

THE EFFECT OF MEDIUM ON ENDOPHYTIC FUNGUS IP-2 GROWTH AND PRODUCTION OF ITS ACTIVE INHIBITOR HEME POLYMERIZATION METABOLITE

PENGARUH MEDIA PADA PERTUMBUHAN FUNGI ENDOFIT IP-2 DAN PRODUKSI METABOLIT AKTIF INHIBITOR POLIMERISASI HEM

Indah Purwantini¹, Wahyono¹, Mustofa², dan Ratna Asmah Susidarti¹

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara 55281, Yogyakarta, Indonesia

²Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara 55281, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Endophytic fungus IP-2 is the endophytic fungus isolated from the plant Artemisia annua L. This fungus is known to have activity as an inhibitor of heme polymerization. The aim of this study is to examine the suitable medium for the growth and production of the active metabolite and to determine the appropriate time for harvesting the active metabolite. Endophytic fungus was fermented in 4 types of media for 14 days. Sampling was taken every day to obtain the weight of the dry cells which were used for analysis of growth. The media obtained is used to determine their activities as heme polymerization inhibitor. Tests were carried out using the method developed by Bassilico et al (1998). Data of dry cell weight and the percentage inhibition of heme polymerization were analyzed in order to obtain the curve of growth and metabolite production. Both curves will be used to determine the proper time to harvest the active metabolite. The results showed that the PDB was the best medium for endophytic fungus IP-2 growth and was able to produce the active metabolite higher than most other media. In the PDB media, at day-7 showed that active metabolite produced at most so that proper harvest time metabolite is on the 7th day of fermentation.

Key words: endophytic fungi IP-2, fermentation media, heme polymerization inhibitors

ABSTRAK

Fungi endofit IP-2 adalah fungi endofit yang diisolasi dari tanaman Artemisia annua L. Fungi ini diketahui mempunyai aktivitas sebagai inhibitor polimerisasi hem. Dalam penelitian ini akan diteliti mengenai media yang sesuai untuk pertumbuhan maupun pembentukan metabolit aktifnya serta menentukan waktu yang sesuai untuk pemanenan metabolit aktifnya. Fungi endofit difermentasi dalam 4 jenis media selama 14 hari. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel yang akan digunakan untuk mengetahui bobot sel keringnya yang selanjutnya digunakan untuk analisis pertumbuhannya serta digunakan untuk uji aktivitas inhibitor polimerisasi. Uji dilakukan dengan menggunakan metoda yang dikembangkan oleh Bassilico dkk (1998). Data bobot sel kering dan prosentase penghambatan inhibitor polimerisasi dianalisis sehingga diperoleh kurva pertumbuhan dan kurva produksi metabolitnya yang akan digunakan untuk menentukan waktu yang tepat untuk memanen metabolit aktifnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam media PDB fungi endofit IP-2 menunjukkan pertumbuhan yang paling baik dan mampu menghasilkan metabolit aktif paling tinggi dibandingkan 3 media lainnya. Dalam media PDB, pada hari ke-7 terlihat jumlah metabolit aktif yang dihasilkan paling banyak sehingga waktu panen metabolit yang tepat adalah pada hari ke-7.

Kata kunci: fungi endofit IP-2, media fermentasi, inhibitor polimerisasi hem

PENDAHULUAN

Fungi IP-2 merupakan fungi endofit yang yang berhasil diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* L. yang telah mengalami pengkodean ulang

(sebelumnya adalah DP-2) dan diketahui mempunyai aktivitas sebagai inhibitor polimerisasi hem. (Purwantini dkk., 2012). Aktifitas inhibitor polimerisasi hem ini sangat berkaitan erat dengan aktivitas suatu senyawa sebagai anti malaria, dengan mekanisme aksinya pada vakuola makanan. Plasmodium mempunyai vakuola makanan yang bersifat asam sebagai tempat

Corresponding author: Indah Purwantini
E-mail: iinhs@yahoo.com

metabolisme hemoglobin. Dalam vakuola ini, hemoglobin terdegradasi menjadi hem yang kemudian akan berpolimer membentuk pigmen malaria (hemozoin) dan globin yang akan dipecah lagi menjadi asam-asam amino. Vakuola ini merupakan tempat aksi beberapa obat anti malaria yang sudah ada (Rosenthal, 2003).

Degradasi hemoglobin oleh enzim proteolitik juga menghasilkan produk samping yaitu hem bebas. Hem yang terikat oleh hemoglobin berada dalam bentuk ferro yang bersifat nontoksik, tetapi apabila dilepaskan dari hemoglobin maka ferro akan dioksidasi menjadi ferri membentuk ferriprotoporfirin IX (FPIX) yang sangat toksik bagi membran Plasmodium dan menghambat kerja enzim proteolitik dalam memetabolisme hemoglobin (Munghtin *et al.*, 1998).

Fungi IP-2 merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan bahan obat. Secara umum, biosintesis metabolit sekunder dalam mikroorganisme tersebut dikontrol oleh mekanisme regulasi seperti regulasi represi katabolit, inhibisi umpan balik, maupun represi umpan balik, untuk mencegah pembentukan metabolit yang berlebihan. Dengan adanya mekanisme regulasi tersebut menyebabkan eksplorasi mikroorganisme sebagai sumber penghasil senyawa obat menjadi terbatas karena jumlah metabolit yang dihasilkan melalui proses fermentasi sangat rendah (Miao *et al.*, 2006). Media fermentasi mempunyai peranan yang sangat penting pada pertumbuhan mikroorganisme maupun pada pembentukan metabolitnya. Seringkali kondisi yang baik untuk pertumbuhan sel sehingga mencapai pertumbuhan maksimum tidak sesuai bagi mikroorganisme untuk menghasilkan metabolit (Chisti dan Moo-Young, 1993). Media sebaiknya dapat dibuat dengan cara yang mudah dan tetap memberikan sumber nutrisi yang dibutuhkan untuk kehidupan maupun produksi metabolitnya (Harvey dan McNeil, 2008).

Menurut Llorens *et al.* (2004) jumlah metabolit yang diproduksi oleh mikroorganisme dapat ditingkatkan dengan optimasi kondisi fisik fermentasi (suhu, salinitas, pH, sinar) dan optimasi faktor kimia fermentasi (komponen media, prekursor, inhibitor). Dalam penelitian ini akan dibandingkan pengaruh beberapa media terhadap hasil yang diperoleh sehingga dapat diketahui media yang sesuai untuk pembentukan metabolit dan juga untuk mengetahui waktu panen yang tepat yaitu waktu di saat produk yang dihasilkan mencapai maksimal.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Gelas Erlenmeyer, pelubang gabus untuk membuat *plug*, *shaking incubator*, *LAF*, corong, corong pisah, *vacuum rotary evaporator* (HEIDOLPH VV200), neraca digital (Shimadzu BX 320D), *micro tube* (Eppendorf), mikropipet (Socorex), *microplate 96 wells* (IWAKI), sentrifugator (Eppendorf 54150), *microplate reader* (Bio-Rad). Kentang, glukosa (Brataco), akuadestilata, kapas, kain kasa, aluminium foil, etilasetat teknis (Brataco), hematin (Sigma), asam asetat glasial (Merck), DMSO (Merck), NaOH (Merck), klorokuin, akuadestilata

Jalannya penelitian

Fermentasi

Endofit IP-2 hasil purifikasi difermentasi dalam kultur cair dengan menggunakan 4 media yang berbeda, yaitu: Media PDB (*Potato Dextrose Broth*) dibuat dari infusa kentang sebanyak 200g/L dan 20g glukosa; Media SDB (*Saboraud Dextrose Broth*) dibuat dengan menimbang sebanyak 30g bahan kemudian dilarutkan dalam 1L aquadest; Media 3 dibuat dengan cara menimbang Sukrosa 3g, *malt extract* 3g, *bactopepton* 0,3g, *yeast extrat* 0,15g, KCl 0,075g, MgSO₄.7H₂O 0,15g, dan KH₂PO₄ sebanyak 0,15g, semua bahan ini dilarutkan dalam 1L aquadest; Media 4 dibuat dengan cara menimbang Glukosa 3g, *malt extract* 3g, *bactopepton* 0,3g, *yeast extract* 0,15g, KCl 0,075g, MgSO₄.7H₂O 0,15g, dan KH₂PO₄ sebanyak 0,15g, semua bahan ini dilarutkan dalam 1L aquadest.

Semua jenis media fermentasi ini kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C bertekanan 1,5 atm selama 20 menit. Fermentasi dilakukan dengan memasukkan 2 *plug* fungi endofit IP-2 ke dalam 150mL media, diinkubasi pada *shaking incubator* selama 14 hari dengan kecepatan yang sama yakni 200rpm pada suhu kamar. Selama 14 hari diambil sampel sebanyak 1 *flask* setiap harinya untuk dilakukan uji aktivitas inhibitor polimerisasi hem serta untuk mendapatkan kurva pertumbuhannya.

Uji aktivitas inhibitor polimerisasi hem (Basilico dkk., 1998)

Kurva baku hematin dibuat dengan cara membuat seri kadar hematin (125µM; 62,25µM; 31,12µM; 15,56µM dan 7,78µM) dalam NaOH 0,2M dan dibaca absorbansinya menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 405nm. Larutan uji dibuat dengan konsentrasi

2mg/mL kemudian diambil 50 μ L dan dimasukkan ke dalam *microtube*, selanjutnya ditambah dengan 100 μ L hematin 0,1M dan asam asetat glasial 50 μ L. Campuran diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, campuran disentrifuge dengan kecepatan 8000rpm selama 15 menit untuk memisahkan polimer hematin yang terbentuk dengan supernatan. Supernatan dibuang, sedangkan endapan dicuci menggunakan 200 μ L DMSO sampai jernih. Endapan yang diperoleh dilarutkan menggunakan NaOH 0,1M dan sebanyak 100 μ L larutan tersebut dipindahkan ke *microplate 96 wells* dan dibaca absorbansinya menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 405nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Media yang digunakan dalam penelitian ini ada 4 jenis media. Keempat media tersebut mempunyai komposisi yang berbeda dan bervariasi. Menurut Tong *et al* (2011) biosintesis dari metabolit sekunder sangat dipengaruhi oleh komposisi media. Produksi metabolit sekunder dari mikroorganisme target dapat diamati dengan kultur menggunakan media yang berbeda. Sumber karbon dari media 1, 2, dan 3 sama-sama berasal dari glukosa, selain itu media 1 juga memiliki sumber karbon kompleks yang berasal dari umbi kentang. Berbeda dengan ketiga media tersebut, sumber karbon media 4 berasal dari sukrosa dan *malt extract*. Perbedaan lain dari keempat media tersebut adalah sumber nitrogen dan mineral dalam tiap media. Pada media 1 sumber nitrogen dan mineral berasal dari umbi kentang, media 2 berasal dari *bactopeptone*, sedangkan untuk media 3 dan 4 sumber nitrogennya berasal dari *yeast extract* dan *bactopeptone* dan sumber mineralnya berasal dari penambahan KCl, MgSO₄.7 H₂O dan KH₂PO₄. Adanya perbedaan komposisi media dan adanya variasi dari komponen nutrisi media fermentasi yang terkandung dalam keempat media, diharapkan akan diperoleh gambaran tentang potensi suatu media dalam mempengaruhi pertumbuhan fungi endofit IP-2 serta pengaruhnya dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Hasil penimbangan bobot sel kering tertera pada tabel I.

Dari gambar 1, dalam media 1 tidak terlihat adanya fase lag, yang mungkin disebabkan lamanya fase lag yang sangat singkat sehingga tidak bisa terlihat dengan pengambilan sampel tiap 24 jam. Media 1 mengandung sumber karbon sederhana yaitu glukosa yang segera digunakan sebagai nutrisi oleh mikroorganisme. Mikroorganisme terlihat masuk fase logaritmik, fase pertumbuhan yang sangat cepat, pada hari

pertama fermentasi. Pada fermentasi hari ke-3 dan 4, terlihat kurva yang agak landai, dimungkinkan ini adalah fase lag ke-2. Pada fase ini mikroorganisme mensintesis enzim-enzim yang dibutuhkan untuk memecah sumber karbon lain yaitu amilum yang terdapat dalam umbi kentang menjadi karbohidrat sederhana yang lebih mudah untuk dimetabolisme oleh mikroorganisme. Setelah itu pertumbuhan mikroorganisme akan meningkat cepat lagi, kembali mengalami fase logaritmik. Gambaran seperti ini yang sering disebut sebagai kurva bifasik atau pertumbuhan diauksi. Setelah fermentasi hari ke-5, terlihat pertumbuhan mulai melambat dan kemudian memasuki fase stasioner sampai hari ke-12. Jika dibandingkan dengan pertumbuhan fungi endofit IP-2 dalam media lainnya, fase stasioner yang terjadi pada media 1 ini paling lama sehingga hal ini sangat menguntungkan bagi produksi metabolitnya. Setelah hari ke-12, mikroorganisme sudah mengalami kematian karena nutrisi yang tersedia sudah habis.

Media 2 mengandung glukosa sebagai sumber karbon sederhana dan *bactopeptone* yang merupakan sumber nitrogen organik yang diperoleh dari hasil digesti protein-protein hewani. Dalam media 2 ini, terlihat bahwa fungi endofit IP-2 memasuki fase logaritmik setelah fermentasi hari ke-1 sama dengan dalam media 1. Akan tetapi dalam media ini tidak terlihat adanya fase lag ke-2, karena dalam media ini hanya ada 1 sumber karbon sederhana yaitu glukosa sehingga tidak mengalami pertumbuhan diauksi. Fase logaritmik yang terjadi lebih lama dibandingkan dengan media 1 dan fase stasioner lebih singkat. Dalam media 2, fase stasioner terjadi setelah fermentasi hari ke-8 dan setelah hari ke-12 sudah mengalami kematian.

Dalam media 3, kultur fungi endofit juga mengalami hal yang sama seperti dalam media 1 dan 2, yaitu pertumbuhan logaritmik yang terjadi cepat, karena sama-sama mengandung glukosa sebagai sumber karbon utama. Fase stasioner yang terjadi lebih cepat dibandingkan dalam media 2 akan tetapi lebih lambat jika dibandingkan dalam media 1. Lamanya fase stasioner yang terjadi lebih singkat dari media 1 dan sama dengan media 2. Dari gambar 1 terlihat bahwa jumlah sel maksimum yang bisa dicapai oleh media 3 lebih rendah daripada oleh media 1 maupun 2.

Komposisi media 4 hampir mirip dengan media 3 hanya berbeda pada sumber karbonnya. Pada media 3 sumber karbon utama adalah gula sederhana glukosa sedangkan pada media 4 menggunakan sukrosa sebagai sumber karbonnya.

Tabel I. Bobot sel kering hasil fermentasi IP-2 dalam 4 jenis media yang berbeda

Hari ke-	Bobot sel kering (mg)			
	Media 1	Media 2	Media 3	Media 4
1	77,10±8,77	76,15±3,63	77,95±5,67	71,64±5,63
2	203,61±24,02	161,77±11,70	169,46±21,34	87,67±4,44
3	278,08±17,86	209,27±23,10	244,08±77,32	174,89±13,80
4	334,99±7,36	272,24±15,68	349,36±7,25	240,64±40,48
5	578,58±27,53	323,95±20,71	474,07±24,26	347,98±29,94
6	620,24±20,10	456,59±25,28	532,33±10,82	450,85±33,45
7	629,86±3,25	554,15±31,07	583,00±29,89	494,27±7,77
8	664,28±10,94	601,05±4,11	538,42±4,17	512,87±9,57
9	641,52±20,11	630,85±22,85	541,70±36,57	544,47±20,19
10	609,96±6,45	617,25±12,14	528,44±23,22	549,07±26,50
11	627,16±4,01	641,77±26,27	516,49±15,25	559,32±30,91
12	643,26±6,76	648,79±30,19	436,39±31,11	426,24±25,91
13	574,00±10,52	512,50±11,31	413,73±5,66	407,47±6,14
14	531,87±9,44	522,73±35,78	423,48±15,42	363,69±32,61

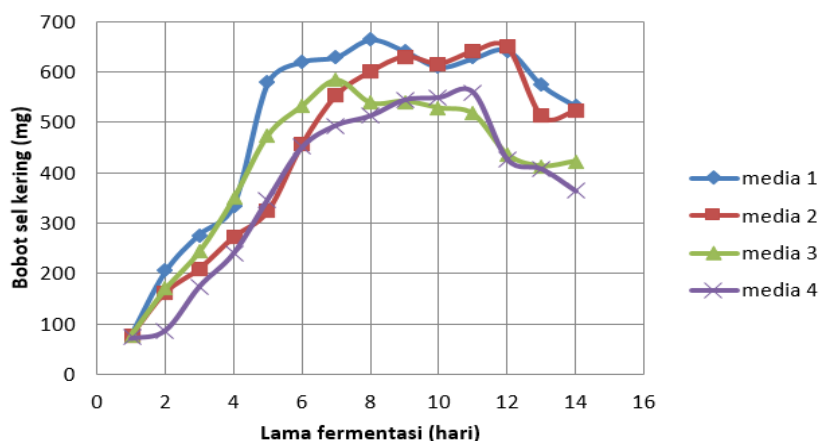
Tabel 2. Hasil pengukuran persen penghambatan sampel hasil fermentasi fungi endofit IP-2 dalam berbagai media

Hari ke-	Media 1	Media 2	Media 3	Media 4
1	-0,51±2,56	0,95±3,46	-0,29±2,72	-0,36±2,60
2	-0,68±2,35	14,02±2,18	-0,88±0,69	-0,45±0,16
3	5,08±2,33	25,11±1,57	-0,80±0,98	-1,01±0,71
4	7,62±2,65	29,59±0,51	-1,27±0,35	-0,35±1,94
5	20,61±4,23	13,81±0,76	-0,26±1,83	-0,33±1,52
6	36,58±2,33	13,10±0,49	-0,38±0,64	-1,44±0,57
7	52,73±1,88	6,59±2,94	-0,97±1,00	-0,82±1,15
8	49,85±1,09	2,83±0,26	-1,20±0,73	6,18±1,74
9	48,60±0,93	0,50±0,85	-0,76±1,82	11,83±1,63
10	42,50±2,73	-0,35±0,44	-0,68±0,32	8,47±0,47
11	38,99±5,72	-1,16±0,16	-0,12±1,35	5,57±1,64
12	34,11±4,43	0,40±1,64	-0,92±0,72	6,56±1,60
13	29,08±0,35	-1,15±0,29	-1,13±0,57	3,63±1,07
14	4,67±2,02	-0,35±0,56	-0,45±0,83	2,50±0,37

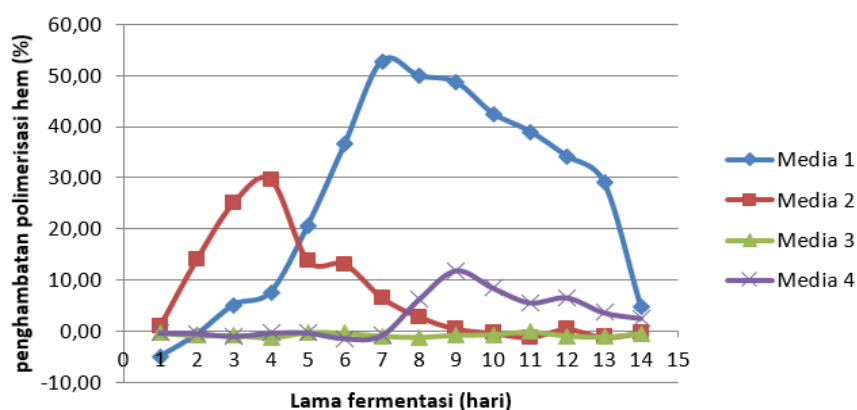
Komponen-komponen yang lain sama dengan media 3 baik jenis maupun jumlahnya. Sukrosa merupakan disakarida yang dapat dipecah menjadi gula sederhana glukosa dan fruktosa. Pada gambar 1 terlihat bahwa ada fase lag yang terjadi sampai hari fermentasi ke-2 yang disebabkan adanya waktu yang diperlukan untuk memecah sukrosa menjadi gula-gula sederhana yang dapat dimetabolisme oleh mikroorganisme.. Jumlah sel maksimum yang dapat dicapai tidak

berbeda jauh dengan pertumbuhannya dalam media 3.

Dari kurva pertumbuhan yang tertera pada gambar 1 belum dapat ditentukan media yang akan digunakan dalam penelitian selanjutnya. Media terpilih adalah media yang mampu menghasilkan metabolit aktif yang paling banyak. Jumlah sel yang banyak belum tentu menghasilkan metabolit yang banyak karena dalam pembentukan metabolit sekunder bersifat



Gambar 1. Profil pertumbuhan fungi IP-2 dalam 4 jenis media



Gambar 2. Profil produksi metabolit fungi endofit IP-2 dalam berbagai media fermentasi

non-growth dependent. Produksi metabolit sekunder yang merupakan senyawa yang dibentuk sebagai pertahanan diri akan meningkat jika dalam kondisi stress (Ramakhrisna dan Ravishankar, 2011). Oleh karena itu perlu dilakukan uji aktivitas inhibitor polimerisasi hem untuk mengevaluasi ke-4 media di atas.

Uji aktivitas inhibitor polimerisasi hem dilakukan terhadap sampel-sampel yang diperoleh di atas. Hasil uji aktivitas tersebut tertera pada tabel 2 dan gambar 2. Dari gambar 2 terlihat bahwa fungi endofit IP-2 jika difermentasi menggunakan media 1 mampu memberikan aktivitas yang paling baik dibandingkan jika difermentasi menggunakan media yang lain. Dalam media 2, metabolit dihasilkan lebih cepat, yaitu hari ke-4 sudah mencapai maksimum akan tetapi aktivitasnya lebih rendah daripada fermentasi menggunakan media 1. Dalam media 3, selama fermentasi 14 hari tidak menunjukkan adanya aktivitas inhibitor polimerisasi hem sehingga dapat dikatakan bahwa dengan media 3

fungi endofit IP-2 tidak dapat mensintesis metabolit yang aktif sebagai inhibitor polimerisasi hem. Faktor yang memungkinkan terjadinya hal tersebut adalah karena komposisi dari media 3 terdapat sumber karbon kompleks seperti sukrosa dan malt ekstrak sehingga lebih sulit dimetabolisme oleh mikroorganisme dan dapat mengakibatkan terhambatnya biosintesis senyawa aktif tersebut. Sukrosa termasuk karbohidrat kelompok disakarida yang dibentuk dari monomer-monomer yang berupa unit glukosa dan fruktosa (Gunawan dan Mulyani, 2004). Sterilisasi media yang mengandung malt ekstrak harus dikontrol dengan cermat untuk mencegah pemanasan yang berlebihan, karena dapat mengurangi unsur utama yaitu gula dan asam amino sehingga tidak terjadi reaksi *Maillard* saat dipanaskan pada pH rendah yang dapat menyebabkan hilangnya bahan yang akan digunakan untuk fermentasi dan beberapa produk tersebut dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Waites *et al.*, 2001). Media 3 memiliki

berbagai sumber yang dibutuhkan untuk pertumbuhan maupun untuk pembentukan metabolit sekunder, antara lain sumber karbon kompleks yaitu sukrosa dan malt ekstrak, sumber nitrogen yang berasal dari *yeast extract* dan *bactopeptone*, serta kandungan mineral. Hal ini mengakibatkan sel akan melalui transisi yang banyak selama pertumbuhan sehingga dimungkinkan produksi metabolit sekundernya dibutuhkan waktu yang lebih panjang. Medium yang kompleks di dalamnya tidak hanya terkandung sumber karbon *multiple*, namun juga terdapat zat-zat yang sangat bervariasi seperti asam amino, nukleotida, vitamin dan zat-zat intermediet lain, mengakibatkan sel akan melalui masa transisi yang banyak selama pertumbuhan (Judoamidjojo, 1992). Sukrosa dan malt ekstrak merupakan sumber karbon yang kompleks, maka suatu mikroba membutuhkan waktu yang lebih lama dalam memetabolisme keduanya yaitu dengan menguraikan karbon tersebut agar menjadi lebih sederhana, sehingga dalam waktu 14 hari metabolit sekunder belum mulai terbentuk. Dalam media 4, sumber karbon utamanya adalah glukosa yang lebih mudah dimetabolisme oleh mikroorganisme. Dari gambar 2 terlihat bahwa pada hari ke-8 sudah mulai terbentuk metabolit aktif dan mencapai maksimum pada hari ke-9, akan tetapi setelah itu aktivitasnya menurun. Oleh karena itu dari hasil tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa media yang terpilih untuk fermentasi selanjutnya adalah media 1 yaitu media PDB dan waktu panen adalah hari ke-7 fermentasi.

KESIMPULAN

Media yang paling sesuai untuk pertumbuhan dan pembentukan metabolit aktif inhibitor polimerisasi hem adalah media PDB. Pemanenan metabolit dilakukan pada hari ke-7 fermentasi karena pada waktu tersebut menunjukkan aktivitas yang paling tinggi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis haturkan kepada Fakultas Farmasi UGM yang telah memberikan dukungan finansial melalui Hibah Penelitian Madya tahun anggaran 2013/2014.

DAFTAR PUSTAKA

Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Olliaro, P., Taramelli, D., 1998, A Microtitrebased Method for Measuring the Haem Polymerization Inhibitory Activity (HPIA) of

Antimalarial Drugs. *J. Antimicro. Chemother.* 42: 55-60\

- Chisti Y, Moo-Young M., 1993, *Clean-in-place systems bioreactor :design, validation and operation*, ASME Bioeng, Div Publ Bed, 27:5-12
- Gunawan, D., dan Mulyani, S., 2004, *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid I*.Cetakan Pertama, Penebar Swadaya, Jakarta
- Judoamidjojo, M., Darwis, A.A., & Sa'id, E.G., 1992, *Teknologi Fermentasi*, 118, 79-82, 95-97, Rajawali Pers, Jakarta
- Llorens A, Matco R, Hinojo MJ, Logrieco A, Jimenez M., 2004, Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of Zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology.*, 27:253-260
- Miao Y,Lv., D,Wang, P Wang X-C, Chen J, Miao C, 2006, An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses, *Plant Cell*, 18:2749-66.
- Munghtin, M., Bray, P.G., Ridley, R.G.,Ward, S.A., 1998, Central Role of Hemoglobin Degradation in Mechanism of Action of 4-aminoquinolines, Quinoline Methanols, and Phenantene Methanols, *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 42(11):2973-2977
- Purwantini, I., Wahyono, Mustofa, dan Asmah R., 2010, Aktivitas Inhibitor Polimerisasi Hem Metabolit *Penicillium sp* Fungi Endofit yang Diisolasi dari *Artemisia annua* L, *Seminar Nasional Eight StarsPerformance Pharmacist*, Yogyakarta
- Ramakrishna A, Ravishankar GA., 2011, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signal Behaviour*, 6(11):1720-31
- Rosenthal, P.J., 2003, Review Antimalarial Drug Discovery : Old and New Approaches, *The Journal of Experimental Biology*, 206:3735-3744
- Tong, W.Y., Darah, I., Latiffah, Z., 2011, Antimicrobial Activities of Endophytic Fungal Isolates From Medicinal Herb *Orthosiphon stamineus* Benth, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(5), pp. 831-836
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., dan Higton, G., 2001, *Industrial Microbiology: An Introduction*, T.J. International Ltd, Padstow, Cornwall