

Identifikasi Molekuler dan Uji Potensi Khamir Laut sebagai Penghasil Enzim Ekstraseluler

Wa Ode Rima Alam Sari Bolu¹, Wilis Ari Setyati^{2*}, Sri Sedjati³

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia
*Corresponding author, e-mail: wilisarsetyati@yahoo.co.id

ABSTRAK: Khamir merupakan jamur bersel tunggal yang memiliki fase reproduksi aseksual berupa pembelahan sel serta reproduksi seksual yang tidak membentuk badan buah. Penelitian mengenai keanekaragaman khamir pada lingkungan terestrial telah dieksplorasi dengan baik, namun penelitian mengenai khamir laut tergolong relatif sedikit. Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi khamir laut secara molekuler dan menentukan potensi khamir laut sebagai penghasil enzim ekstraseluler. Metode dalam penelitian ini yaitu peremajaan isolat, uji aktivitas enzim, karakterisasi morfologi khamir secara makroskopis meliputi bentuk koloni, margin, elevasi, appearance, tekstur, dan warnanya, serta karakterisasi mikroskopis meliputi bentuk koloni dan kenampakan pertunasan sel. Identifikasi molekuler dilakukan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan tahapan ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, pengecekan kualitas DNA, analisis sekuens DNA dan pembuatan pohon filogenetik. Berdasarkan identifikasi molekuler menggunakan primer universal (ITS1 dan ITS4) dengan nilai percent similarity sebesar 99.05%, isolat PB3.2 teridentifikasi sebagai spesies *Candida tropicalis*. Isolat ini tidak menunjukkan adanya kemampuan dalam memproduksi enzim amilase dan enzim protease.

Kata kunci: Enzim Ekstraseluler; Khamir Laut; *Polymerase Chain Reaction*

Molecular Identification and Assessment of Marine Yeasts as Producers of Extracellular Enzymes

ABSTRACT: *Yeast is a unicellular fungus with a phase of asexual reproduction through cell division and lacks the formation of fruiting bodies during sexual reproduction. Research on yeast diversity in terrestrial environments has been well-explored; however, research on marine yeast is relatively limited. This study aims to molecularly identify marine yeast and determine their potential as producers of extracellular enzymes. The methods employed in this study include strain isolation, enzyme activity assays, macroscopic morphological characterization of yeast, encompassing colony shape, margin, elevation, appearance, texture, and color, as well as microscopic characterization, involving colony shape and budding patterns. Molecular identification was performed through the stages of DNA extraction, DNA amplification, DNA quality assessment, DNA sequence analysis, and the construction of a phylogenetic tree. Based on molecular identification using universal primers (ITS1 and ITS4) with a percent similarity value of 99.05%, isolate PB3.2 was identified as *Candida tropicalis* species. This isolate did not exhibit the ability to produce amylase and protease enzymes.*

Keywords: *Extracellular Enzymes; Marine Yeasts; Polymerase Chain Reaction*

PENDAHULUAN

Enzim merupakan molekul spesifik yang memiliki peran sebagai biokatalisator dalam reaksi kimia di dalam sel hidup yang umumnya berkaitan dengan proses metabolisme sel (Prihatini dan Dewi, 2021). Berdasarkan fungsinya, enzim terdiri dari dua jenis, yaitu enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler (Remijawa *et al.*, 2020). Enzim intraseluler merupakan enzim yang disintesis dan digunakan di dalam sel, sedangkan enzim ekstraseluler merupakan enzim yang disintesis di dalam

sel kemudian disekresikan ke lingkungan untuk menghidrolisis komponen kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana (Dewi, 2020). Dalam bidang industri, enzim umumnya digunakan untuk menyederhanakan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana pada pembuatan suatu produk. Namun, pengaplikasian enzim pada bidang industri membutuhkan biaya yang cukup tinggi (DiCosimo *et al.*, 2013). Perkembangan ilmu pengetahuan menawarkan penggunaan mikroorganisme sebagai sumber alternatif penghasil enzim.

Jamur merupakan organisme eukariotik yang memiliki spora sebagai sistem reproduksinya. Berdasarkan klasifikasinya, jamur terbagi menjadi tiga kelompok, yaitu mushroom, kapang, dan khamir. Khamir merupakan jamur bersel tunggal yang memiliki fase reproduksi aseksual berupa pembelahan sel serta reproduksi seksual yang tidak membentuk badan buah (Boekhout *et al.*, 2022). Persebaran khamir tergolong luas karena khamir mampu hidup pada berbagai lingkungan, termasuk pada wilayah bersalinitas. Khamir laut merupakan khamir yang diisolasi dari lingkungan laut dan mampu tumbuh lebih baik pada media bersalinitas (Chi *et al.*, 2010). Bernhard Fischer merupakan ilmuwan pertama yang mengisolasi khamir laut pada tahun 1894 dari perairan Samudera Atlantik (Kutty dan Philip, 2008). Mikroorganisme laut termasuk khamir laut hidup pada lingkungan yang ekstrem. Hal tersebut memberikan potensi yang unik bagi khamir untuk mensintesis senyawa fungsional maupun enzim yang digunakan sel khamir sebagai pertahanan sel maupun agen katalisator pada proses metabolisme (Connell *et al.*, 2008). Khamir laut dilaporkan memiliki potensi untuk memproduksi enzim ekstraseluler seperti enzim protease, selulase, amilase, dan lipase (Chi *et al.*, 2009). Khamir asosiasi rumput laut spesies *Hortaea weneckii* diketahui memiliki kemampuan memproduksi enzim ekstraseluler seperti alginat-lyase, agarase, dan karagenase (Sibero *et al.*, 2022). Khamir dapat hidup berasosiasi dengan organisme lain selama kebutuhan hidupnya terpenuhi.

Penemuan mengenai keanekaragaman hayati khamir pada lingkungan terestrial telah dieksplorasi dengan baik, namun penelitian mengenai khamir laut tergolong relatif sedikit (Kutty dan Philip, 2008). Berdasarkan hal tersebut, melihat potensi khamir laut yang telah dikonfirmasi pada penelitian terdahulu menjadikan perlu dilakukannya eksplorasi lebih lanjut mengenai potensi khamir laut. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi secara molekuler khamir laut asal Perairan Pasir Baru, Balikpapan, yang menjadi koleksi *Sibero Project, Laboratory of Natural Product*, Universitas Diponegoro, dan menentukan potensi khamir laut sebagai penghasil enzim ekstraseluler.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Natural Product, Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang, pada bulan Desember 2022-Januari 2023. Pengolahan data dari hasil penelitian dilaksanakan pada Februari-Maret 2023.

Peremajaan Isolat

Stok khamir dengan kode isolat PB3.2 yang tersimpan pada gliserol dilakukan peremajaan dengan menginokulasi khamir pada cawan petri berisi media *Potato Dextrose Agar* (PDA) kemudian dilakukan inkubasi selama 7x24jam (Putri *et al.*, 2019).

Uji Aktivitas Enzim

Uji aktivitas enzim dilakukan untuk melihat potensi khamir dalam memproduksi enzim protease dan amilase. Media uji aktivitas enzim amilase mengandung 2% agar, 0.1% yeast extract, dan 0.5% peptone, dan 0.2% pati atau starch (Ayuningtyas *et al.*, 2021). Media uji aktivitas enzim protease dilakukan menggunakan media skim-milk agar dengan penambahan 2% agar dan 10% skim milk powder (Fadhli *et al.*, 2019). Isolat khamir ditumbuhkan pada setiap media uji dan dilakukan inkubasi selama 7x24jam. Media uji aktivitas enzim amilase dibuat dengan menambahkan 0,2% amilum dalam media PDA. Penentuan aktivitas enzim amilase dilakukan dengan menggunakan larutan

lugol. Kenampakan zona bening di sekitar koloni mengindikasikan adanya aktivitas enzim. Penentuan aktivitas enzim protease diindikasikan dengan adanya zona bening di sekitar koloni.

Identifikasi Makroskopik dan Mikroskopik

Identifikasi makroskopik khamir dilakukan dengan mengamati bentuk, margin, elevasi, ukuran, dan warna koloni khamir yang tumbuh pada media PDA (Van der Walt dan Yarrow, 1984). Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk sel dan tipe pertunasan khamir di bawah mikroskop dengan bantuan pewarna *lactophenol cotton blue* (Kurtzman *et al.*, 2011).

Ekstraksi DNA

Metode yang digunakan dalam ekstraksi DNA adalah metode Chelex. Isolat khamir diinokulasi ke dalam microtube steril yang berisi 1 mL saponin dan 100 μL ddH_2O , kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 24jam. Sampel yang telah diinkubasi kemudian dicuci dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan kemudian 1 mL PBS steril ditambahkan ke dalam microtube steril dan sampel disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan kemudian 100 μL ddH_2O dan 50 μL larutan Chelex 20% ditambahkan ke dalam microtube dan dihomogenkan menggunakan mikropipet. Sampel dipanaskan menggunakan heating blok pada suhu 80°C selama 10 menit. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan pada microtube steril (Sibero *et al.*, 2017).

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan secara *in vitro* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') sebagai primer *forward* dan ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') sebagai primer *reverse*. Campuran PCR mengandung 12.5 μL GoTaq Green Master Mix Promega, 1 μL primer ITS1, 1 μL primer ITS4, 9.5 μL ddH_2O , dan 1 μL DNA template dengan total volume adalah 25 μL . Pengaturan kondisi PCR mengacu pada Sibero *et al.* (2016) dengan denaturasi awal 95°C selama 3 menit, kemudian diikuti dengan 30 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, annealing pada suhu 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian diikuti oleh ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.

Pengecekan Kualitas Produk PCR

Pemeriksaan produk hasil PCR dilakukan menggunakan elektroforesis dengan cara memasukkan 2.5 μL produk PCR ke dalam sumur gel agarose 1% yang dibuat dengan mencampurkan 1 gram agarose ke dalam 100 mL TBE 1X kemudian ditambahkan larutan *Ethidium Bromida* (EtBr) sebanyak 5 μL . DNA *ladder* dimasukkan pada sumur pertama gel agarose sebagai penanda. Gel dielektroforesis dengan tegangan sebesar 100 V dan 400 mA selama 30 menit. Pita hasil PCR dapat dilihat dengan menggunakan alat gel documentation (Hidayati *et al.*, 2016). Sampel dengan band DNA kemudian dikirim ke PT. Genetika Science, Jakarta, Indonesia.

Analisis Sekuens dan Pembuatan Pohon Filogenetik

Analisis hasil sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA X kemudian hasilnya dicocokkan dengan database pada GeneBank yang dapat diakses melalui tautan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) melalui opsi pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui spesies khamir yang diperoleh ((Sibero *et al.*, 2018).

Analisis pohon filogenetik dilakukan menggunakan *software* MEGA X dengan mensejajarkan sekuens isolat dengan sekuens pembanding. Konstruksi pohon filogenetik dibentuk berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan menggunakan metode *Neighbor Joining Tree* dengan nilai bootstrap 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan menginokulasi isolat pada dua jenis media berbeda. Pengujian aktivitas enzim pada penelitian ini bersifat kualitatif. Isolat PB3.2 diinokulasi pada media skim-milk agar dan media pengujian enzim amilase kemudian diinkubasi selama 7x24jam untuk dilakukan uji aktivitas enzim protease dan enzim amilase. Indikator keberhasilan pada pengujian aktivitas enzim protease ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni isolat. Indikator yang digunakan pada pengujian aktivitas enzim amilase adalah larutan lugol. Keberhasilan pada pengujian ini ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni isolat. Zona bening yang dihasilkan pada pengujian aktivitas enzim menandakan bahwa isolat khamir mampu mendegradasi substrat media (Hengkengbala *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil pengujian, isolat PB3.2 tidak mampu memproduksi enzim protease dan enzim amilase (Tabel 1). Ketidakmampuan isolat dalam memproduksi enzim protease dapat terjadi karena beberapa hal seperti isolat yang tidak memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim, isolat memproduksi enzim namun tidak disekresikan ke lingkungan, dan isolat memproduksi enzim dan disekresikan ke lingkungan, namun proses deteksi aktivitas enzim terhambat oleh media.

Identifikasi molekuler pada isolat PB3.2 dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, pengecekan kualitas DNA, sekuensing DNA, dan analisis pohon filogenetik. Proses ekstraksi DNA pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode Chelex karena metode ini memiliki proses yang cepat dengan tahapan yang sederhana sehingga dapat meminimalisir resiko terjadinya kontaminasi pada proses ekstraksi (Jayanti dan Mushlih, 2021). Amplifikasi DNA dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu tahap denaturasi, *annealing*, dan ekstensi. *Annealing* merupakan tahapan penting pada proses PCR dikarenakan pada tahapan ini, terjadi proses penempelan primer pada DNA yang sudah terbuka. Suhu optimal pada proses *annealing* dibutuhkan agar proses penempelan primer pada sampel DNA dapat terjadi. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel pada sisi lain DNA, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan gagalnya proses amplifikasi dikarenakan tidak terjadinya proses penempelan (Rahmadhan *et al.*, 2019).

Hasil identifikasi berdasarkan persamaan *BLAST homology*, diperoleh kesamaan isolat PB3.2 dengan *Candida tropicalis* (NR_111250_1) sebesar 99.05% dengan *query cover* 100% (Tabel 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat PB3.2 memiliki kesamaan basa yang sangat mirip dengan spesies *Candida tropicalis* sehingga dapat dikatakan bahwa isolat PB3.2 adalah spesies *Candida tropicalis*. Adapun ciri makroskopik dan mikroskopik isolat PB3.2 adalah bentuk koloni *circular*, *margin entire*, elevasi *raised*, kenampakan *dull* dengan tekstur *butyrous*, warna koloni isolat krem dengan adanya sedikit pseudohifa. Bentuk sel *ellipsoidal* dan membentuk budding (Tabel 2). Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi dan Akhdiya (2020) yang mengkonfirmasi bahwa genus *Candida* memiliki bentuk sel bervariasi dari bulat, oval, silindris, hingga memanjang dengan atau tanpa pseudohifa. Reproduksi aseksual dari genus *Candida* adalah dengan membentuk pertunasan atau budding. Genus ini juga tidak memiliki pigmen karotenoid sehingga berwarna putih hingga krem. Hal tersebut sesuai dengan hasil uji aktivitas enzim yang tidak menunjukkan adanya kemampuan dari isolat PB3.2 untuk memproduksi enzim amilase dan protease. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Devi *et al.* (2019) yang menunjukkan bahwa spesies *Candida tropicalis* tidak mampu memproduksi enzim amilase dan protease, sedangkan spesies *Candida fermentati* mampu memproduksi enzim protease. Hal tersebut dapat terjadi karena aktivitas enzim turut dipengaruhi oleh jenis spesies dan kondisi lingkungan seperti suhu, pH, dan salinitas (Shahat, 2017).

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease dan Amilase Khamir Laut

Kode Isolat	Enzim protease	Enzim Amilase
PB3.2	–	–

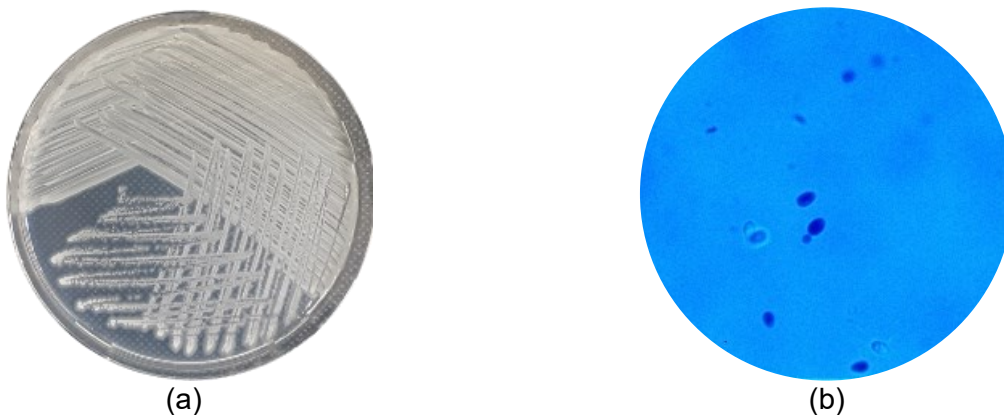
Keterangan: + : terdapat aktivitas enzim; : tidak terdapat aktivitas enzim

Tabel 2. Hasil Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik

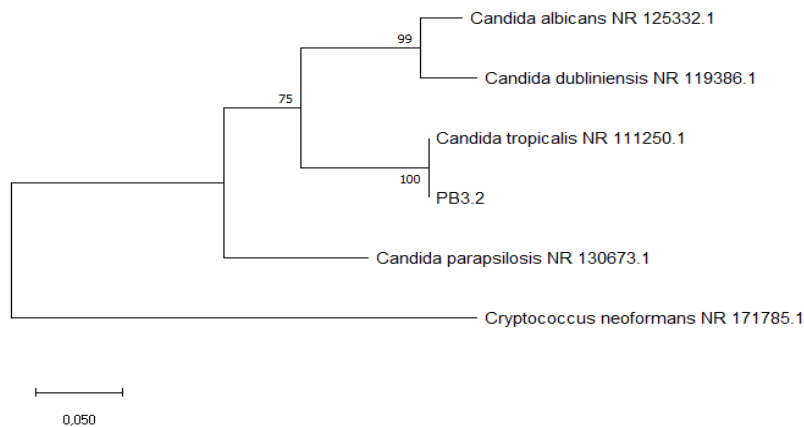
Kode Isolat	Karakteristik Makroskopis						Karakteristik Mikroskopis	
	Bentuk	Margin	Elevasi	Appearance	Tekstur	Warna	Bentuk Sel	Budding
PB3.2	Circular	Entire	Raised	Dull	Butyrous	Krem	Ellipsoidal	Ya

Tabel 3. Hasil Identifikasi Isolat melalui DNA

Kode Isolat	Closest Similarity*	Percent identification	Query Cover	Accession
PB3.2	<i>Candida tropicalis</i>	99.05%	100%	NR_111250_1



Gambar 1. Isolat Khamir PB3.2 (a) kenampakan makroskopik isolat, (b) kenampakan mikroskopik isolat



Gambar 2. Rekonstruksi Pohon Filogenetik Isolat Khamir Laut

Rekonstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode *neighbor joining*. Penggunaan metode *neighbor joining* dilakukan karena proses kalkulasinya yang cepat dan mudah. Analisis menggunakan metode *neighbor joining* dilakukan dengan analisis *bootstrap* 1000 kali ulangan untuk memprediksi tingkat *resampled* dalam membentuk cabang maupun ranting pohon filogenetik yang baik. Konstruksi pohon filogenetik merupakan hal yang penting untuk menentukan jarak evolusi pada spesies tertentu. Analisis filogenetik dapat dilihat melalui *gap* yang terbentuk setelah tahapan *multiple alignment* yang menunjukkan adanya mutasi genetik dalam sekuens (Su'udi, 2018). Jarak genetik pada pohon filogenetik menunjukkan nilai 0,050 yang artinya terdapat perbedaan 5 basa dalam setiap 100 basa pada setiap sekuensnya dan menghasilkan nilai sebesar 90% yang berarti sekuens isolat ini berbeda nyata dengan *outgroup* karena memiliki urutan pasangan basa yang berbeda jauh (Larasati *et al.*, 2021). Spesies *outgroup* yang digunakan pada konstruksi pohon filogenetik penelitian ini adalah *Cryptococcus neoformans* (NR 171785.1) yang didasari pada perbedaan taksonomi yang dimiliki *C. neoformans* dengan isolat yang diperoleh. Rekonstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.

KESIMPULAN

Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat PB3.2 memiliki kesamaan *BLAST homology* dengan spesies *Candida tropicalis* (NR_111250_1) sebesar 99.05% dengan *query cover* 100%. Khamir laut yang teridentifikasi sebagai spesies *Candida tropicalis* ini tidak memiliki potensi untuk memproduksi enzim protease dan enzim amilase.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro atas izin yang diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Kami juga mengucapkan terima kasih atas dukungan finansial yang diberikan oleh Dr. Mada Triandala Sibero, S.Pi., M.Si., dalam mendukung penelitian ini. Terima kasih juga kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam pembuatan dan penulisan artikel ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayuningtyas, E.P., Sibero, M.T., Hutapea, N.E.B., Frederick, E.H., Murwani, R., Zilda, D.S., Wijayanti, D.P., Sabdono, A., Pringgenies, D., & Radjasa, O.K. 2021. Screening of Extracellular Enzyme from Phaeophyceae-Associated Fungi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 750(1): 1-14. DOI: 10.1088/1755-1315/750/1/012005
- Boekhout, T., Amend, A.S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan, C.S., Turchetti, B., Vu, D., Wang, Q.M., & Yurkov, A. 2022. Trends in yeast diversity discovery, Fungal Diversity. *Fungal Diversity*, 114(1): 491-537. DOI: 10.1007/s13225-021-00494-6
- Chi, Z.M., Liu, G., Zhao, S., Li, J., & Peng, Y. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied microbiology and biotechnology*, 86: 1227–1241. DOI: 10.1007/s00253-010-2483-9
- Chi, Z., Zhe, C., Zhang, T., Liu, G., Li, J. & Wang, X. 2009. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances*, 27(3): 236–255. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.002
- Connell, L., Redman, R., Craig, S., Scorzetti, G., Iszard, M. & Rodriguez, R. 2008. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology*, 56: 448–459. DOI: 10.1007/s00248-008-9363-1
- Devi, S.A., Wulandary, D.A., Saputra, E., Muchlissin, S.I. & Setyati, W.A. 2019. Potential and Enzymatic Characterizations of Marine Yeast for Pufas from Balai Taman Nasional Karimunjawa. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 246(1): 1-5. DOI: 10.1088/1755-1315/246/1/012074
- Dewi, E.R.S. 2020. Bioremediasi: Mikroorganisme sebagai Fungsi Bioremediasi pada Perairan

Tercemar. Repository Upgris.

- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A.J. & Bohlmann, G. 2013. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15): 6437–6474. DOI: 10.1039/c3cs35506c
- Fadhli, H., Kusdiyantini, E., & Nurhayati. 2019. Karakterisasi morfologi , biokimia , dan uji enzimatis isolat khamir buah apel (*Malus domestica* Borkh .) yang berpotensi menghasilkan bioetanol morphological , biochemical and enzymatic characterization of yeast isolates from apple. *Biologi Tropika*, 2(2): 62–73.
- Hengkengbala, S.I., Lintang, R.A., Sumilat, D.A., Mangindaan, R.E., Ginting, E.L. & Tumembouw, S. 2021. Karakteristik Morfologi Dan Aktivitas Enzim Protease Bakteri Simbion Nudibranch. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 9(3): 83-94. DOI: 10.35800/jplt.9.3.2021.36672
- Hidayati, H., Saleh, E., & Aulawi, T. 2016. Identifikasi Keragaman Gen Bmpr-1b (Bone Morphogenetic Protein Receptor Ib) Pada Ayam Arab, Ayam Kampung Dan Ayam Ras Petelur Menggunakan Pcr-Rflp. *Jurnal Peternakan*, 13(1): 1-11. DOI: 10.24014/jupet.v13i1.2383
- Jayanti, L.D., & Mushlih, M. 2021. Comparison of the Quality of DNA Template Isolation Results of the Resin Method with and Without Centrifugation. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15: 1–9. DOI: 10.21070/ijins.v15i.551
- Kurtzman, C., Fell, J.W., & Boekhout, T. 2011. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier.
- Kutty, S.N., & Philip, R. 2008. Marine Yeasts A Review. *Yeast*, 25(7): 465–483. DOI: 10.1002/yea.1599
- Larasati, S.J.H., Sabdono, A., & Sibero, M.T. 2021. Identifikasi Molekuler Kapang Asosiasi Spons menggunakan Metode DNA Barcoding. *Journal of Marine Research*, 10(1): 48–54. DOI: 10.14710/jmr.v10i1.28334
- Pratiwi, E., & Akhdiya, A. 2020. Keragaman Karakter Morfologi dan Biokimia Isolat Khamir Rizosfer dan Endofit Tanaman Padi. *Buletin Plasma Nutfah*, 26(1): 39-50. DOI: 10.21082/blpn.v26n1.2020.p39-50
- Prihatini, I., & R.K. Dewi. 2021. Kandungan Enzim Papain pada Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap Metabolisme Tubuh. *Jurnal Tadris IPA Indonesia*, 1(3): 449–458. DOI: 10.21154/jtii.v1i3.312
- Putri, D.R., Asri, M.T., & Ratnasari, E. 2019. Aktivitas Antifungi Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Fusarium oxysporum*. *LenteraBio*, 8(2): 156–161. DOI: 10.30602/jlk.v2i1.325
- Rahmadhan, D., Sari, R., & Apridamayanti, P. 2019. Pengaruh suhu annealing terhadap amplifikasi gen tem menggunakan primer dengan %GC rendah. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran Untan*, 4(1): 1–7.
- Remijawa, E.S., Rupidara, A.D., Ngginak, J., & Radjasa, O.K. 2020. Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim ekstraseluler pada tanah mangrove di pantai noelbaki. *Jurnal Enggano*, 5(2): 164–180. DOI: 10.31186/jenggano.5.2.164-180
- Shahat, A.S. 2017. Production of Extracellular Hydrolytic Enzymes by Yeast Extracts on Some Commercial Media. *Annals of Biological Research*, 8(3): 12–20.
- Sibero, M.T., Frederick, E.H., Sabdono, A., Wijayanti, D.P., Pringgenies, D., Radjasa, O.K., Zilda, D.S., & Murwani, R. 2022. First report of seaweed-associated yeast from Indonesia: Species composition and screening of their polysaccharides-degrading enzymes. *Biodiversitas*, 23(3): 1408–1419. DOI: 10.13057/biodiv/d230327
- Sibero, M.T., Sabdaningsih, A., Cristianawati, O., Nuryadi, H., Radjasa, O.K., Sabdono, A., & Trianto, A. 2017. Isolation, identification and screening antibacterial activity from marine sponge-associated fungi against multidrug-resistant (MDR) *Escherichia coli*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 55(1): p. 012028 DOI: 10.1088/1755-1315/55/1/012028
- Sibero, M.T., Tarman, K., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Trianto, A., & Bachtiarini, T.U. 2018. Produksi Pigmen dan Identifikasi Kapang Penghasilnya Menggunakan Pendekatan DNA Barcoding. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1): 9–108. DOI: 10.17844/jphpi.v21i1.21454
- Sibero, M.T., Triningsih, D.W., Radjasa, O.K., Sabdono, A., & Trianto, A. 2016. Evaluation of antimicrobial activity and identification of yellow pigmented marine sponge-associated fungi from Teluk Awur, Jepara, Central Java. *Journal of Biotechnology*, 21: 1–11. DOI: 10.22146/ijbiotech.26058

- Su'udi, M. 2018. Studi in silico potensi DNA barcode pada anggrek langka Paphiopedilum. *Biosfer: Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi*, 3(1): 20–26.
- van der Walt, J.P., dan D. Yarrow. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts, *The Yeasts*, . Elsevier Science Publishers B.V. DOI: 10.1016/B978-0-444-80421-1.50009-7