

KADAR EMESTRIN *Emericella nidulans* YANG DIKULTIVASI PADA MEDIA DAN WAKTU YANG BERBEDA

Concentration of Emestrin from Emericella nidulans Cultivated in Different Medium and Cultivation Time

Muhammad Nursid^{1*}, Nurrahmi Dewi Fajarningsih¹, Endar Marraskuranto¹,
Sujuliyani², dan Ekowati Chasanah¹

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Balitbang KP, KKP. Jl. KS.Tubun Petamburan VI Jakarta 10260.

² Sekolah Tinggi Perikanan, Kampus STP Pasar Minggu Jakarta

* Korespondensi Penulis: muhammadnursid@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian untuk mengetahui pengaruh jenis media dan waktu kultivasi terhadap kadar senyawa emestrin dari kapang *Emericella nidulans* telah dilakukan. Kapang dikultivasi dalam 2 jenis media yaitu *malt extract broth* (MEB) dan *soluble starch-water-soytone* (SWS) dalam waktu 1, 2, 3, 4, dan 5 minggu. Kadar emestrin dianalisis dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah biomassa dan kadar emestrin tertinggi dihasilkan *E.nidulans* yang dikultivasi dalam media SWS selama 5 minggu.

KATA KUNCI: *Emericella nidulans*, emestrin, konsentrasi

ABSTRACT

Research to investigate the effects of medium and cultivation time of *Emericella nidulans* on the emestrin concentration yielded has been done. The fungal was cultivated in two different mediums ie. *malt extract broth* (MEB) and *soluble starch-water-soytone* (SWS) for 1, 2, 3, 4 and 5 weeks. The concentration of emestrin was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The highest biomass and concentration of emestrin was resulted from 5 weeks cultivation in SWS medium.

KEYWORDS: *Emericella nidulans*, emestrin, concentration

PENDAHULUAN

Kapang yang berasal dari lingkungan laut dikenal sebagai mikroba yang potensial sebagai sumber senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif dari kapang memiliki bioaktivitas yang beragam (Jang *et al.*, 2006, Kralj *et al.*, 2006). Antara tahun 2002-2006, lebih dari 330 senyawa baru (*novel compound*) berhasil ditemukan dari kapang laut (Kjer *et al.*, 2010). Beberapa metabolit dari kapang seperti fumagilin dan illudin S sedang dalam tahap uji klinis sebagai senyawa antitumor (Kralj *et al.*, 2006). Banyak ulasan yang sudah dipublikasikan menunjukkan pentingnya mikroorganisme laut sebagai sumber senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai penuntun penemuan senyawa-senyawa bioaktif baru (Bugni & Ireland, 2004).

Dalam penelitian terdahulu, telah dilakukan penapisan aktivitas sitotoksik terhadap isolat-isolat

kapang laut yang diisolasi dari beberapa wilayah perairan di Indonesia. Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa kapang *Emericella nidulans* yang diisolasi dari ascidia *Aplidium longithorax* yang diambil dari perairan Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara, mengandung senyawa sitotoksik yang potensial untuk dikembangkan lebih lanjut (Nursid *et al.*, 2011^a). Hasil analisis spektroskopis memperlihatkan bahwa senyawa sitotoksik tersebut merupakan senyawa makrosiklik yang bernama emestrin. Emestrin memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel T47D (sel kanker payudara), HepG2 (sel kanker hati) dan HeLa (sel kanker serviks) dengan nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 1,8; 4,2; dan 13,8 µg/ml (Nursid *et al.*, 2011^b).

Emestrin merupakan suatu senyawa yang termasuk dalam golongan *epithiodioxopiperazine* (ETP), dicirikan oleh adanya jembatan disulfida atau polisulfida yang memiliki 6 cincin.

Epithiodioxopiperazine menarik banyak perhatian karena memiliki bioaktivitas yang luas terutama sebagai antitumor, antimikrobal, antiviral, immunosupresif dan inhibitor aktivitas enzim (Jiang & Guo, 2011). Bioaktivitas senyawa yang tergolong dalam ETP termasuk emestrin disebabkan oleh adanya jembatan disulfida. Kehadiran jembatan disulfida merupakan hal yang sangat esensial, penghilangan atom S menyebabkan hilangnya aktivitas. Aktivitas sitotoksik diperkirakan terjadi melalui reaksi antara protein dengan gugus tiol yang akan menghasilkan spesies oksigen reaktif melalui siklus redoks (Gardiner *et al.*, 2005).

Berdasarkan hal tersebut, maka senyawa emestrin dari kapang *E. nidulans* memiliki potensi yang besar untuk dieksplorasi lebih lanjut khususnya yang berkaitan dengan faktor-faktor yang mempengaruhi produksi emestrin oleh kapang *E. nidulans* di antaranya jenis media dan waktu kultivasi kapang. Apabila rendemen emestrin dapat ditingkatkan, maka hal tersebut dapat mendorong riset pemanfaatan emestrin dalam bidang pengobatan, misalnya untuk keperluan uji pra klinis dan klinis yang membutuhkan senyawa dalam jumlah besar. Diperkirakan pertumbuhan kapang *E. nidulans* dan produksi emestrin dipengaruhi oleh komposisi media kultivasi sebagai sumber atom C, H, O, atau N. Selain itu waktu kultivasi yang berbeda juga kemungkinan mempengaruhi kadar senyawa emestrin yang dihasilkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis media dan waktu kultivasi terhadap kandungan senyawa emestrin pada kapang *E. nidulans*.

BAHAN DAN METODE

Media Kultivasi Kapang

Kapang *E. nidulans* dari penelitian terdahulu (Nursid *et al.*, 2011^a) dikultivasi pada 2 jenis media yaitu media *malt extract broth* (MEB), dan *soluble starch-water-soytone medium* (SWS). Komposisi media MEB terdiri dari 0,3% ekstrak malt, 0,3% ekstrak khamir, dan 0,5% pepton sedangkan media SWS mengandung 1% pati dapat larut, dan 0,2% pepton soya. Kedua media tersebut dilarutkan dalam air laut buatan dengan komposisi NaCl 70 g; KCl 3,0 g; Na₂SO₄ 1,1 g; MgCl₂ 20,4 g dan CaCl₂ 0,6 g. Media-media tersebut kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Penyegaran Kapang *E. nidulans*

Spora *E. nidulans* diambil dari *deep freezer* bersuhu -73 °C lalu didiamkan beberapa saat dalam suhu kamar

hingga media dan gliserol yang ada dalam tabung mencair. Spora selanjutnya dipindahkan secara aseptis ke dalam media *malt extract agar* (MEA) (mengandung 0,3% ekstrak malt, 0,3% ekstrak khamir, 0,5% pepton, dan 1,5% agar) dengan menggunakan jarum tanam. Cawan petri dibungkus dengan kertas parafilm kemudian diinkubasi selama 3–7 hari pada suhu 27–29 °C hingga biakan spora tumbuh dengan baik.

Kultivasi *E. nidulans*

Kapang *E. nidulans* yang tumbuh di dalam cawan petri selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung 5 ml media MEB dan SWS, biakan diinkubasikan selama 2 hari. Setiap biakan dalam tabung reaksi kemudian dipindah ke dalam labu erlenmeyer yang masing-masing mengandung 100 ml media MEB dan SWS. Kultivasi dilakukan selama 1, 2, 3, 4 dan 5 minggu pada suhu 27–29 °C dalam kondisi statis. Kultivasi dengan 3 jenis media tersebut dilakukan dengan 3 ulangan.

Pengukuran Biomassa

Biomassa *E. nidulans* yang dihasilkan dari setiap perlakuan dihitung berdasarkan berat kering miselium. Miselium yang diperoleh dipisahkan dengan *broth* melalui penyaringan lalu dikeringbekukan dengan *freeze dryer* (Labconco). Miselium yang sudah kering tersebut lalu ditimbang beratnya.

Ekstraksi Metabolit dan Pengukuran Rendemen (*yield*) Ekstrak Kasar

Metabolit yang dihasilkan oleh *E. nidulans* dalam waktu dan media yang berbeda diekstraksi dengan etil asetat pro analisis. Etil asetat yang terdapat dalam ekstrak lalu diuapkan dengan rotavapor vakum (Buchi). Pelarut yang masih tersisa selanjutnya dikeringkan dengan bantuan gas nitrogen. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang beratnya untuk mengetahui rendemennya.

Isolasi Emestrin dan Pembuatan Kurva Standar

Emestrin diisolasi dari kapang *E. nidulans* yang dikultivasi pada 1 L media SWS sebanyak 30 tabung selama 4 minggu dan suhu 27–29 °C dalam kondisi statis. Tahapan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi emestrin dilakukan menurut metode Nursid *et al.* (2011^b). Emestrin hasil isolasi dilihat kemurniannya dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan ¹H-NMR. Senyawa emestrin yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai standar untuk menentukan kadar emestrin pada ekstrak kasar yang dihasilkan oleh kapang *E. nidulans* dalam media dan waktu kultivasi yang berbeda. Pembuatan kurva

standar dilakukan dengan KCKT. Penentuan kadar emestrin dilakukan dengan menggunakan luas area di bawah puncak (*peak area*) berdasarkan garis regresi yang dibuat dengan serial konsentrasi 1,25; 2,5; 5; 10; 20; dan 40 ppm. Kondisi KCKT yang digunakan adalah sebagai berikut: instrumen LC Shimadzu, kolom Water Xselect CSH™ 2 x 100 mm, sistem elusi 15% asetonitril (dalam H₂O) → 100% asetonitril secara gradien (40 menit), 100% asetonitril (5 menit) dan kembali ke 15% asetonitril secara gradien (15 menit), laju air 0,2 ml/menit serta suhu oven 30°C. Pengukuran spektra ¹H-NMR, dilakukan dengan instrumen JEOL JNM ECA 500 MHz. Nilai geseran kimia (δ) dilakukan dalam satuan *part per million* (ppm) dengan menggunakan tetrametilsilana (TMS) sebagai standar. Pelarut yang digunakan adalah kloroform terdeuterasi (CDCl₃). Pengukuran NMR dilakukan di Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Puslit Kimia LIPI) Serpong, Banten.

HASIL DAN BAHASAN

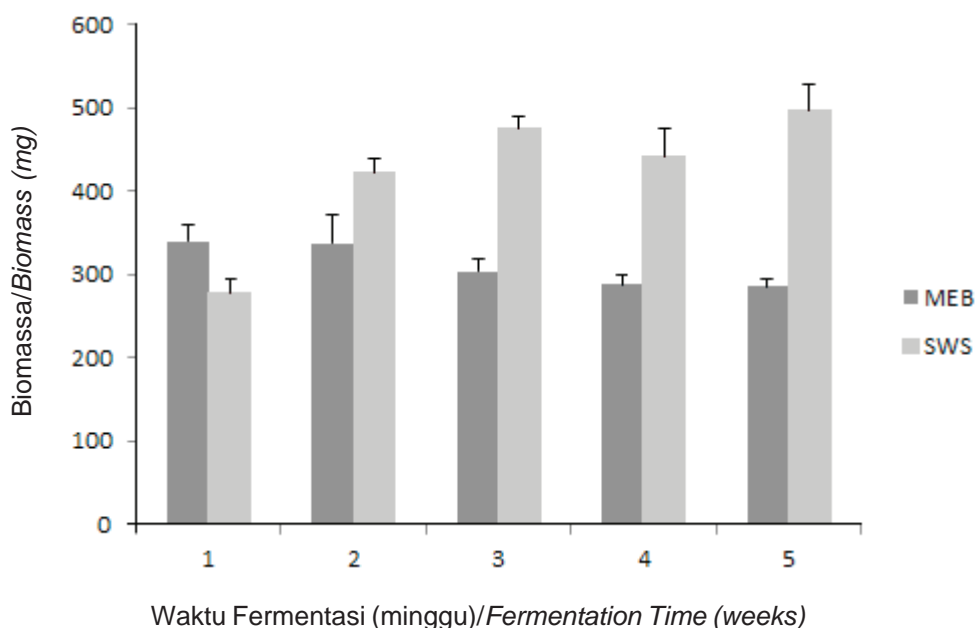
Berat Kering Miselium (biomassa)

Pengukuran berat kering miselium kapang laut *E. nidulans* bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan dan biomasa kapang laut *E. nidulans* selama proses kultivasi dari minggu ke-1 hingga minggu ke-5. Jumlah biomassa *E.nidulans* yang dikultivasi pada media SWS lebih tinggi daripada yang dikultivasi pada media MEB (Gambar 1). Biomassa paling tinggi dihasilkan pada minggu ke-5 dalam media SWS. Biomassa

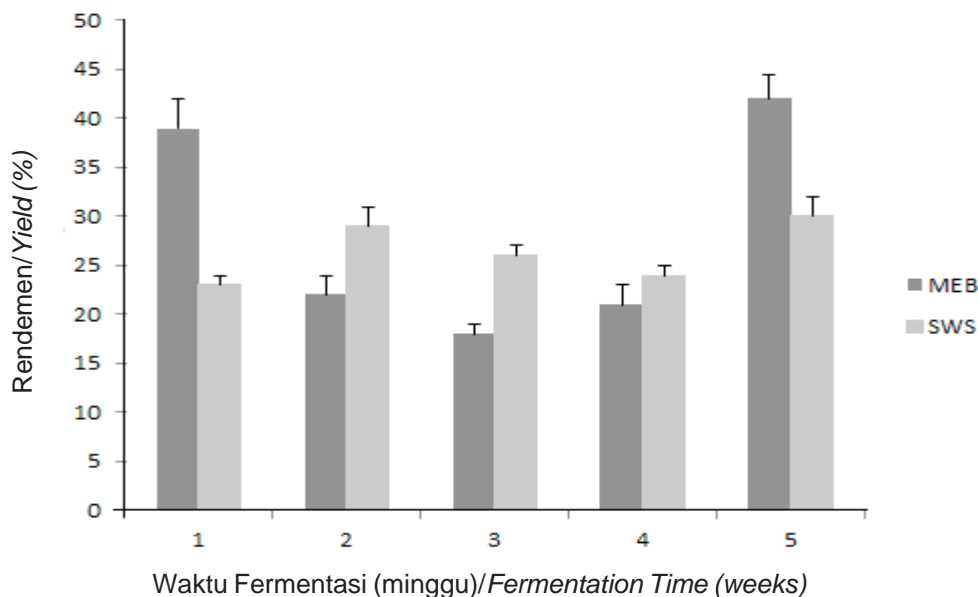
tertinggi yang dihasilkan dalam media MEB diperoleh pada minggu ke-1. Perbedaan biomassa yang dihasilkan dari kapang laut *E. nidulans* dalam media MEB dan SWS diduga terjadi karena adanya perbedaan komposisi nutrisi pada kedua medium tersebut. Medium SWS memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi dengan komposisi utama yaitu : 1% pati larut air (*soluble starch*) dan 0,2 % pepton soya. Pati terutama berperan sebagai sumber karbon, hidrogen dan oksigen sedangkan pepton sebagai sumber nitrogen. Menurut Dharmaputra *et al.* (1989), pada umumnya kapang dapat tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung karbohidrat tinggi.

Rendemen Metabolit Miselium Kapang Laut *E. nidulans*

Meskipun biomassa tertinggi dihasilkan oleh kapang yang dikultivasi pada media SWS, namun rendemen metabolit miselium tertinggi dihasilkan oleh kapang yang dikultivasi pada media MEB. Rendemen ekstrak miselium (ekstrak kasar) pada media MEB paling tinggi diperoleh pada minggu ke-4 (42%), pada medium SWS diperoleh pada minggu ke-5 (30%) (Gambar 2). Tingginya rendemen ekstrak kasar miselium pada media MEB kemungkinan berhubungan dengan sumber karbohidrat MEB yang berupa ekstrak malt, sedangkan sumber karbohidrat media SWS adalah pati yang merupakan polisakarida kompleks. Sumber karbohidrat pada media MEB adalah ekstrak malt yang merupakan disakarida yang lebih mudah digunakan sebagai sumber C dan H dibanding pati dapat larut (*soluble starch*) yang digunakan pada



Gambar 1. Biomassa kapang *E.nidulans* yang dikultivasi pada media yang berbeda.
 Figure 1. Biomass of *E.nidulans* fungal cultivated in different mediums.



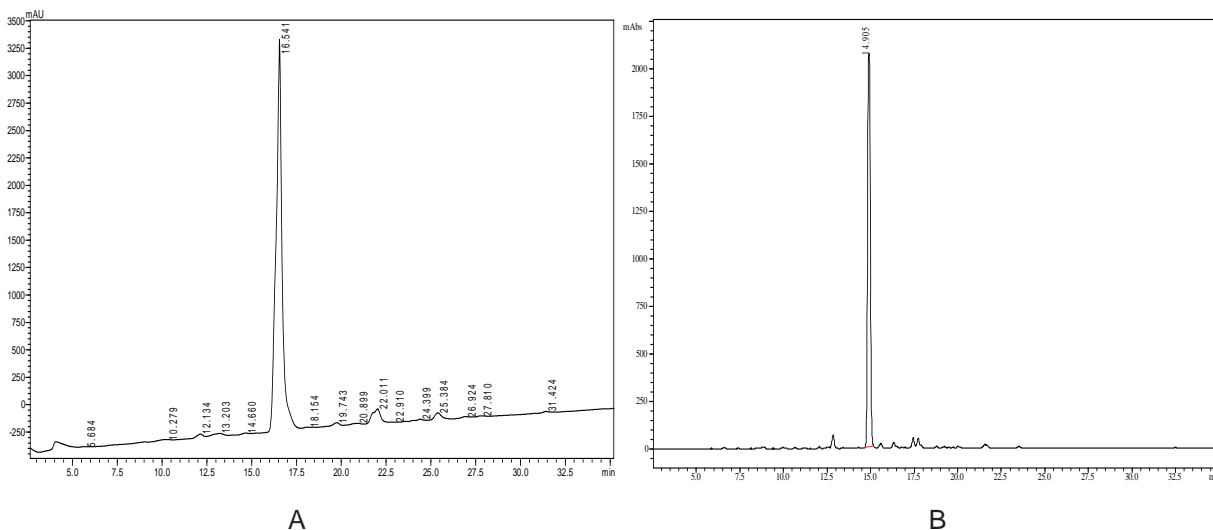
Gambar 2. Rendemen ekstrak miselium kapang *E. nidulans*.
 Figure 2. Yield of *E.nidulans* mycelium extract.

media SWS. Hal ini yang menyebabkan *E.nidulans* lebih mudah dalam mengkonversi sumber nutrisi pada media MEB menjadi senyawa metabolit sekunder (dalam bentuk ekstrak kasar) sehingga rendemen yang dihasilkan lebih tinggi.

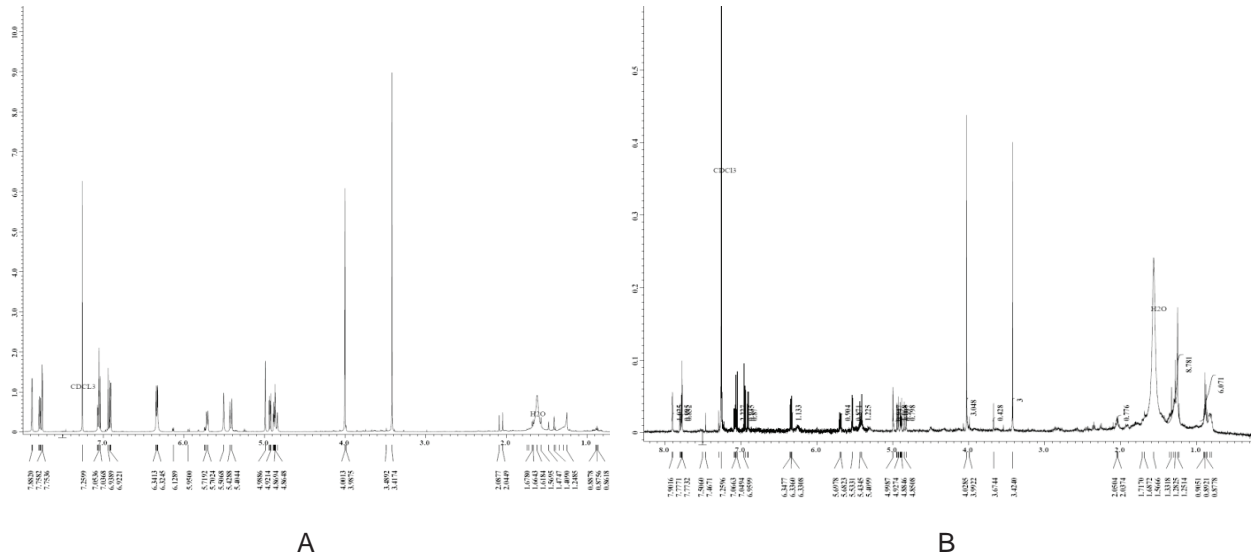
Isolasi Emestrin

Isolasi emestrin dari miselium *E.nidulans* mulai dari proses ekstraksi, fraksinasi dan purifikasi berhasil

dilakukan. Emestrin hasil isolasi dicek kemurniannya dengan KCKT dan ¹H-NMR kemudian hasilnya dibandingkan dengan profil KCKT dan ¹H-NMR hasil penelitian Nursid *et al.* (2011^b) (Gambar 3). Dalam penelitian ini emestrin terelusi pada menit ke-16,5 sedangkan dalam penelitian Nursid *et al.* (2011^b) terelusi pada menit ke-14,9. Perbedaan waktu retensi ini disebabkan oleh kolom yang digunakan berbeda. Berdasarkan profil ¹H-NMR, emestrin yang diisolasi



Gambar 3. Kromatogram emestrin hasil penelitian ini (A) dan kromatogram emestrin hasil penelitian Nursid *et al.* (2011^b) (B).
 Figure 3. Emestrin chromatogram resulted in this research (A) and emestrin chromatogram resulted by Nursid *et al.* (2011^b) (B).



Gambar 4. ¹H-NMR emestrin hasil penelitian ini (A) dan ¹H-NMR emestrin hasil penelitian Nursid *et al.* (2011^b).
 Figure 4. ¹H-NMR of emestrin resulted in this research (A) and ¹H-NMR of emestrin resulted by Nursid *et al.* (2011^b).

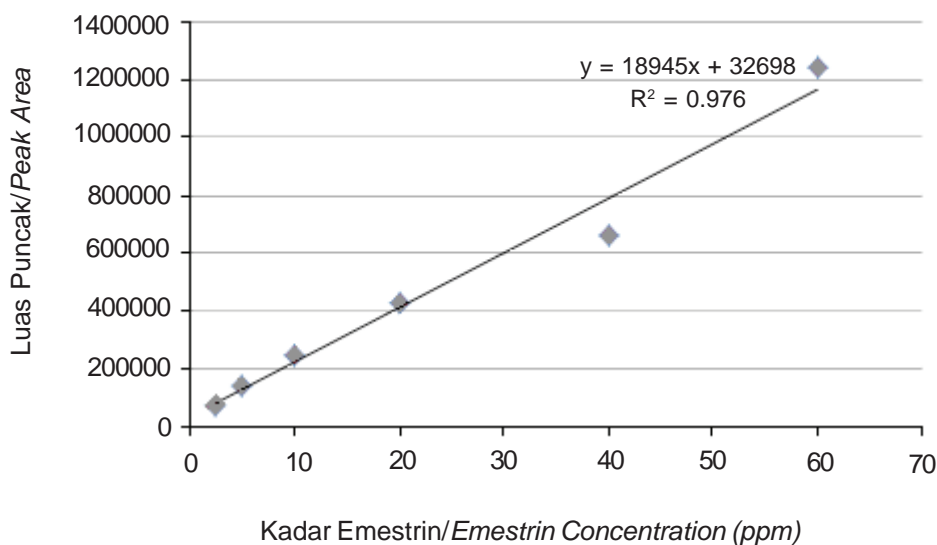
dalam penelitian ini memiliki kesamaan dengan emestrin hasil penelitian Nursid *et al.* (2011^b) (Gambar 4). Berdasarkan profil KCKT dan ¹H-NMR tersebut maka dapat dipastikan bahwa senyawa yang diisolasi dalam penelitian ini adalah emestrin.

Analisis KCKT dan Kadar Emestrin

Analisis produksi emestrin oleh kapang *E.nidulans* dilakukan pada setiap periode kultivasi dalam media MEB dan SWS. Penelusuran emestrin dilakukan berdasarkan waktu retensi dan profil serapan UV yang dihasilkan. Emestrin yang telah diisolasi digunakan

sebagai standar. Senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar dari kedua jenis media tersebut dianggap sebagai emestrin jika memiliki waktu retensi dan serapan UV yang sama dengan emestrin hasil isolasi. Emestrin memiliki waktu retensi sekitar 16 menit dan memiliki serapan optimum (λ_{max}) pada panjang gelombang sekitar 210-215 dan 252 nm.

Berdasarkan kromatogram KCKT, emestrin terdeteksi pada media MEB yang dikultivasi pada minggu ke-1, 2, dan 3 serta pada media SWS pada minggu ke-1, 2, 3, 4, dan 5. Waktu retensi dan profil serapan UV senyawa target yang dihasilkan dalam



Gambar 5. Kurva standar emestrin.
 Figure 5. Standard curve of emestrin.

media SWS dan MEB dalam bentuk ekstrak kasar memiliki kesamaan dengan emestrin.

Kadar emestrin pada ekstrak miselium kapang *E. nidulans* pada media dan waktu kultivasi yang berbeda ditentukan dengan menggunakan kurva standar emestrin yang telah diisolasi. Kurva standar dibuat dengan membuat plot antara serial dosis emestrin versus luas puncak. Kurva linier standar emestrin (Gambar 5) memiliki persamaan $y=18945x + 32698$ dan nilai R^2 sebesar 0,98 di mana y = luas puncak dan x = kadar emestrin.

Berdasarkan kurva standar tersebut kadar senyawa emestrin dalam ekstrak miselium *E. nidulans* dalam media dan waktu kultivasi yang berbeda dapat ditentukan. Kadar emestrin yang dihasilkan oleh *E. nidulans* pada media SWS paling tinggi pada minggu ke-5 yaitu sebesar 103,5 ppm dan terendah pada minggu ke-2 sebesar 22,5 ppm, pada media MEB tertinggi pada minggu ke-2 (42,2 ppm) dan terendah pada minggu ke-4 (5,8 ppm). Berdasarkan analisis KCKT, kadar emestrin pada minggu ke-4 dan ke-5 sangat kecil dibandingkan kadar emestrin pada minggu ke-1, 2, dan 3. Hal ini mungkin disebabkan pada minggu ke-4 dan ke-5 emestrin yang terdapat dalam miselium digunakan sebagai prekursor dalam biosintesis senyawa lain yang diperlukan sehingga kadarnya menyusut. Kromatogram emestrin dalam ekstrak kasar miselium *E. nidulans* pada media SWS minggu ke-5 dan media MEB minggu ke-2 disajikan pada Gambar 6.

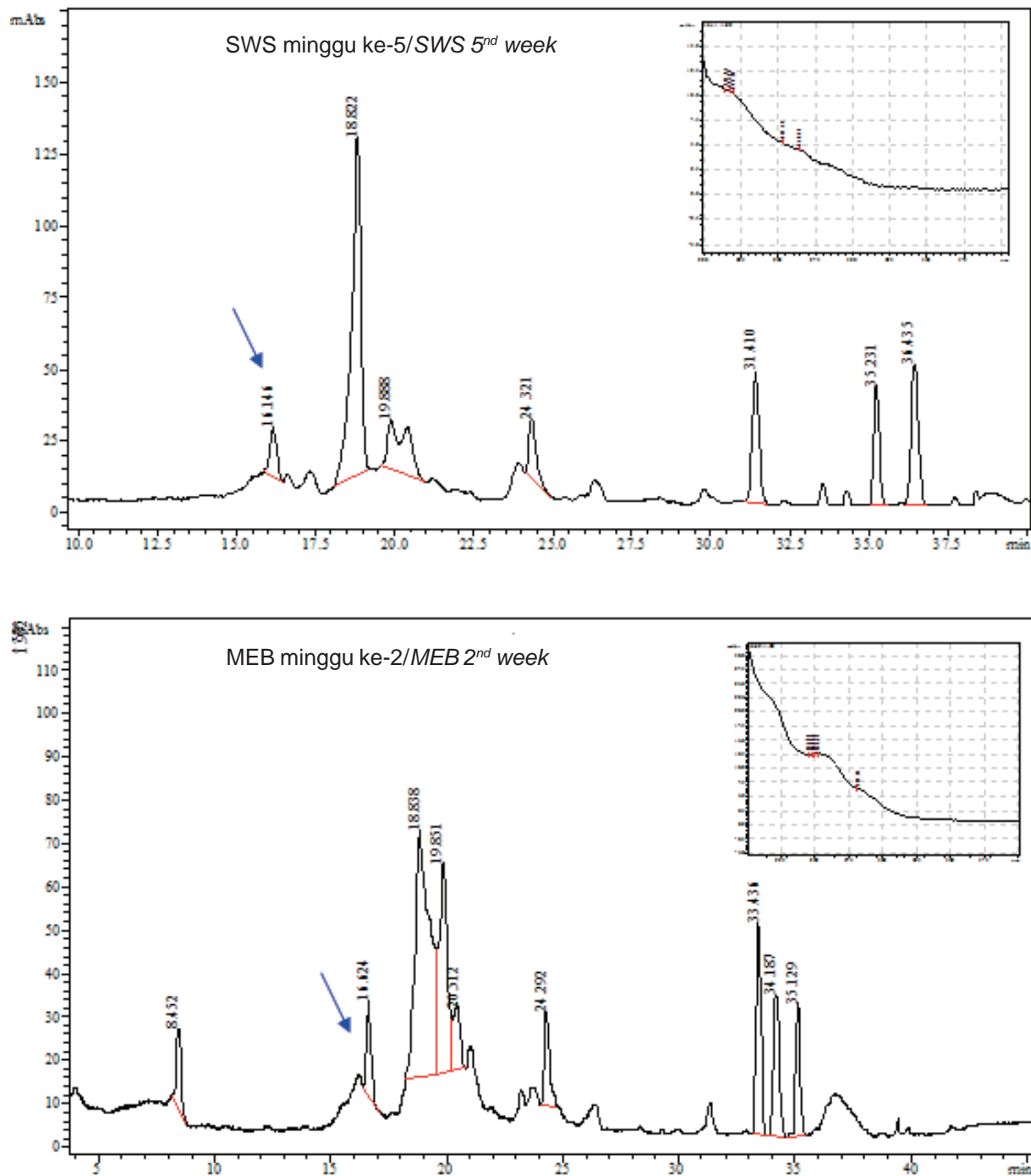
Tingginya kadar emestrin SWS berhubungan dengan komposisi media kultivasi yang digunakan. Pati dapat larut yang terdapat pada media SWS kemungkinan besar menjadi sumber C dan H yang baik sebagai bahan dasar biosintesis emestrin. Struktur emestrin disajikan pada Gambar 7. Biosintesis ETP termasuk emestrin terjadi dengan melibatkan asam-asam amino tertentu sebagai prekursor, misalnya senyawa ETP gliotoksin yang membutuhkan asam amino fenilalanin dan serin dalam tahapan awal biosintesisnya. Kehadiran atom S (Gambar 7) kemungkinan berasal dari metionin, sistein dan sodium sulfat meskipun mekanisme atom S diintroduksi ke dalam struktur ETP masih belum diketahui. Gen-gen yang bertanggungjawab terhadap biosintesis ETP secara khusus disintesis melalui modular enzim *non-ribosomal peptide synthetases* (NRPSs) yang secara umum terdapat dalam bentuk *cluster* (Gardiner *et al.*, 2005; Jiang & Guo, 2011).

Menurut Calvo *et al.* (2002) senyawa metabolit sekunder pada kapang pada umumnya berhubungan dengan proses sporulasi. Senyawa metabolit sekunder yang berasosiasi dengan proses sporulasi secara garis besar dapat dibagi menjadi 3 bagian yaitu: 1) metabolit yang berperan mengaktifasi proses sporulasi, misalnya derivat asam linoleat yang dihasilkan oleh *Aspergillus nidulans*, 2) pigmen yang dibutuhkan untuk pembentukan struktur sporulasi, misalnya melanin yang diperlukan untuk pembentukan dan integritas spora aseksual maupun seksual, dan

Tabel 1. Kadar emestrin (/1 mg) ekstrak kasar yang dihasilkan *E. nidulans* pada media dan waktu kultivasi yang berbeda

Table 1. Emestrin concentrations (/1 mg) of crude extract yielded from *E. nidulans* at different medium and cultivation time

Media/Media	Waktu (minggu)/ Time (week)	Luas Puncak/ Peak Area	Kadar Emestrin/Emestrin Concentration (ppm)
SWS	1	634983	31.8
	2	496845	22.5
	3	1775040	85.0
	4	1400610	65.5
	5	2124840	103.5
MEB	1	273522	30.2
	2	262070	42.2
	3	211451	32.4
	4	142114	5.8
	5	145072	5.9

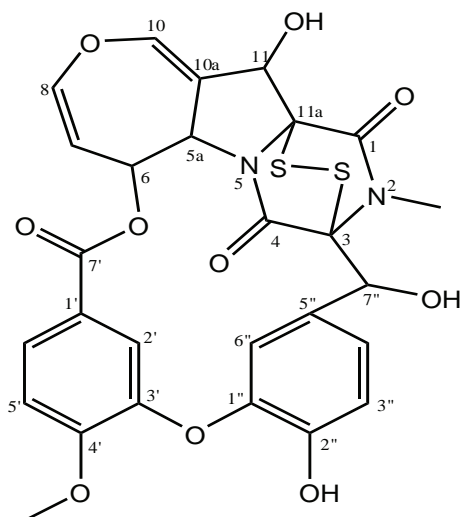


Gambar 6. Kromatogram KCKT emestrin (tanda panah) dan serapan UV yang dihasilkan (insert) *E.nidulans* pada media SWS minggu ke-5 dan MEB minggu ke-2.

Figure 6. HPLC chromatogram of emestrin (arrows) and UV absorbance (insert) produced by *E.nidulans* on the fifth week in SWS medium and second week in MEB medium.

3) metabolit toksik yang dihasilkan oleh koloni yang sedang tumbuh. Menurut Gandjar *et al.* (2006), selama pertumbuhannya, kapang menghasilkan senyawa-senyawa yang tidak diperlukan lagi dan dikeluarkan ke lingkungannya. Senyawa-senyawa tersebut digunakan sebagai sarana untuk

mempertahankan diri dari serangan organisme lain termasuk terhadap sesama mikroba. Dalam kaitannya dengan hasil penelitian ini maka produksi emestrin pada kapang *E.nidulans* berhubungan dengan sistem pertahanan diri dengan menghasilkan metabolit toksik untuk melindungi koloni yang sedang tumbuh. Dalam



Gambar 7. Struktur molekuler emestrin (Jiang & Guo, 2011).
 Figure 7. Molecular structure of emestrin (Jiang & Guo, 2011).

kasus lain, produksi senyawa aktif emericellamide dari *E.nidulans* yang dikultivasi secara tunggal jumlahnya lebih sedikit bila dibandingkan dengan *E.nidulans* yang dikultivasi bersama (*co-culture*) dengan aktinomisetes *Salinispora arenicola*. Emericellamide kemungkinan besar diproduksi sebagai respon untuk menghambat pertumbuhan aktinomisetes tersebut (Oh *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Kapang *E. nidulans* yang dikultivasi pada media SWS selama 5 minggu menghasilkan jumlah biomassa yang paling banyak, tetapi rendemen ekstrak kasar yang terbanyak dihasilkan oleh kapang *E. nidulans* yang dikultivasi pada media MEB selama 5 minggu.

Kadar emestrin tertinggi dihasilkan oleh kapang *E. nidulans* yang dikultivasi di dalam media SWS selama 5 minggu dengan konsentrasi sebesar 103,5 ppm/1,0 mg ekstrak kasar dan pada media MEB kadar emestrin tertinggi dihasilkan pada minggu ke-2 dengan konsentrasi sebesar 42,2 ppm/1,0 mg ekstrak kasar.

DAFTAR PUSTAKA

Bugni, T.S. and Ireland, C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 21: 143–163.
 Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66(3): 447–459.

Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Nayak, T., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H.C., Ho, W.Y., Simityan, H., Kuo, E., Praseuth, A., Watanabe, K., Oakley, B.R., and Wang, C.C.C. 2008. Molecular genetic mining of the *Aspergillus* secondary metabolome: discovery of the emericellamide biosynthetic pathway. *Chemistry & Biology.* 15: 527–532.
 Dharmaputra, O.K., Gunawan, A.W., dan Nampian. 1989. *Penuntun Praktikum Mikologi Dasar*. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
 Gandjar, I., Sjamsuridzal, W., dan Oetari, A. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
 Gardiner, D.M., Waring, P., and Howlett, B.J. 2005. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) Class of Fungal Toxins: Distribution, Mode of Action, Functions and Biosynthesis. *Microbiology.* 151: 1021–1032.
 Jang, J.H., Kanoh, K., Adachi, K., and Shizuri, Y. 2006. Awajanomycin, a Cytotoxic d-Lactone- α -lactam Metabolite from Marine-Derived *Acremonium* sp. AWA16-1. *Journal of Natural Product.* 69: 1358-1360
 Jiang, C.S. and Guo, Y.W. 2011. Epipolythiodioxopiperazines from Fungi: Chemistry and Bioactivities. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 11: 728-745
 Kjer, J., Debbab, A., Aly, H., and Proksch, P. 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols.* 5(3): 479–490.
 Kralj, A., Kehraus, S., Krick, A., Eguereva, A., Kelter, G., Maurer, M., Wortmann, A., Fiebig, H.H., and Konig, M. 2006. Arugosin G and H: prenylated polyketodes from marine-derived fungi *Emericella nidulans* var. *acristata*. *Journal of Natural Products.* 69: 995–2000.
 Nursid, M., Chasanah, E., Murwantoko, dan Wahyuono, S. 2011^a. Penapisan kapang laut penghasil senyawa

- sitotoksik dari beberapa perairan di Indonesia. *Jurnal Penelitian Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 6(1): 45–56.
- Nursid, M., Chasanah, E., Murwantoko, and Wahyuono, S. 2011^b. Isolation and identification of emestrin from *Emericella nidulans* and investigations of its anticancer properties. *Microbiology Indonesia*. 5(4): 160–169.
- Oh, D.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2007. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. *Journal of Natural Products*. 70: 515–520.