

SCREENING SENYAWA METABOLIT SEKUNDER PADA FUNGI LAUT *EMERICELLA NIDULANS*

Irah Namirah¹, Antonius Herry Cahyana², Muhammad Nursid³, Nurrahmi Dewi Fajarningsih³

¹Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Serang, Indonesia

²Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

³Balai Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jl. KS tubun Petamburan VI, Jakarta 10260, Indonesia

*E-mail: irahnamirah@untirta.ac.id

Abstract: Investigation bioactive secondary metabolite previously, Research Center for Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology found anticancer properties to *Emericella nidulans* marine fungi strain MFW39 isolated from ascidia *Aplidium longithorax* collected from Wakatobi Marine National Park. Emestrin was a compound with an ETP (epipolithiodioxopiperazine) group that found in *Emericella nidulans* marine fungi have cytotoxicity properties. Emestrin show cytotoxic activity to breast cancer cell line [T47D], cancer cervic cell line [HeLa], colon cancer cell line [WiDr] and liver cancer cell line (HepG2). The aim of the research to investigated other derivative of emestrin compound. The screening with UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) mass analysis q-TOF/MS (quadrupole-Time of Flight/Mass spectra) positif mode (ES+). Monoisotopic ion Derivative compound of emestrin that detected from (ES+) UPLC-ESI-qTOF-MS spectrum are emestrin B, emestrin C. Another compound that detected are cytochalasin B dan C.

Keywords: *Emericella nidulans*, Emestrin, Emestrin derivative, UPLC- q-TOF/MS spectrum

Abstrak: Pada penelitian pencarian metabolit sekunder bioaktif sebelumnya, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan menemukan fungi *Emericella nidulans* strain MFW39 yang diisolasi dari ascidia *Aplidium longithorax* dari Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi tenggara memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker, diantaranya sel turunan kanker payudara (T47D), liver (HepG2), kanker usus (C28) dan serviks (HeLa). Senyawa yang berkontribusi terhadap sifat sitotoksik adalah senyawa emestrin yang memiliki gugus ETP (epipolithiodioxopiperazine). Hasil isolasi dan karakterisasi senyawa bioaktif yang ditemukan pada fungi *Emericella nidulans* strain MFW39 adalah senyawa emestrin. Penelitian ini bertujuan mencari derivat senyawa emestrin lain. Proses screening dilakukan dengan mencari puncak monoisotopik senyawa emestrin beserta derivatnya dan beberapa metabolit sekunder dengan menggunakan metode UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) analisa massa q-TOF/MS (quadrupole-Time of Flight/Mass spectra) mode positif (ES+). Senyawa metabolit sekunder yang berhasil terdeteksi diantaranya adalah derivat senyawa emestrin yaitu emestrin B, emestrin C, dan senyawa cytochalasin B dan C.

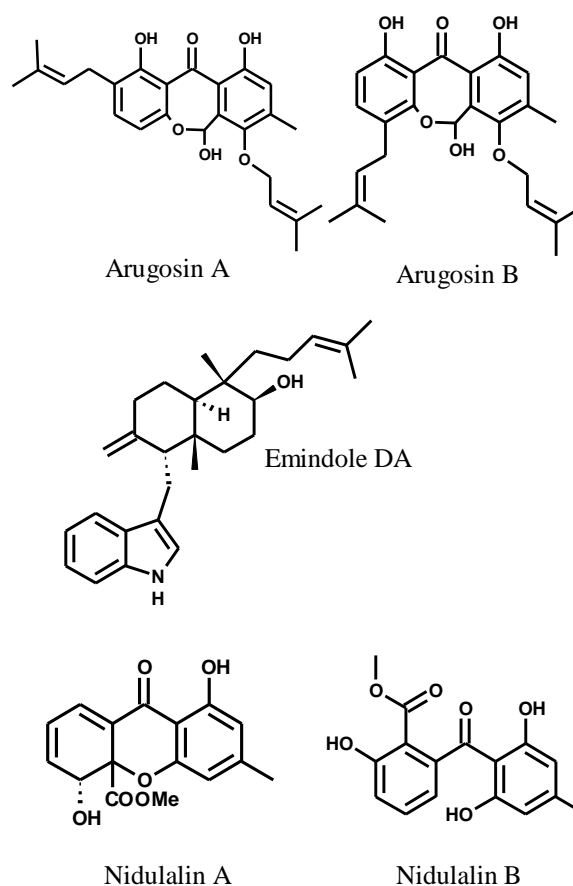
Kata kunci: *Emericella nidulans*, Emestrin, Derivat emestrin, Spektrum UPLC- q-TOF/MS

PENDAHULUAN

Beberapa metabolit sekunder yang telah berhasil diisolasi dari fungi *Emericella nidulans*, diantaranya adalah senyawa turunan dihidroxanton, nidulalin A, senyawa turunan benzophenon, nidulalin B (Kawahara et al., 1994), senyawa EPT, emestrin (Nursid et al., 2011), Emestrin B (Nursid et al., 2015). Senyawa nidulalin A dan B diisolasi dari kultur *Emericella nidulans* var. Lata, strain IN-68, yang diisolasi dari tanaman obat Indonesia, *Trigonella foenumgraecum*. Senyawa xanton ini secara biogenesis merupakan turunan antraquinon melalui pemutusan oksidatif cincin quinone (Greve et al., 2010).

Turunan benzophenon, arugosin, dan alkaloid indol, emindole DA, diisolasi dari fungi *Emericella nidulans* var. *Acristata*, yang diisolasi dari alga hijau Mediterranean (Greve et al., 2010). *Emericella nidulans* pun diketahui menghasilkan sterigmatocystin, suatu mikotoksin yang biasa ditemukan pada *Aspergillus versicolor* (Pitt & Hocking, 2009). Beberapa struktur metabolit sekunder pada kapang *Emericella nidulans* disajikan pada Gambar 1. Genus *Emericella* atau *Aspergillus* membiosintesis beragam metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang menarik, sehingga dapat dijadikan

senyawa pemandu dalam pengembangan agen obat baru.



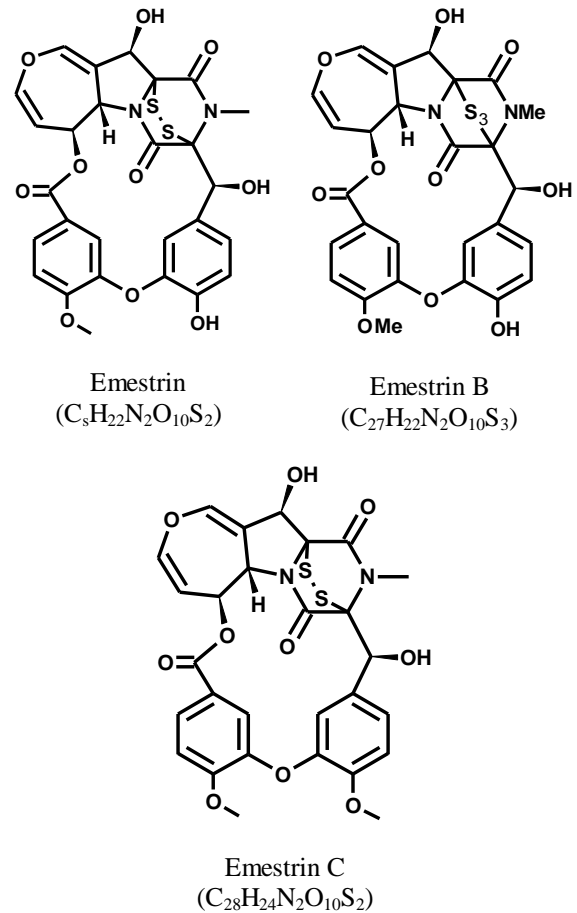
Gambar 1. Beberapa metabolit sekunder pada kapang *Emericella nidulans*

Genus *Emericella* merupakan genus yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif. Diantaranya, *Emericella nidulans* mengandung senyawa alkaloid indole, poliketida terprenilasi, benzophenon, dan xanton (memiliki aktivitas sebagai antitumor). *Emericella varicolor* mengandung quinone (sitotoksik), indole alkaloid (aktivitas penangkal radikal), poliketida (antimikroba). *Emericella quadrilineata*

mengandung senyawa xanton (immunostimulant). *Emericella heterothalica* dan *Emericella striata* mengandung senyawa *epitetrathiodioxopiperazine* (antialergi) (Figueroa et al., 2009). *Epipolithiodioxopiperazine* (ETP) merupakan salah satu kelas senyawa toksin yang telah diketahui aktivitas biologinya selain poliketida, peptida siklik, alkaloid, dan sesquiterpenoid. Ciri khas kelas ETP adalah jembatan disulfida internal. ETP merupakan metabolit sekunder toksik yang hanya diproduksi oleh fungi (Gardiner et al., 2005).

Senyawa emestrin dihasilkan dari fungi laut yang bergenus *Emericella*. Pertama kali, emestrin diisolasi dari fungi *Emericella quadrilineata* oleh Maebayashi, dkk dan diketahui sebagai mycotoxin. Sementara mycotoxin yang ditemukan pada *Emericella striata* diantaranya adalah sterigmatocystin dan emestrin. Sterigmatocystin lebih menjadi perhatian para mikotoksikologis, dikarenakan senyawa ini ditemukan sebagai kontaminan makanan, pada beberapa jenis produk seperti keju, gandum, beras, biji kopi hijau, jagung dan lain – lain. Sementara emestrin tidak ditemukan. Emestrin sendiri memiliki aktivitas antifungal (Seya et al., 1985).

Struktur Emestrin dan derivatnya diberikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Emestrin dan derivatnya

Penelitian beberapa dekade sebelumnya telah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa emestrin berasal dari *Emericella striata* (Seya et al., 1985), *Aspergillus sp* (Seya et al., 1986), *Emericella faveolata* (Ooike et al., 1997), *Verticimonosporium ellipticus* (Herath et al., 2005) dan *Emericella nidulans* (Nursid et al., 2011). Senyawa ini diketahui memiliki kemampuan aktivitas biologi sebagai antifungal (Seya et al., 1985).

Perkembangan berikutnya diketahui, bahwa emestrin memiliki kemampuan aktivitas biologi terhadap beberapa sel kanker (Nursid *et al.*, 2011), sel kanker prostat (Onodera *et al.*, 2004) dan sebagai antagonis reseptor chemokine (Herath *et al.*, 2005).

METODE

Bahan

Spora fungi *Emericella nidulans* MFW-39 merupakan koleksi Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.

Kultivasi dan kultur

Fungi (1L x30) dikultur selama 4 - 5 minggu dalam kondisi statis pada suhu 27 – 29⁰C dalam medium MEA cair. Metode kerja kultivasi dan isolasi senyawa emestrin berdasarkan prosedur yang telah dilakukan Nursid *et al.*, (2011). Spora strain fungi *Emericella nidulans* MFW-39 yang disimpan dalam freezer suhu -70⁰C dikultur dalam cawan petri media MEA (*Malt Extract Agar*) dan CYA (*Czepak Yeast Agar*) padat. Setelah 3-4 hari, spora dipindahkan ke dalam tabung reaksi 5 mL media MEA cair. Spora fungi cair dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer 500 mL media MEA cair. Setelah 2 hari, 2

mL spora dalam kultur cair dimasukkan ke dalam labu ukur 3L yang berisi 1 L media cair MEA dengan kandungan 0.3% ekstrak malt, 0.3% ekstrak yeast, 0,5 % dan air laut dengan kadar salinitas 31%. Fungi dikultur selama 4 – 5 minggu dalam kondisi statis pada suhu 27 – 29⁰C.

Fraksinasi ekstrak kering

Prosedur berdasarkan yang telah dilakukan Nursid *et al.*, (2011). Miselium kering dimaserasi dengan pelarut metanol dan diklorometana (1:1) 1200 mL. Ekstrak diuapkan dengan evaporator buchi pada kondisi tekanan vakum 130 – 100 mbar, temperatur 35⁰C dan rotasi 75 rpm.

Fraksinasi terhadap ekstrak kasar miselium dilakukan dengan kolom kromatografi vakum sepra silika (50 μ m) 2 x 12 cm dan dielus dengan n-heksana : etil asetat = 8 : 1, n-heksana : etil asetat = 1 : 1, etil asetat 100 %, dan metanol 100% dengan volume masing-masing 200 mL.

Identifikasi fraksi

Penentuan massa per muatan (m/z) beberapa metabolit sekunder menggunakan metode UPLC-qTOF-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography-qToF-Mass Spectrometry*). Kolom yang digunakan UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1x50 mm. Laju alir eluen 0.3 mL/min. Fase gerak A: H₂O

+ 0.1% asam format dan B: Asetonitril + 0.1% asam format dengan metode gradien.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultivasi fungi Emericella nidulans

Proses kultivasi fungi diawali dengan mengkultur spora strain fungi *Emericella nidulans* MFW-39 (koleksi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan) yang disimpan dalam freezer -70°C dalam cawan petri dengan menggunakan dua jenis media yaitu MEA (*Malt Extract Agar*) dan CYA (*Czapek Yeast Agar*) padat. Penggunaan dua media ini dilakukan untuk mengidentifikasi *Emericella nidulans*. Ciri koloni *Emericella nidulans* pada media CYA diantaranya adalah berdiameter 40-50 mm, cukup padat, miselium berwarna putih, sel hulle berwarna putih kekuning-kuningan. Sementara pada media MEA, memiliki ciri koloni yaitu berdiameter 35-60 mm, miselium berwarna putih, sel hulle berwarna kuning pucat atau kekuning-kuningan (Pitt *et al.*, 2009).



Gambar 3. Koloni *Emericella nidulans*

Biomassa fungi dikultivasi dari spora atau dari sel – sel vegetatif pada kultur cair dan akan meningkat dengan pembentukan sel vegetatif maupun filamen – filamen hifa serta pembentukan sekelompok miselium yang sering memiliki bentuk yang bervariasi. Kultivasi fungi pada media cair memungkinkan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas tertentu (Nursid,*et al.*, 2010). Metabolit sekunder bioaktif dihasilkan oleh suatu organisme laut sebagai upaya pertahanan diri terhadap perubahan lingkungan yang ekstrim, diantaranya faktor suhu, salinitas, pH, dan cahaya matahari. Penelitian Nursid (2010), kondisi optimum yang diperlukan untuk mendapatkan senyawa bioaktif (emestrin) adalah kadar salinitas 31% dan suhu 27°C .

Proses kultivasi fungi *Emericella nidulans* menghasilkan 498,4 gram miselium. Ekstraksi miselium menghasilkan ekstrak kasar sebanyak 44,8390 gram dan berwarna coklat tua kemerahan. Ekstraksi miselium menggunakan pelarut diklorometana – metanol (1:1) dengan target senyawa organik semipolar.

Ekstrak kasar miselium difraksinasi dengan variasi pelarut berdasarkan tingkat kepolaran. Tujuan dari fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa – senyawa

berdasarkan tingkat kepolaran. Senyawa organik larut dalam air atau polar (misalnya alkaloid, sikimat, poliketida, gula, asam amino, polihidroksisteroid dan saponin) dapat ditemukan dengan menggunakan pelarut n-butanol, kloroform (CHCl₃), etil asetat (EtOAc), aseton, metanol (MeOH), etanol, air ataupun kombinasi pelarut tersebut. Senyawa semipolar dapat diekstraksi dengan diklorometana atau metanol. Sementara senyawa dengan kepolaran yang rendah (terpene, hidrokarbon dan asam lemak) diekstraksi menggunakan pelarut karbon tetraklorida dan heksana (Duarte, 2005).

Berdasarkan penelitian Nursid (2011), ekstrak kasar difraksinasi menggunakan 4 jenis eluen yaitu n-heksana – etil asetat (8:1), n-heksana – etil asetat (1:1), etil asetat dan metanol. Ekstrak kasar difraksinasi menggunakan kromatografi kolom vakum dengan fase diam silika (50µm) menghasilkan 4 fraksi. Senyawa emestrin ditemukan pada fraksi yang semipolar yaitu fraksi etil asetat (F3) (Nursid *et al.*, 2011).

Fraksi etil asetat (F3) dilakukan proses pemurnian lebih lanjut untuk menghilangkan senyawa – senyawa yang lebih non polar. Proses pemurnian dilakukan dengan menggunakan kolom tabung silika LC *preparative phenomex* (10gr/60mL) dan *fraction collector* dengan

kecepatan 150 tetes/tabung. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi yang lebih kecil sehingga mendapatkan pemisahan yang lebih baik. F3 difraksinasi dengan variasi eluen: n-heksana – etil asetat (8:1), n-heksana – etil asetat (5:1), n-heksana – etil asetat (1:1), etil asetat dan etil asetat – metanol (8:1) (Nursid *et al.*, 2011).

Screening senyawa metabolit sekunder pada fungi *Emericella nidulans*

Beberapa metabolit sekunder yang telah berhasil diisolasi dari fungi *Emericella nidulans*, diantaranya adalah senyawa turunan dihidroxanton, nidulalin A, senyawa turunan benzophenon, nidulalin B (Kawahara *et al.*, 1994), senyawa EPT, emestrin (Nursid *et al.*, 2011). Senyawa nidulalin A dan B diisolasi dari kultur *Emericella nidulans* var. Lata, strain IN-68, yang diisolasi dari tanaman obat Indonesia, *Trigonella foenumgraecum*. Senyawa xanton ini secara biogenesis merupakan turunan antraquinon melalui pemutusan oksidatif cincin quinone (Greve *et al.*, 2010).

Nielsen *et al.*, telah mengidentifikasi dan mengklasifikasi 474 mikotoksin dan metabolit fungi dari beberapa genus, diantaranya *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma* dan *stachybotrys*. Berdasarkan data Nielsen

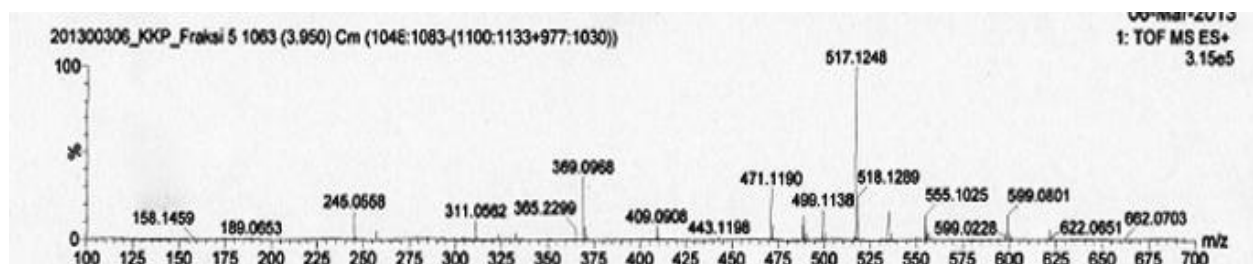
(2003) menjadi acuan dalam pencarian beberapa metabolit sekunder selain emestrin terhadap fraksi etil asetat menggunakan metode UPLC-ESI-qTOF-MS.

UPLC merupakan metode kromatografi cair kinerja ultra tinggi. Kolom yang digunakan memiliki diameter partikel yang lebih kecil dibanding HPLC, sekitar 1.7 μm (Schwartz,2005). Sehingga resolusi lebih tinggi dan waktu pemisahan akan lebih cepat. Sumber ionisasi yang digunakan adalah Electrospray ionisation (ESI). MS-ESI merupakan metode analitik yang baik untuk menganalisa ion molekul polar dan senyawa – senyawa berbobot molekul tinggi (Supratman, 2010). Kombinasi ESI/MS dengan analisa massa

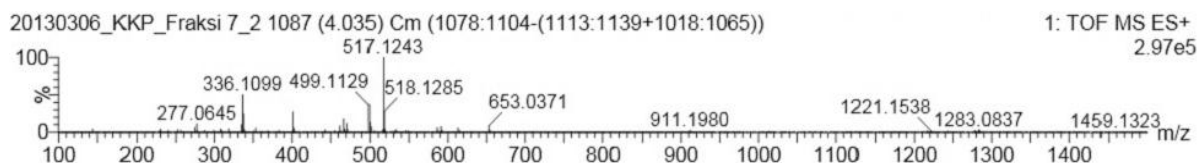
q-TOF/MS (*quadrupole-Time of Flight/Mass spectra*) menyebabkan UPLC-ESI-qTOF-MS memiliki selektivitas, sensitivitas dan resolusi lebih tinggi (Chen, 2007), sehingga puncak – puncak minor pada kromatogram HPLC dan berkonsentrasi rendah dapat terbaca pada UPLC.

Tabel 1. Data Kalkulasi Puncak Monoisotopik

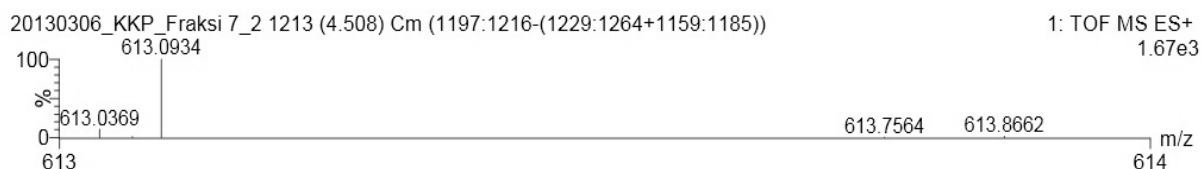
senyawa	Rumus struktur	M	M+H
Emestrin	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$	598,0716	599,0794
Emestrin B	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_3$	630,0437	631,0515
Emestrin C	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$	612,0872	613,0951
Emestrin D	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_3$	644,0593	645,0671
Emestrin E	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_4$	676,0314	677,0392
Secoemestrin	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$	538,0864	539,0947
Cytochalasin A	$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_5$	477,2515	478,2593
Cytochalasin B	$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_5$	479,2672	480,2750
Cytochalasin C	$\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_6$	507,2621	508,2699



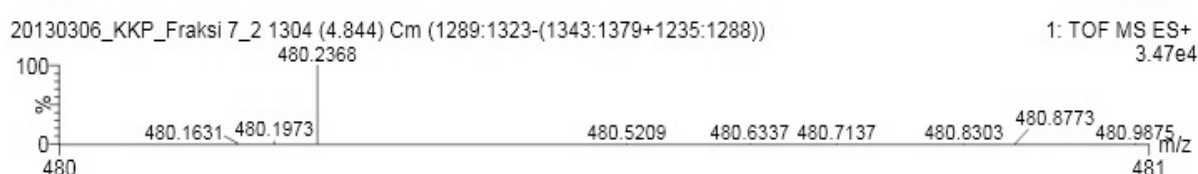
Gambar 4. Spektrum Mode Positif (ES+) LC-ESI-qTOF-MS Emestrin



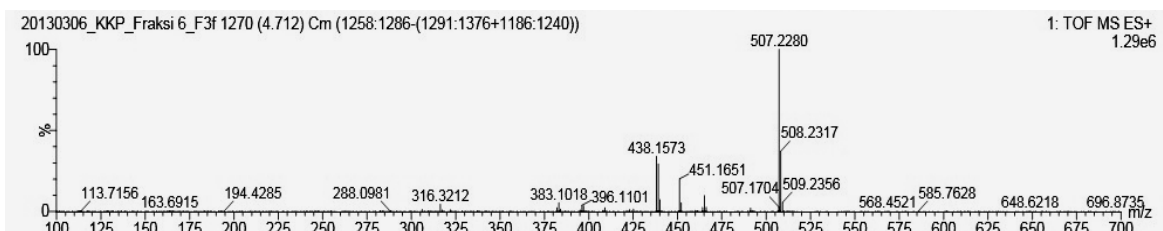
Gambar 5. Spektrum Mode Positif (ES+) LC-ESI-qTOF-MS Emestrin B



Gambar 6. Spektrum Mode Positif (ES+) LC-ESI-qTOF-MS Emestrin C



Gambar 7. Spektrum Mode Positif (ES+) LC-ESI-qTOF-MS Cytochalasin B



Gambar 8. Spektrum Mode Positif (ES+) LC-ESI-qTOF-MS Cytochalasin C

Pada gambar 4, puncak monoisotopik ion molekul emestrin UPLC-ESI-qTOF-MS mode positif (ES+) pada waktu retensi 3.985 terdapat ion fragmentasi dengan m/z 517.1248 [M-S₂-OH]⁺, 599.0801 [M+H]⁺, 621.0627 [M+Na]⁺ dan 622.0651 [M-H₂O+ACN]⁺. Hal ini dapat dikonfirmasi dengan publikasi Nielsen *et al.* puncak dasar ion monoisotopik predominan molekular emestrin 517, 499, 535, 489, 599. Kedua fraksi menunjukkan puncak dasar ion monoisotopik molekul.

Pada gambar 5, spektrum UPLC-ESI-qTOF-MS mode positif (ES+)

menunjukkan adanya puncak monoisotopik ion molekul emestrin B pada m/z 631.0525 [M+H]⁺, 613.0396 [M-OH]⁺, dan 653.0437 [M+Na]⁺, pada waktu retensi 4.031. Data m/z fraksi 3.7 sesuai dengan data Nielsen *et al.* (2003) puncak monoisotopik ion molekul senyawa emestrin B pada 517, 499(21), 613(2), 631(10).

Menurut Seya *et al.* (1985) senyawa emestrin selalu diisolasi bersamaan dengan emestrin B. Berdasarkan pencarian puncak ion monoisotopik [M+H]⁺ pada fraksi etil asetat didapatkan puncak ion

monoisotopik emestrin (m/z 599.0773) pada waktu retensi 3.935, emestrin B (m/z 631.0518) pada waktu retensi 4.035, Emestrin C (m/z 613.0934) pada waktu retensi 4.508.

Fraksi ini juga terdeteksi senyawa lain selain derivat emestrin, yaitu cytochalasin B dan cytochalasin C. Spektrum ditunjukkan pada gambar 7 dan 8, cytochalasin B (m/z 480.2368) pada waktu retensi 4.844 dan cytochalasin C (m/z 508,2699) pada waktu retensi 4,712.

Puncak ion monoisotopik dikonfirmasi dengan data Nielsen (2003) dan didapatkan m/z 517, 599, (emestrin). m/z 631 (emestrin B), m/z 480 (cythochalasin B) dan m/z 508 (cytochalasin C). Berdasarkan perhitungan puncak monoisotopik melalui UPLC-qTof-MS menunjukkan puncak monoisotopik senyawa emestrin, emestrin B, emestrin C, cythochalasin B dan cytochalasin C.

Pada penelitian Nursid, et al., (2015) telah berhasil diisolasi Emestrin B dan isolat diidentifikasi melalui spektrum H-NMR dan C-NMR. Data terkonfirmasi dengan data Nozawa, et al. Berdasarkan

penelitian Nursid, et al, kedua senyawa ini menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker yaitu kanker serviks (Hela), kanker payudara (T47D) dan kanker usus (WiDr).

Onodera et al. (2004) berhasil mengisolasi emestrin C (MPC1001) dan analognya (MPC1001B-H) dari kelas fungi *Cladorrhinum sp.* MPC1001 memiliki aktivitas biologi yang sangat potensial sebagai antitumor. Oleh karena itu diharapkan penelitian berikutnya adalah dapat mengisolasi senyawa emestrin C pada fungi *Emericella nidulans* dan menguji aktivitas sitotoksiknya.

KESIMPULAN

Beberapa senyawa metabolit sekunder yang terdeteksi melalui spektrum mode positif UPLC-ESI-qTOF-MS pada fungi laut *Emericella nidulans* adalah emestrin, emestrin B, emestrin C, cytochalasin B dan cytochalasin C. Data ini dapat menjadi acuan untuk mengisolasi senyawa emestrin C yang diketahui memiliki potensi yang lebih besar.

DAFTAR RUJUKAN

Chen, G., Pramanik, B. N., Liu, Y., Mirza, A. U. (2007). Applications of LC/MS in structure identifications of small

molecules and proteins in drug discovery. *Journal of Mass Spectrometry*, vol 42, hh. 279-287.

- Duarte, K., Rocha-santos, T., Freitas, A.C., dan Duarte, A.C. (2012). Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. *Trends in Analytical Chemistry*, hh. 97-110.
- Figueroa, M., Gonzalez, M., Rodriguez-Sotres, R., Sosa-peinado, A., Gonzalez-Andrade, M., Cerda-Garcia-Rojas, C., Mata, R. (2009). Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic & Medicinal chemistry*, vol 17, hh. 2167-2174.
- Gardiner, D. M., Waring, P., dan Howlett, B. J. (2005). The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Journal of Microbiology*, vol.151, hh. 1021-1032.
- Greve, H., Mohamed, I. E., Pontius, A., Kehraus, S., Gross, H., Konig, M. (2010). Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. *Pythochem Review*, vol 9, hh. 537-545.
- Herath, K.B., Jayasuriya, H., Ondeyka, J.G., Polishook, J.D., Bills, G.F., *et al.* (2005). Isolation and Structures of Novel Fungal Metabolites as Chemokine receptor (CCR2) Antagonists. *The Journal of Antibiotics*, vol 58, no. 11, hh. 686-694.
- Kawahara, N., Sekita, S., Satake, M., Udagawa, S., dan Kawai, K. (1994). Structures of a new dihydroxanthone derivative, nidulalin A, and a new benzophenone derivative, nidulalin B, fom *Emericella nidulans*. *Chem. Pharm Bull*, vol 42, no. 9, hh. 1720-1723.
- Nielsen, K. F., dan Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standarsdised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002, hh.111-136
- Nursid, M., Chasanah, E., Murwantoko., Wahyuono, S. (2011). Isolation and Identification of Emestrin from *Emericella nidulans* and Investigation of its anticancer properties. *Microbiology Indonesia*, vol 5, no. 4, hh. 160-169.
- Nursid, M., Namirah, I., Cahyana, A.H., Fajarningsih, N.D., dan Chasanah, E. (2015). Emestrin B: Epipolythiodioxypiperazine from marine derived fungus *Emericella nidulans*. *Journal of Medical and Bioengineering*, vol 4, no.6, hh. 441-445.

- Nozawa, K., Udagawa, S., Nakajima, S., dan Kawai, K. (1987). *Studies on Fungal Products : XIV, Emestrin B, a new ETP, from Emericella striata*. *Chem. Pharm. Bull*, vol. 35, no. 8, hh. 3460 – 3461.
- Onodera H, Hasegawa A, Tsumagari N, Nakai R, Ogawa T, Kanda Y. (2004). MPC1001 and its analogues: new antitumor agents from the fungus *Cladorrhinum* species. *Org Lett*, vol. 6, no. 22, hh. 4101-4104.
- Ooike, M., Nozawa, K., dan Kawai, K. (1997). *An epitetrahydrothiodioxopiperazine related to emestrin from Emericella foveolata*. *Phytochemistry*, Elsevier science.
- Pitt, Jhon.L dan Hocking, Alisa. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer.
- Schwartz, Michael. E. (2005). *Ultra Performance Liquid Chromatography: An introduction*. www.cromatographyonline.com, hal 8-14.
- Seya, H., Nakajima, S., Kawai, K., dan Udagawa, S. (1985). Structure and absolute configuration of emestrin, a New Macrocyclic *Epidithiodioxopiperazine* from *Emericella striata*. *J. Chem. Soc*, hh. 657-658.
- Seya, H., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K., dan Udagawa, S. (1986). *Studies on Fungal Product. Part 8. Isolation and structure of Emestrin, a Novel Antifungal Macrocyclic Epidithiodioxopiperazine from Emericella striata. X-Ray Molecular Structure of Emestrin*. *J. Chem. Soc.*, <http://pubs.rsc.org>, hh. 109-116.
- Seya, H., Nozawa, K., Udagawa, S., Nakajima, S., dan Kawai. (1985). *Studies on Fungal Product. IX. DethiosecoEmestrin, a New metabolite related to Emestrin, from Emericella striata*. *Chem. Parm. Bull*, vol. 34, no. 6, hh. 2411-2416.
- Supratman, Unang. (2010). *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Widya Padjajaran, 299-300.
- Terao, K., Ito, E., Kawai, K., Nozawa, K., dan Udagawa, S. (1990). Experimental acute poisoning in mice induced by emestrin, a new mycotoxin isolated from *Emericella* species. *Mycopathologia*, vol. 112, no. 2, hh. 71-79.
- Zhang, G., Sun, S., Zhu, T., Lin, Z., Gu, J. (2011). Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry* 72, hh. 1436-1442. www.elsevier.com/locate/phytochem.