

Potensi Ekstrak Kapang Endofit Asal Rimpang Kunyit sebagai Antimalaria dan Antioksidan

Potency of Endophytic Fungi Extract Derived from Turmeric Rhizome as Antimalarial and Antioxidant

Eris Septiana^{1*}, Bustanussalam¹, Fauzy Rachman¹, Yatri Hapsari¹, Partomuan Simanjuntak^{1,2}

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong,
Bogor, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, Indonesia

*E-mail: septiana.eris@gmail.com

Diterima: 3 November 2016

Direvisi: 16 Februari 2017

Disetujui: 22 Februari 2017

Abstrak

Infeksi malaria masih menjadi masalah kesehatan, terutama di negara berkembang termasuk Indonesia. Infeksi malaria biasanya diiringi dengan meningkatnya radikal bebas dalam tubuh penderita. Keadaan ini akan menyebabkan penurunan tingkat kekebalan tubuh penderita. Pencarian sumber obat baru yang memiliki aktivitas antimalaria sekaligus antioksidan sangat penting. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria dan antioksidan dari ekstrak kapang endofit rimpang kunyit asal Sukabumi secara *in vitro*. Penelitian diawali dengan fermentasi kapang endofit dalam media cair dan ekstraksi filtrat menggunakan etil asetat untuk selanjutnya didapatkan ekstrak uji. Uji antimalaria dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode penghambatan polimerisasi hem, sedangkan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 18 isolat kapang endofit memiliki aktivitas antimalaria dan satu isolat tidak aktif serta seluruh isolat memiliki aktivitas antioksidan. Isolat Smi.Cl.6F merupakan isolat yang paling aktif pada uji aktivitas antimalaria dan antioksidan dengan nilai IC_{50} masing-masing uji sebesar 1,93 mg/mL dan 32,28 mg/L. Oleh karena itu isolat Smi.Cl.6F berpotensi digunakan sebagai obat antimalaria baru.

Kata kunci: Antimalaria; Antioksidan; Kapang endofit; Kunyit

Abstract

Malaria infection is still a public health problem, especially in developing countries, including Indonesia. Malaria infection is usually accompanied by increased free radicals in the body of the patient. This situation will cause decreasing the immune system of the patient. Exploring of new drugs that have antimalarial and also antioxidant activity is very important. Therefore, this study aims to determine in vitro antimalarial and antioxidant activity of endophytic fungi extract origin turmeric from Sukabumi. This study begins with fermentation process of endophytic fungi on the broth medium and ethyl acetate was used to extract the filtrat to gain the test extracts. Heme polymerization inhibition and free radical DPPH scavenging method were used to antimalarial and antioxidant in vitro assay respectively. The results showed that 18 isolates of endophytic fungi have antimalarial activity and one isolate inactive and also all isolates have antioxidant activity. Smi.Cl.6F isolate was the most active isolate on the antimalarial and antioxidant assay with IC_{50} value of each assay were 1.93 mg/mL and 32.28 mg/L respectively. Therefore, Smi.Cl.6F isolates potentially be used as new antimalarial drugs.

Keywords: Antimalarial; Antioxidant; Endophytic fungi; Turmeric

PENDAHULUAN

Penyakit malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* melalui vektor nyamuk *Anopheles* betina. Sekitar 300-500 juta kasus malaria telah dilaporkan di seluruh dunia dan lebih dari 1 juta orang meninggal tiap tahunnya.¹ Parasit *Plasmodium* akan menyerang sel darah merah inangnya dan mendegradasi hemoglobin dalam vakuola makanannya menjadi globin untuk nutrisi dan hem bebas yang toksik terhadap parasit maupun inangnya. Untuk mempertahankan hidupnya, parasit akan mengubah hem bebas tersebut menjadi hemozoin yang tidak toksik.²

Infeksi malaria dapat menimbulkan reaksi pengaktifan sistem imun yang menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan berpotensi menginduksi kerusakan oksidatif serta menghancurkan sel.³ Secara alamiah, tubuh memiliki beberapa mekanisme untuk meminimalkan efek buruk ROS salah satunya dengan menghasilkan senyawa antioksidan.⁴ Namun, infeksi malaria yang telah akut akan menurunkan jumlah dan aktivitas antioksidan serta meningkatkan radikal bebas sehingga menurunkan imunitas tubuh.⁵

Penggunaan antioksidan sintetis untuk mencegah kerusakan akibat radikal bebas telah dilaporkan dapat menimbulkan efek samping yang toksik sehingga perlu dilakukan pencarian sumber antioksidan baru dari alam.⁶ Salah satu bahan alam yang banyak dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan tinggi ialah senyawa golongan polifenolik yang dapat ditemukan sebagai senyawa metabolit sekunder dari kapang endofit.⁷ Kapang endofit merupakan kapang yang hidup dalam jaringan tanaman inangnya, tidak menunjukkan gejala penyakit, serta membentuk simbiosis mutualisme.⁸ Kapang endofit *Fusarium* sp. yang diisolasi dari tanaman *Azadiracta indica* memiliki aktivitas antimalaria terhadap parasit *Plasmodium falciparum* strain 3D7.⁹

Beberapa kapang endofit juga dilaporkan menghasilkan antioksidan, diantaranya yaitu *Fusarium*, *Phaeoacremonium*, *Acremonium*, *Phomopsis*, *Paecilomyces*, dan *Cladosporium* yang diisolasi dari batang dan daun tanaman turi (*Sesbania grandiflora*).¹⁰ Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimalaria dan antioksidan ekstrak kapang endofit rimpang kunyit asal Sukabumi secara *in vitro* melalui penghambatan polimerisasi hem dan peredaman radikal bebas.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium yang dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong, Bogor.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah *rotary vacuum evaporator* (*rotavapor*) (Stuart), spektrofotometer uv-vis (Hitachi U-3900H), mikrosentrifus (Hitachi CS150NX), *microplate reader* (Thermo Scientific Multiskan EX), *96-well microplate* (Costar), *cuvette* (Hellma), *laminar air flow*, timbangan analitik (Precisa 240A), *waterbath incubator* (Grant), *magnetic stirrer hotplate* (Thermolyne), sonikator (Branson), *shaker* (Thermolyne).

Bahan yang digunakan ialah 19 isolat kapang endofit dari beberapa rimpang tanaman kunyit asal Sukabumi yang diisolasi menggunakan metode sterilisasi permukaan dan ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kesembilan belas isolat dibedakan menurut karakter makroskopisnya meliputi warna koloni, warna sebalik, pola pertumbuhan, dan karakter miselium sehingga didapatkan kode isolat Smi.Cl.1F – Smi.Cl.19F, hematin (Sigma, from porcine), klorokuin sulfat (Sigma), DPPH (Sigma), asam askorbat (Sigma), asam asetat glasial (Merck, 100%), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, 99%), NaOH (Merck, 99%),

metanol (Merck, for analysis 99%), etil asetat teknis 96%, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Difco), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Difco).

Prosedur kerja

Fermentasi dan ekstraksi kapang endofit

Koloni kapang diremajakan pada media PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Isolat kapang endofit yang telah berumur 7 hari kemudian diambil dengan cara dilubangi dengan pelubang steril berdiameter 6 mm dan diambil sebanyak 2 buah untuk dipindahkan ke dalam 100 mL media fermentasi PDB dalam Erlenmeyer 250 mL. Fermentasi dilakukan di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari pada suhu ruang. Setelah 14 hari, filtrat dan biomassa kapang endofit dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring steril dalam corong Buchner hampa udara. Filtrat kemudian diekstraksi dengan etil asetat sebanyak 3 kali dalam corong pisah dan dipisahkan menggunakan *rotavapor* sampai diperoleh ekstrak kering.

Uji penghambatan polimerisasi hem

Uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* dilakukan mengikuti metode penghambatan polimerisasi hem.¹¹ Sebanyak 100 μ L larutan hematin 1 mM dalam larutan natrium hidroksida 0,2 M dengan seri konsentrasi mulai 250 sampai 3,9 μ M (1:2) dimasukkan ke dalam lubang 96 sumuran dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 405 nm menggunakan *microplate reader* untuk membuat kurva baku hematin. Untuk penapisan awal sampel, sebanyak 100 μ L larutan hematin 1 mM dalam larutan natrium hidroksida 0,2 M dimasukkan dalam tabung mikro 1,5 mL, kemudian ditambahkan 50 μ L bahan uji dengan konsentrasi 8 mg/mL. Untuk memulai reaksi polimerisasi hem, ditambahkan 50 μ L asam asetat glasial dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Untuk isolat terpilih bahan uji dibuat seri konsentrasi 8 mg/mL sampai dengan 0,5 mg/mL (1:2). Sebagai kontrol negatif

adalah akuades dan klorokuin sulfat digunakan sebagai kontrol positif.

Setelah inkubasi berakhir, tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan 200 μ L larutan DMSO sebanyak 4 kali. Pencucian dilakukan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan setelah pencucian kemudian dilarutkan dalam 200 μ L natrium hidroksida 0,1 M. Sebanyak 100 μ L larutan pada penapisan maupun isolat terpilih dimasukkan ke dalam lubang 96 sumuran dan diukur serapannya pada panjang gelombang 405 nm menggunakan *microplate reader*. Persen penghambatan dihitung berdasarkan persamaan (1) dan IC₅₀ (kadar senyawa yang mampu menghambat polimerisasi hem hingga 50%) dihitung menggunakan analisis regresi linier.

$$\% \text{ Penghambatan} = (A-B) / A \times 100 \% \dots (1)$$

Keterangan:

A = kadar hematin kontrol negatif

B = kadar hematin bahan uji

Uji Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas dengan menggunakan senyawa DPPH¹² dengan modifikasi panjang gelombang dari 515 nm menjadi 517 nm. Konsentrasi larutan uji sebesar 100 mg/L untuk skrining awal dan 5, 10, 25, 50, dan 100 mg/L. Asam askorbat (vitamin C) sebagai baku pembandingan sebesar 0,5, 1, 2, 4 dan 8 mg/L, serta DPPH kontrol 0,4 mM. Seluruh sampel larutan uji, kontrol dan asam askorbat (vitamin C) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Serapan seluruh sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan didapatkan dengan menggunakan persamaan (2) dan nilai IC₅₀ yang merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50% diperoleh dengan cara dibuat kurva linear

antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dan % aktivitas antioksidan (sumbu y).

$$\% \text{ Penghambatan} = (A-B) / A \times 100 \% \dots (2)$$

Keterangan:

A = serapan blanko

B = serapan bahan uji

HASIL DAN PEMBAHASAN

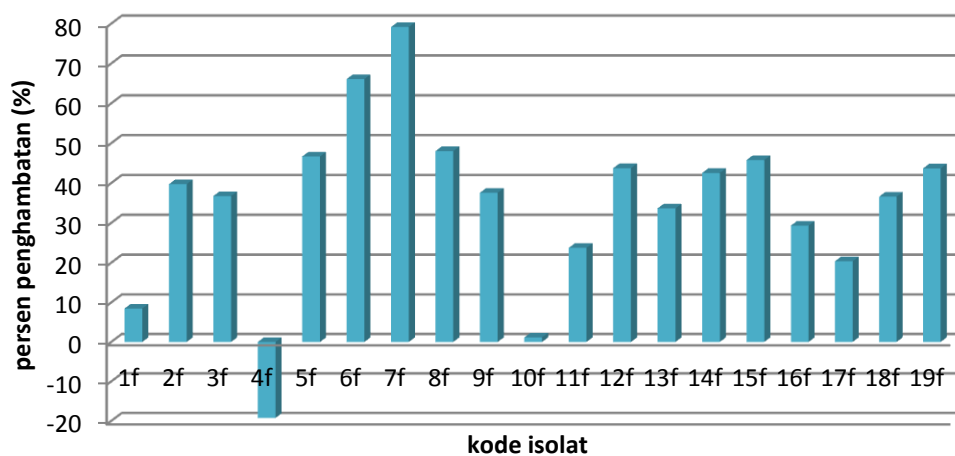
Fermentasi dan ekstraksi kapang endofit

Fermentasi dengan menggunakan metode fermentasi goyang bertujuan agar aerasi dan agitasi dapat terjaga. Aerasi dibutuhkan untuk mensuplai oksigen kapang endofit sedangkan agitasi atau pengadukan bertujuan untuk meningkatkan suplai oksigen dalam medium, meningkatkan homogenitas suhu¹³ serta mempertahankan homogenitas konsentrasi nutrisi.¹⁴ Proses fermentasi dilakukan selama 14 hari dengan tujuan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder optimal. Hal ini dikarenakan pada hari ke-14 merupakan fase stasioner kapang endofit yang digunakan dalam penelitian ini (data tidak ditampilkan). Pemanenan kapang endofit dilakukan pada saat fase pertumbuhan stasioner karena secara umum kapang akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder pada fase pertumbuhan stasioner.¹⁵

Fase yang digunakan untuk ekstraksi ialah hanya fase filtrat saja dan tidak dengan fase miselia atau biomassa kapang endofitnya. Hal ini bertujuan hanya untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder bukan metabolit primernya. Senyawa metabolit sekunder akan dikeluarkan ke dalam media fermentasi, oleh karena itu di dalam filtrat banyak mengandung senyawa metabolit sekunder dibandingkan di dalam miselia atau biomassa kapang endofit.¹⁶ Penggunaan pelarut etil asetat bertujuan agar dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun sedikit non polar karena etil asetat bersifat semipolar. Selain itu etil asetat lebih mudah digunakan karena etil asetat dan media yang berupa air lebih mudah dibedakan untuk dipisahkan.

Uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem

Pengujian antimalaria dilakukan secara *in vitro* dengan metode penghambatan polimerisasi hem. Secara alamiah, parasit akan masuk ke dalam sel darah merah inangnya. Di dalam sel darah merah, parasit *Plasmodium* akan memecah hemoglobin menjadi hem bebas dan asam-asam amino sebagai bahan pembangun sel parasit. Hasil samping berupa hem bebas tersebut bersifat toksik bagi parasit maupun sel inang.²



Gambar 1. Diagram penapisan aktivitas penghambatan polimerisasi hem isolat kapang endofit rimpang kunyit asal Sukabumi pada konsentrasi bahan uji 8 mg/mL.

Untuk menghindari hal tersebut, parasit akan mengubah hem bebas menjadi hemozoin yang tidak toksik atau yang lebih dikenal sebagai pigmen khas malaria melalui proses polimerisasi. Penggunaan bahan hematin pada penelitian ini dikarenakan hematin akan bereaksi menjadi β -hematin yang merupakan senyawa sintesis analog dari senyawa hemozoin.¹¹ Penambahan asam asetat glasial bertujuan untuk menyesuaikan dengan tingkat keasaman vakuola makanan parasit yang berada pada kisaran pH 5, sehingga mendekati keadaan alaminya.¹⁴ Pencucian menggunakan larutan DMSO dimaksudkan untuk menghilangkan sisa-sisa hematin yang masih bercampur dengan kristal β -hematin yang tidak larut dalam larutan pencuci DMSO.¹¹

Hasil uji penapisan 19 ekstrak etil asetat filtrat kapang endofit menunjukkan bahwa 18 isolat memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi hem dan satu isolat menunjukkan hasil negatif yaitu isolat Smi.Cl.4F (Gambar 1). Dari hasil positif isolat Smi.Cl.6F dan Smi.Cl.7F memiliki nilai persen penghambatan di atas 50% pada konsentrasi bahan uji sebesar 8 mg/mL.

Oleh karena itu kedua isolat dilakukan uji lanjutan untuk menentukan konsentrasi yang dapat menghambat 50% (IC_{50}) polimerisasi hem. Pada pengujian lanjutan diketahui bahwa isolat Smi.Cl.6F memiliki nilai IC_{50} lebih rendah dibandingkan dengan Smi.Cl.7F, namun keduanya masih di atas nilai IC_{50} klorokuin sebagai kontrol positif (Tabel 1). Isolat Smi.Cl.4F merupakan satu-satunya isolat yang memberikan hasil negatif pada penghambatan polimerisasi hem. Hal ini dimungkinkan karena isolat tersebut justru menghasilkan senyawa yang menjadi katalisator terbentuknya kristal β -hematin.¹⁷

Pengujian aktivitas antimalaria dengan metode penghambatan polimerisasi hem ini merupakan salah satu metode *in vitro* tanpa menggunakan parasit *Plasmodium*. Metode penghambatan polimerisasi hem merupakan metode yang mudah dan cukup akurat untuk mengetahui kemampuan suatu bahan uji sebagai antimalaria. Mekanisme yang terjadi pada aktivitas penghambatan polimerisasi hem ialah terjadinya interaksi antara senyawa uji dengan sistem elektrolit hem dan atau gugus hidroksil dalam bahan uji yang berikatan dengan ion besi hem.¹¹

Tabel 1. Nilai IC_{50} aktivitas penghambatan polimerisasi hem isolat kapang endofit terpilih

No.	Kode sampel	Konsentrasi (mg/mL)	Penghambatan (%)	IC_{50} (mg/mL)
1	Smi.Cl.6F	8	70,69±0,07	1,93
		4	63,64±0,15	
		2	55,07±0,07	
		1	42,84±0,15	
		0,5	40,60±0,07	
2	Smi.Cl.7F	8	64,73±0,74	3,59
		4	60,71±0,22	
		2	45,98±0,15	
		1	40,65±0,11	
		0,5	39,55±0,15	
3	Klorokuin	1	50,53±0,08	0,63
		0,5	41,72±0,08	
		0,25	33,52±0,08	
		0,125	21,60±0,17	
		0,0625	14,03±0,17	
		0,03125	8,44±0,17	

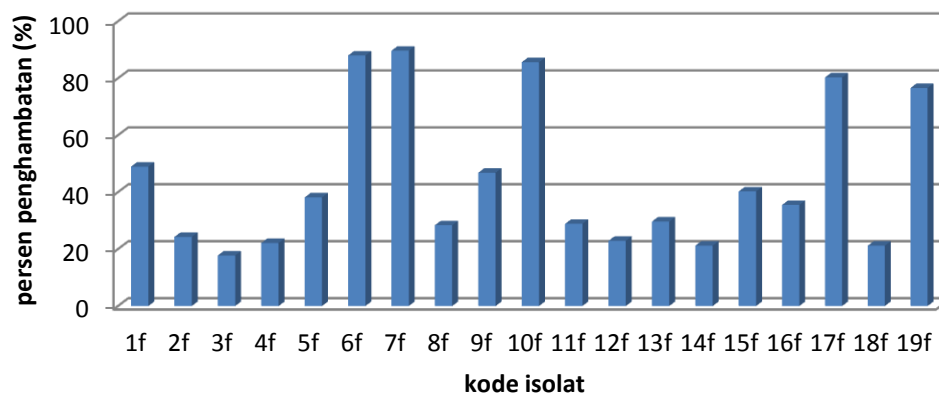
Uji Aktivitas Antioksidan

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa seluruh ekstrak etil asetat filtrat kapang endofit tanaman kunyit memiliki aktivitas antioksidan (Gambar 2). Hasil uji aktivitas antioksidan juga menunjukkan bahwa 5 isolat memiliki penghambatan di atas 50% pada konsentrasi bahan uji sebesar 100 mg/L yaitu Smi.Cl.6F, Smi.Cl.7F, Smi.Cl.10F, Smi.Cl.17F, dan Smi.Cl.19F dan dilanjutkan ke uji lanjutan untuk menentukan konsentrasi yang dapat menghambat 50% (IC₅₀) terbentuknya radikal bebas. Pada pengujian lanjutan diketahui bahwa isolat Smi.Cl.6F memiliki nilai IC₅₀ paling rendah diantara lainnya, sehingga isolat tersebut memiliki aktivitas antioksidan paling kuat (Tabel 2). Kekuatan aktivitas antioksidan dapat dikelompokkan ke dalam kategori sangat aktif, aktif dan tidak aktif jika memiliki IC₅₀<10 mg/L, IC₅₀<100 mg/L, dan IC₅₀>100 mg/L.¹⁸ Secara keseluruhan, aktivitas antioksidan kelima sampel masuk dalam kategori aktif karena memiliki nilai IC₅₀<100 mg/L namun masih sangat jauh dibawah kontrol positif yaitu vitamin C (asam askorbat) yang memiliki nilai IC₅₀ sebesar 3,21 mg/L dengan kategori sangat aktif.

Penggunaan metode peredaman DPPH merupakan metode yang umum digunakan dalam penelitian uji antioksidan. Prinsip kerja metode ini ialah adanya interaksi antioksidan dengan DPPH yang

menyebabkan senyawa DPPH yang berwarna ungu akan dirombak menjadi senyawa α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl yang berwarna kuning.¹⁹ Efek antioksidan dalam metode peredaman radikal bebas DPPH terjadi karena kemampuan suatu senyawa dalam mendonasikan hidrogen.²⁰ Kapang endofit asal tanaman *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, dan *R. sachalinensis* dilaporkan mempunyai kemampuan antioksidan yang baik.²¹

Infeksi malaria erat kaitannya dengan menurunnya sistem imun penderita yang mengakibatkan meningkatnya radikal bebas dalam tubuh. Hal ini dikarenakan infeksi yang terjadi akan menurunkan enzim antioksidan dan agen antioksidan lain yang secara alami dihasilkan oleh tubuh sebagai mekanisme alami tubuh dalam mempertahankan kesetimbangan sel.⁵ Radikal bebas juga berpengaruh kepada penghantaran sinyal tingkat sel dan merupakan pembawa senyawa besi yang diperlukan oleh parasit guna kelangsungan hidupnya di dalam sel inang. Senyawa besi merupakan nutrisi yang sangat penting untuk keberlangsungan hidup dan perbanyakan sel parasit *Plasmodium*. Parasit *Plasmodium* akan mencerna hemoglobin yang akan menghasilkan hem bebas. Hem bebas akan memicu terbentuknya ROS yang berdampak pada patofisiologi malaria.³



Gambar 2. Diagram penapisan aktivitas antioksidan isolat kapang endofit rimpang kunyit asal Sukabumi pada konsentrasi bahan uji 100 mg/L.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan isolat kapang endofit terpilih

No.	Kode sampel	Konsentrasi (mg/mL)	Penghambatan (%)	IC ₅₀ (mg/L)
1	Smi.Cl.6F	5	19,16±0,34	32,28
		10	31,74±0,17	
		25	48,92±0,08	
		50	82,63±0,17	
		100	87,96±0,35	
2	Smi.Cl.7F	5	11,62±0,17	47,18
		10	18,26±0,08	
		25	32,04±0,08	
		50	60,60±0,17	
		100	89,68±0,17	
3	Smi.Cl.10F	5	10,54±0,17	49,95
		10	18,92±0,34	
		25	30,48±0,25	
		50	59,94±0,08	
		100	85,63±0,35	
4	Smi.Cl.17F	5	15,03±0,08	55,77
		10	16,65±0,17	
		25	25,63±0,34	
		50	49,46±0,17	
		100	80,28±0,09	
5	Smi.Cl.19F	5	10,84±0,25	58,39
		10	14,13±0,17	
		25	29,04±0,08	
		50	48,56±0,08	
		100	76,60±0,09	
6	Vit. C	0,5	12,51±0,08	3,21
		1	20,30±0,08	
		2	41,86±0,08	
		4	74,07±0,08	
		8	95,33±0,17	

Oleh karena itu, kemampuan antioksidan untuk mengikat ion besi yang diperlukan oleh parasit akan mempengaruhi ketahanan hidup parasit di dalam sel inang.²² Antioksidan akan bekerja sebagai agen pereduksi yang akan memberikan elektron kepada radikal bebas sehingga radikal bebas akan inaktif atau lebih stabil sebelum menyerang sel lebih lanjut.²⁰

Pada penelitian ini masing-masing kapang endofit memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghambat polimerisasi hem maupun aktivitas antioksidan. Perbedaan kemampuan kapang endofit yang berasal dari satu tanaman yang sama

disebabkan masing-masing endofit dapat menghasilkan senyawa yang berbeda fungsi ataupun fungsi yang sama dengan jumlah yang berbeda disesuaikan dengan peran mereka dalam interaksi dengan tanaman inangnya.²³ Isolat kapang endofit Smi.Cl.6F dan Smi.Cl.7F memiliki aktivitas yang linier antara penghambatan polimerisasi hem dan antioksidan dengan nilai tertinggi di kedua uji dari semua isolat yang diuji. Oleh karena itu kedua isolat tersebut mempunyai potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai sumber obat antimalaria baru yang berasal dari alam.

KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat filtrat kapang endofit Smi.Cl.6F dari rimpang kunyit asal Sukabumi memiliki aktivitas antimalaria dan antioksidan terbaik diantara 19 isolat yang diuji

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia atas dana riset unggulan LIPI tahun 2016 untuk pembiayaan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980-2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012;379(9814):413-31.
2. Ke H, Sigala PA, Miura K, Morrisey JM, Mather MW, Henderson JP, et al. The heme biosynthesis pathway is essential for *Plasmodium falciparum* development in mosquito stage but not in blood stages. *J Biol Chem*. 2014;289(50):34827-37.
3. Gopalakrishnan AM, Kumar N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):317-25.
4. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
5. Percario S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Goncalves ACM, Laurindo PSOC, et al. Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):16346-72.
6. Rico M, Sanchez I, Trujillo C, Perez N. Screening of the antioxidant properties of crude extracts of six selected plant species from the Canary Island (Spain). *J Appl Bot Food Qual*. 2013;86(1):217-20.
7. Yadav M, Yadav A, Yadav JP. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(1):S256-61.
8. Nicoletti R, Fiorentino A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of spermatophyta. *Agriculture*. 2015;5(4):918-70.
9. Kaushik NK, Murali TS, Sahal D, Suryanarayanan TS. A search for antiplasmodial metabolites among fungal endophytes of terrestrial and marine plants of southern India. *Acta Parasitol*. 2014;59(4):745-57.
10. Powthong P, Thongmee A, Suntomthiticharoen P. Antioxidant and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Int J Phytomed*. 2013;5:102-7.
11. Basilio N, Pagani E, Monti D, Olliaro P, Taramelli D. A Microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(1): 55-60.
12. Tiwari V, Shanker R, Srivastava J, Vanker PS. Change in antioxidant activity of spices-turmeric and ginger on heat treatment. *Electron J Environ Agric Food Chem*. 2006;5(2):1313-7.
13. Kumala S, Pratiwi AP. Efek antimikroba dari kapang endofit ranting tanaman biduri. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2014;7(2):111-20.
14. Wahyono, Pudjiono, Widyati P. Uji aktivitas senyawa antiplasmodium dari fungi endofit tanaman *Artemisia annua* L. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2010;21(4):230-5.
15. Basha NS, Ogbaghebriel A, Yemane K, Zenebe M. Isolation and screening of endophytic fungi from Eritrean traditional medicinal plant *Terminalia brownie* leaves for antimicrobial activity. *Int J Green Pharm*. 2012;6(1):40-4.
16. Bustanussalam, Rachman F, Septiana E, Lekatompessy SJR, Widowati T, Sukiman HI, et al. Screening for endophytic fungi from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) of Sukabumi and Cibinong with potency as antioxidant compounds producer. *Pak J Bio Sci*. 2015;18(1):42-5.
17. Purwanto. Isolasi dan identifikasi senyawa penghambat polimerisasi hem dari fungi endofit tanaman *Artemisia annua* L [Master Thesis]. Yogyakarta: Gadjah Mada University; 2011.
18. Çam M, Hışıl Y, Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food chemistry*. 2009; 112(3):721-6.
19. Fitriana WD, Ersam T, Shimizu K,

- Fatmawati S. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indones J Chem*. 2016;16(3):297-301.
20. Babu D, Gurumurthy P, Borra SK, Cherian KM. Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models. *J Med Plant Res*. 2013;7(39):2898-905.
 21. Cui JL, Guo TT, Ren ZX, Zhang NS, Wang ML. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from Alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. *PLoS One*. 2015;10(3): e0118204. Doi: 10.1371/journal.phone. 0118204.
 22. Boampong JN, Karikari AA, Ameyaw EO. In vivo antiplasmodial and in vitro antioxidant properties of stem bark extracts of *Haematostaphis barteri*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5(6):446-50.
 23. Selim S, El Alfy S, Al-Ruwaili M, Abdo A, Al Jaouni S. Susceptibility of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to flavonoid glycosides of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tamar growing in Al Madinah, Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol*. 2012;11(2):416-22.