE) pada *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 7 (Kumar et al. 2016). Analisis filogenetik dilakukan menggunakan metode *Maximum Likelihood* (ML) dengan menggunakan MEGA versi 7. Kekuatan cabang internal pohon filogenetik diuji dengan analisis *Boot-Strap* (BS) (Felsenstein 1985) menggunakan 1000 replikasi. Nilai BS 50% atau lebih tinggi ditampilkan. Hasil pohon dari analisis ML diperbaiki dengan menggunakan *Tree-Graph* versi 2 (Stover dan Muler 2010).

Disain Rancangan Acak Kelompok (RAK) digunakan untuk menentukan pengaruh radiasi sinar gama dan ultraviolet terhadap aktivitas lipase dengan tiga ulangan sebagai kelompok. Hasil ditampilkan sebagai Mean±S.E. Software analisis statistik SPSS versi 22 digunakan untuk semua proses data. Signifikansi perbedaan diantara rata-rata kelompok kontrol dan kelompok perlakuan optimasi ditentukan dengan ANOVA (analisis varians) satu jalan dengan uji *Post Hoc*. Nilai P kurang dari 0,05 dianggap secara statistik signifikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil mutasi dengan radiasi sinar gama menunjukkan bahwa 100% tingkat kematian spora terdapat pada kedua isolat kapang kernel C dan nut A pada dosis 3 kGy dan 4 kGy yang dikarakterisasi dengan ada atau tidaknya pertumbuhan pada medium PDA miring dalam waktu 7 hari (Gambar 1 dan Gambar 2). Namun dengan sinar ultraviolet (UV) tidak mencapai kematian 100%. *A. fumigatus* dan *P. crysogenum* dapat bertahan setelah paparan sinar UV selama 15 menit (Prabakaran et al. 2009) sementara *Penicillium* sp. akan mati 100% setelah paparan radiasi UV selama 6 menit (Syafriana et al. 2014). Ini mungkin dipengaruhi oleh jenis kapang yang digunakan. Pada Tabel 1 dapat bahwa



Gambar 1. Tingkat kematian pada isolat kapang kernel C setelah dipaparkan radiasi gama: (A) kontrol, (B) 1kGy, (C) 2 kGy, (3) 3 kGy, (4) 4 kGy



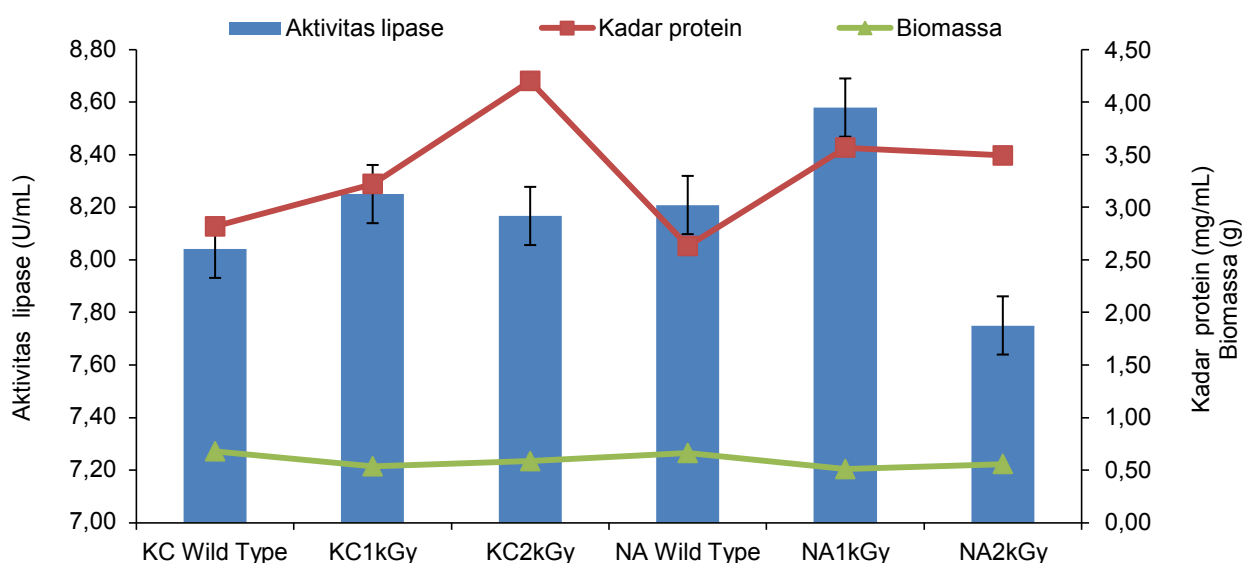
Gambar 2. Tingkat kematian pada isolat kapang nut A setelah dipaparkan radiasi gama: (A) kontrol, (B) 1kGy, (C) 2 kGy, (3) 3 kGy, (4) 4 kGy

Tabel 1. Tingkat kematian spora pada isolat kapang kernel C and nut A setelah dipaparkan radiasi ultraviolet

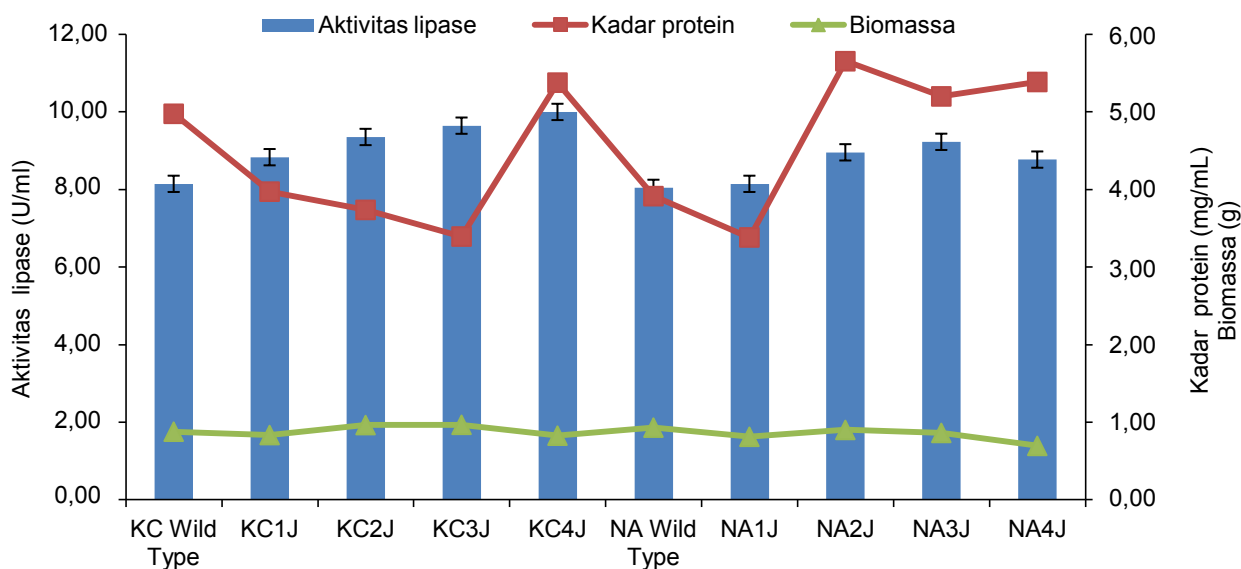
No	Kode	10 ⁷ × cfu/mL	Tingkat kematian (%)
1	Kontrol	76,00	00,00
	KC1J	57,50	24,34
	KC2J	45,00	40,79
	KC3J	57,50	24,34
	KC4J	44,50	41,45
2	Kontrol	72,50	00,00
	NA1J	64,50	11,03
	NA2J	58,50	19,31
	NA3J	60,00	17,24
	NA4J	44,50	38,62

tingkat kematian spora tertinggi hanya 41,45% setelah terpapar radiasi sinar UV selama 4 jam. Hal ini menunjukkan bahwa sinar gamma lebih efektif dalam menentukan tingkat kematian dibandingkan dengan sinar UV.

Semua mutan yang dihasilkan dari radiasi gamma dan ultraviolet (UV) secara acak diuji untuk kemampuan lipolitik mereka dengan menggunakan media agar tributyrin (de Queiroz Baptista et al. 2015). Hasil zona bening menunjukkan bahwa jamur dapat menghidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak (Andualema dan Gessesse 2012). Zona bening yang terbentuk semua mutan itu kecil. Nilai rata-rata dari *Enzymatic*



Gambar 3. Produksi lipase pada variasi dosis radiasi dengan sinar gamma



Gambar 4. Produksi lipase pada variasi dosis radiasi dengan sinar ultraviolet

Index (IE) adalah 0,01 cm. Mutan yang memiliki IE tertinggi dari setiap perlakuan akan diuji aktivitas lipasenya.

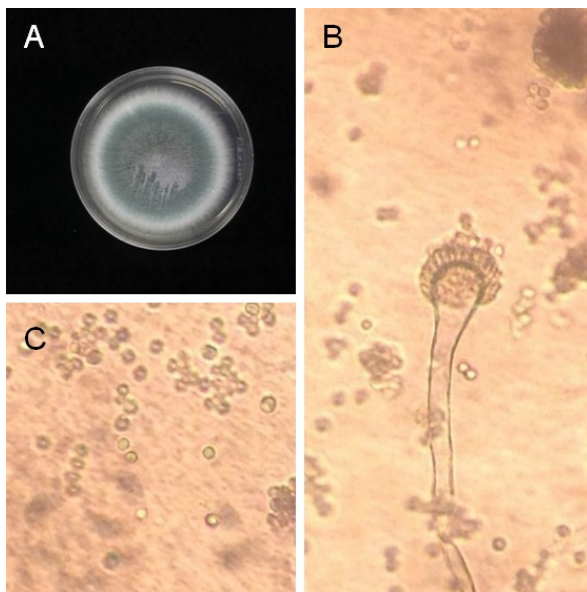
Mutan dari radiasi gama dan sinar UV diuji aktivitas lipase menggunakan metode titrasi (Lindfield et al. 1984). Dosis radiasi gama terbaik diperoleh dengan dosis 1 kGy di kedua isolat kapang. Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa mutan kernel C (KC1kGy) memiliki aktivitas lipase tertinggi 8,25 U/mL dan mutan nut A (NA1kGy) adalah 8,58 U/mL, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas lipase dan kandungan

protein mutan dibandingkan dengan *wild type* meningkat.

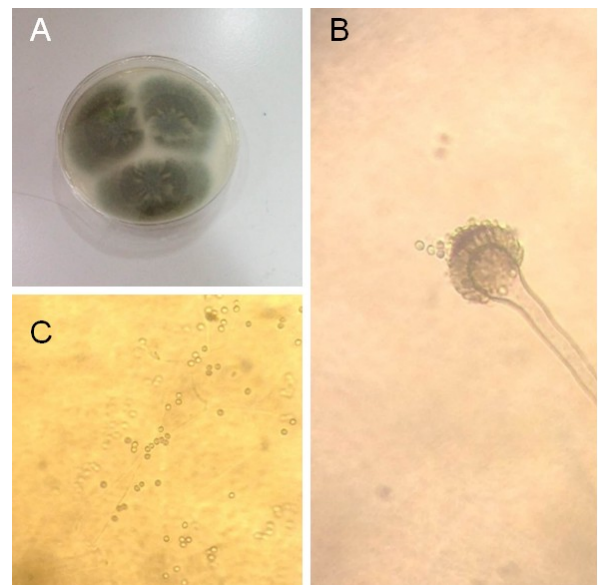
Namun tidak untuk biomassa, biomassa kering mutan kernel C menurun dibandingkan dengan *wild type* yaitu dari 0,68 g menjadi 0,54 g, begitu juga biomassa kering mutan nut A menurun dibandingkan *wild type* yaitu dari 0,66 g menjadi 0,51 g.

Paparan sinar gama ke sel akan menyebabkan perubahan senyawa kimia dalam mikroorganisme dan akan menyebabkan perubahan metabolik dan fisiologis.

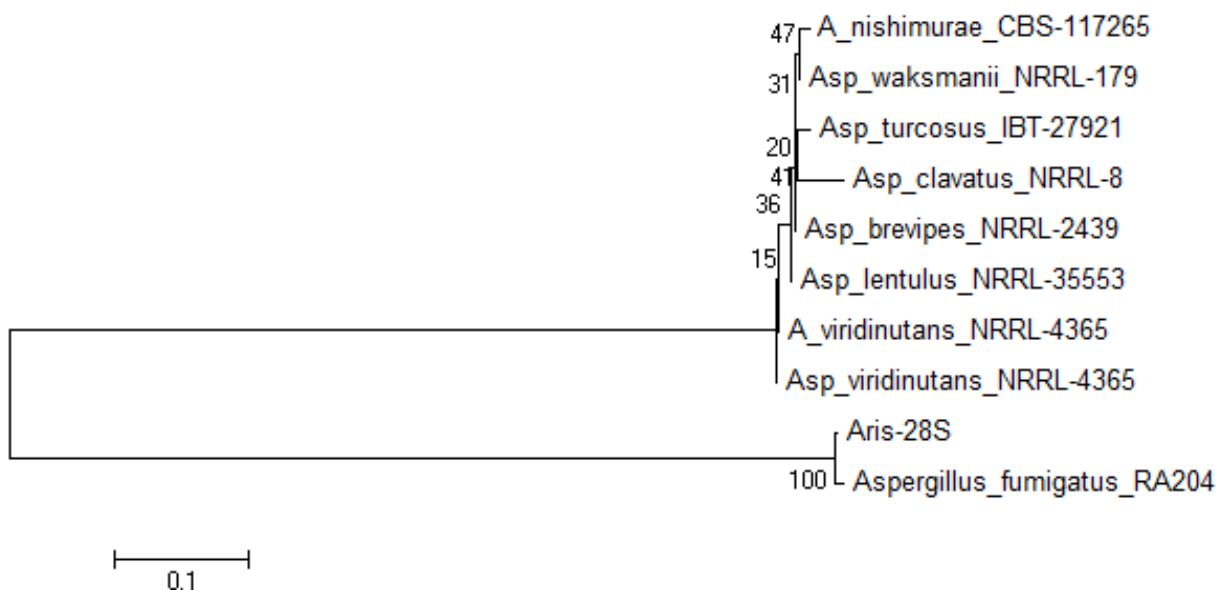
Kandungan biomassa dan protein



Gambar 5. Hasil pengamatan morfologi isolat kapang kernel C (400×): makroskopik (A), mikroskopik (B), dan konidia (C)



Gambar 6. Hasil pengamatan morfologi isolat kapang nut A (400×): makroskopik (A), mikroskopik (B), dan konidia (C)



Gambar 7. Posisi isolat kapang kernel C (Aris 28S) ditunjukkan pada pohon filogenetika berdasarkan urutan gen 28S rRNA dengan menggunakan *Maximum Likelihood* (ML). Posisi substitusi per nukleotida ditunjukkan

kering yang dihasilkan oleh mutan yang dihasilkan oleh mutan berfluktuasi seperti dapat dilihat pada Gambar 4. Paparan radiasi ultraviolet (UV) dapat menyebabkan dimer pirimidin, mampu merusak heliks ganda dalam DNA dan menghambat replikasi lebih lanjut (Irfan et al. 2011). Perubahan DNA menyebabkan kematian atau sel yang dimodifikasi secara genetik. Modifikasi genetik akan menyebabkan mikroorganisme menjadi lebih adaptif terhadap lingkungan (Prabakaran et al. 2009). Agrawal et al. (2013) melaporkan bahwa radiasi ultraviolet adalah salah satu mutagen potensial dan efektif untuk meningkatkan enzim komersial seperti lipase.

Analisis pendekatan fenotipik menunjukkan bahwa koloni isolat kapang kernel C dan nut A pada medium *potato dextrose agar* mencapai diameter 7 cm dan 4,67 cm dalam waktu 7 hari, berwarna hijau tua dengan tepi berwarna putih. Kepala konidia memiliki ciri khusus yaitu berbentuk kolumnar. Konidiofor pendek, berdinding halus dan pada bagian atas berwarna hijau. Vesikula berbentuk gada yang lebar dan fialid terbentuk langsung dari vesikula dan berwarna hijau. Bentuk konidia adalah bulat hingga semi bulat dan berwarna hijau. Berdasarkan karakter tersebut isolat kapang kernel C dan nut A masuk dalam genus *Aspergillus* spp. Seperti dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6.

A. turcosus strain IBT 27911 dan *A. lentulus* strain NRRL 35553. Hasil BLAST menunjukkan isolat kapang kernel C (Aris-28S) mempunyai similitas tertinggi dengan galur *A. fumigatus* strain RA204. Pohon filogenetik dengan metode *Maximum Likelihood* (ML) ditunjukkan pada Gambar 7. Isolat kapang kernel C (Aris-28S) pada pohon filogenetik termasuk ke dalam genus *Aspergillus*. *A. fumigatus* strain RA204 memiliki galur terdekat dengan isolat kapang kernel C (Aris-28S). Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan gen 28S rRNA. Berdasarkan hasil analisis BLAST pada sekuen gen 28S rRNA isolat menunjukkan similitas 100% dengan spesies *A. fumigatus* strain RA204, *A. nishimurae* strain CBS 117265. Pohon filogenetik *Maximum Likelihood* disusun berdasarkan perubahan DNA seiring waktu (Reece et al. 2014). Perubahan karakter

rata-rata yang terjadi pada cabang ditunjukkan pada nilai yang terdapat pada pohon filogenetik *Maximum Likelihood*, sehingga isolat kapang kernel C (Aris-28S) mempunyai nenek moyang terdekat dengan *A. fumigatus* strain RA204.

KESIMPULAN

Mutagenesis dengan radiasi sinar gama dan sinar UV mempengaruhi aktivitas lipase kapang kernel C dan nut A dari limbah kelapa sawit. Radiasi gama mempengaruhi aktivitas lipase, NA1kGy mutan (8,58 U/mL) dan KC1 kGy (8,25 U/mL) masing-masing meningkatkan aktivitas lipase sebesar 4,6% dan 3,13% dari *wild type*. Dengan sinar UV mempengaruhi aktivitas lipase, mutan KC4J (10,00 U/mL) dan NA3J (9,25 U/mL) masing-masing meningkatkan aktivitas lipase sebesar 25% dan 15,63% dari *wild type*. Analisis pendekatan fenotipik dan molekuler filogenetik (28S rRNA), isolat kapang kernel C (KC) memiliki similitas 100% dengan spesies *A. fumigatus* strain RA204.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal R, Satlewal A, Verma AK (2013) Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. 3 Biotech 3:381-388. doi: 10.1007/s13205-012-0095-z
- Andualema B, Gessesse A (2012) Microbial lipases and their industrial applications: Review. Biotechnology 11:100-118. doi: 10.3923/biotech.2012.100.118
- Awan MS, Tabbasam N, Ayub N, Babar ME, Mehboob-ur-Rahman, Mahboob S, Rajoka MI (2011) Gamma radiation induced mutagenesis in *Aspergillus niger* to enhance its microbial fermentation activity for industrial enzyme production. Mol Biol Rep 38:1367-1374. doi: 10.1007/s11033-010-0239-3
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254
- Crabbe E, Nolasco-Hipolito C, Kobayashi G, Sonomoto K, Ishizaki A (2001) Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel

- properties. *Process Biochem* 37:65-71
- de Queiroz Baptista NM, Solidonio EG, de Arruda FVF, de Melo EJV, Filho JRNC, de Azevedo Callou MJ, de Miranda RdCM, Calaco W, de Gusmao NB (2015) Effect of gamma radiation on enzymatic production of lignolytic complex by filamentous fungi. *Afr J Biotechnol* 14(7): 612-621. doi: 10.5897/AJB2014.14283
- El-Batal AI, Ayman FA, Elsayed MA, Soltan AM, El-Khawaga AM (2015) Enhancement of lipase biosynthesis by *Aspergillus niger* using gamma radiation. *Egyptian J Med Microbiol* 24:87-94
- El-Batal AI, Osman EM, Shaima AM (2013) Optimization and characterization of polygalacturonase enzyme produced by gamma irradiated *Penicillium citrinum*. *J Chem Pharm Res* 5:336-347
- Felsenstein J (1985) Phylogenies and comparative method. *Am Nat* 125:1-15
- Gopinath SC, Anbu P, Lakhmipriya T, Hilda A (2013) Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *Biomed Res Int* 2013:154549. doi: 10.1155/2013/154549
- Hoe PCK, Rahim KA, Saud HM (2016) A review on microbial mutagenesis through gamma irradiation for agriculture applications. *J Sains Nuklear Malaysia* 28:20-29
- Iftikhar T, Niaz M, Abbas SQ, Zia MA, Ashraf I, Lee KJ, Ikram-Ui-Haq (2010) Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase by *Rhizopus oligosporus* var. *microsporus*. *Pak J Bot* 42:1235-1249
- Inggrid M, Suharto Ign (2012) Fermentasi glukosa oleh *Aspergillus niger* menjadi asam glukonat. Perjanjian No: III/LPPM/2012-02/22-P. Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Katolik Parahayangan
- Irfan M, Javed J, Syed Q (2011) UV mutagenesis of *Aspergillus niger* for enzyme production in submerged fermentation. *Pak J Biochem Mol Biol* 44:137-140
- Kotogan A, Nemeth B, Vagvolgyi C, Papp T, Tako M (2014) Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in *Mucoromycotina* strains. *Food Technol Biotechnol* 52:73-82
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 35:1216-1223
- Linfield WM, O'Brien DJ, Serota S, Barauskas RA (1984) Lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. *JAOCS* 61:1067-1071. doi: 10.1007/BF02636222
- Prabakaran M, Thennarasu V, Mangala RA, Bharathidasan R, Chandrakala N, Mohan N (2009) Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian J Sci Technol* 2:46-49. doi: 10.17485/ijst/2009/v2i11/29536
- Prasad MP and Manjunath K (2012) Effect of media and process parameters in the enhancement of extracellular lipase production by bacterial isolates from industrial effluents. *Int J Microbiol Res* 8:308-311
- Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (2014) *Campbell Biology* 10th Edition. Pearson, San Fransisco
- Stover BC, Muller KF (2010) TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 11:7. doi: 10.1186/1471-2105-11-7
- Syafriana V, Nuswantara S, Mangunwardoyo W, Lisdiyanti P (2014) Enhancement of β -glucosidase activity in *Penicillium* sp. by random mutation with ultra violet and ethyl methyl sulfonate. *Annales Bogoriensis* 18:27-33
- Treichel H, Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* 3:182-196. doi: 10.1007/s11947-009-0202-2
- Watanabe S (2010) *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. Third Edition. CRC Press, London