



Isolation of Secondary Metabolite *Aspergillus niger* “In-Habiting” Queen *Macrotermes gilvus* Hagen’s Nest

Yohannes Alen^{1*}, Atika Melati¹, Gemmy Sarina¹, Akmal Djamaan^{1,2}

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

²Laboratory of Sumatera Biotechnology, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

Submitted 24 Januari 2018; Revised 01 April 2018; Accepted 02 April 2018; Published 27 June 2018

*Corresponding author: yohannesalen@yahoo.co.id

Abstract

Aspergillus niger is pathogen fungi that can inhabit queen termite’s nest *Macrotermes gilvus* Hagen. The aims of the study were to isolate the secondary metabolite of *A. niger*. Extraction process was carried out by maceration, yielding methanol crude extract at 4.32%. Fractination process using ethyl acetate solvent yielded ethyl acetate fraction at 14.39%. Purification of the compounds were done by recrystallization using n-hexane and ethyl acetate. Two secondary metabolite compounds were successfully isolated from ethyl acetate fraction of the methanolic extract. Based on organoleptic examination, the compound signed AM-12-22-01 is 35 mg, white needle crystals, melting point 151-153°C. While, the AM-12-60-01* is 15 mg, white needle crystals, melting point 91-93°C. Based on the chemical analysis, thin layer chromatography, ultraviolet and infrared spectra data, it was identified that AM-12-22-01 and AM-12-60-01 were a phenolic compounds.

Keywords: *Aspergillus niger*, in-habiting, isolation, *Macrotermes gilvus* Hagen.

Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder *Aspergillus niger* “In-Habiting” Sarang Ratu *Macrotermes gilvus* Hagen

Abstrak

Aspergillus niger merupakan jamur patogen yang dapat hidup dengan sarang ratu rayap *Macrotermes gilvus* Hagen. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder *A. niger*. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan menghasilkan ekstrak kental metanol dengan rendemen 4,32%. Fraksinasi dengan menggunakan etil asetat dan menghasilkan fraksi dengan rendemen 14,39%. Pemurnian senyawa dilakukan dengan metode rekristalisasi menggunakan n-heksan dan etil asetat. Dua senyawa metabolit sekunder telah berhasil diisolasi dari fraksi etil asetat ekstrak metanol. Berdasarkan pemeriksaan organoleptis, senyawa dengan notasi AM-12-22-01* memiliki berat 35 mg, berbentuk kristal jarum berwarna putih, dengan jarak leleh 151-153°C. Sementara itu, senyawa AM-12-60-01 memiliki berat 15 mg, berbentuk kristal jarum berwarna putih, dengan jarak leleh 91-93°C. Hasil pemeriksaan kimia, kromatografi lapis tipis, spektroskopi ultraviolet dan inframerah disimpulkan bahwa senyawa AM-12-22-01 dan AM-12-60-01 merupakan golongan fenolik.

Kata kunci: *Aspergillus niger*, in-habiting, isolasi, *Macrotermes gilvus* Hagen.

*notasi AM-12-22-01 adalah kode untuk senyawa murni hasil isolasi: AM merupakan singkatan dari nama salah satu peneliti (Atika Melati); 12 merupakan tahun angkatan peneliti (2012); 22 merupakan halaman buku kerja penelitian; 01 merupakan nomor urut senyawa murni yang dihasilkan pada halaman buku kerja tersebut.

1 Pendahuluan

Di Indonesia, bahan alam yang melimpah ruah membuka peluang besar untuk eksplorasi metabolit sekunder. Metabolit sekunder mempunyai peran penting bagi penghasilnya untuk mempertahankan diri di lingkungan dalam berkompetisi dengan organisme lain¹. Fenomena eksplorasi tumbuhan sebagai penghasil metabolit sekunder yang dilakukan terus menerus dapat menyebabkan terjadi ketidakseimbangan ekosistem. Oleh karena itu, perlu adanya sumber bahan alam lain yang dapat dimanfaatkan. Selain tumbuhan, metabolit sekunder juga dapat dihasilkan oleh hewan dan mikroorganisme, termasuk jamur.

Jamur yang dianggap sebagai mikroba infeksius, diketahui merupakan penghasil senyawa bioaktif, seperti antibiotik, *growth regulatoring*, toksin, mutagenik, immunosupresan, dan efek biologi lainnya^{2,3}. *Aspergillus* merupakan genus jamur dari kelas Ascomycetes dan terdiri dari sejumlah besar spesies yang dapat dieksplorasi untuk menghasilkan senyawa menarik dalam bioteknologi⁴. Salah satu spesies *Aspergillus* yang menarik untuk diteliti adalah *Aspergillus niger*.

Di alam, *A. niger* ditemukan di tanah, tempat kotor, dan tanaman yang membusuk⁶. Selain itu, *A. niger* juga hidup berdampingan dengan berbagai inang dan disebut sebagai jamur "*In-Habiting*". Jamur *A. niger* telah diisolasi dari berbagai sumber, diantaranya dari jaringan kulit batang *Garcinia griffithii* dan alga laut *Colpomenia sinuosa*^{7,8}. Penelitian oleh Alen et al., telah diisolasi jamur *A. niger* dari sarang ratu rayap *Macrotermes gilvus* Hagen⁹.

M. gilvus Hagen. adalah rayap pembuat gundukan tanah yang tersebar di daerah Asia Tenggara, dari Malaysia dan Indo-Cina hingga Indonesia (Sumatra, Jawa, Kalimantan, dll) dan Filipina¹⁰. Rayap jenis ini memiliki habitat alami di kawasan hutan alam dengan pengaruh suhu, kelembaban, dan curah hujannya relatif stabil¹¹.

Baru-baru ini, penelitian mengenai rayap dan sarangnya banyak menarik perhatian peneliti produk alam karena mengandung senyawa-senyawa aktif. Isolat

isi perut *Macrotermes mischaelseni* mampu menghasilkan senyawa yang memperlihatkan aktivitas antibiotika terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *C. freundii*¹². Rayap hidup dan berkembang biak di dalam sarang kokoh yang dibangun oleh rayap kasta pekerja dengan cara membawa butir-butir tanah dengan mulutnya¹¹. Kelenjar saliva dari rayap kasta pekerja ini secara otomatis berfungsi sebagai perekat sekaligus media bagi pertumbuhan jamur. Cairan liur di dalam sarang *M. gilvus* Hagen., adalah campuran hasil sekresi yang berasal dari kelenjar submaksilaris, sublingualis, parotis, dan kelenjar pipi (*buccalis*)¹³. Sementara itu, analisis *proximate* sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen. diketahui terdiri dari protein tinggi 1,39 %, lemak 1,77 %, kadar abu 87,09 %, kadar Ca 0,411 %, dan kadar P 0,147 %^{14,15}.

Salah satu jenis rayap yang mempunyai potensi untuk diteliti ialah *M. gilvus* Hagen. Dari penelitian PKM-P 2014/ 2015 yang dibiayai DIKTI telah berhasil dianalisis kandungan metabolit primer, baik dari ratu maupun sarang rayap *M. gilvus* Hagen. Potensi ratu rayap *M. gilvus* Hagen. telah diteliti dan diketahui memiliki kemampuan sebagai obat luka bakar dan menghasilkan omega 9 yang dibutuhkan oleh tubuh, antihiperlipidemia, dan immunomodulator. Lebih lanjut lagi, telah berhasil menapis empat jamur "*In-Habiting*" sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen., yaitu *Aspergillus flavus*, *Mucor* sp., *A. niger*, dan *Cladosporium* sp.^{16,17,18,19,20}.

Dari hasil analisis kromatografi lapis tipis, ditemukan pola bercak menarik dari ekstrak metanol jamur *A. niger* "*In-Habiting*" sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen., dimana terdapat berbagai metabolit sekunder dengan pola-pola bercak yang cukup terpisah. Dari perbandingan hasil kromatografi lapis tipis, ditemukan pola-pola bercak berbeda yang terdapat pada empat ekstrak metanol jamur yang bersimbiosis, sehingga diketahui bahwa kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan berbeda. Berdasarkan penelitian tersebut, peneliti ingin mengisolasi senyawa metabolit sekunder jamur *A. niger* "*In-Habiting*" sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen^{14,15}.

2 Metode

2.1. Alat

Magnetic stirrer (Iwaki®), *rotary evaporator* (Buchi®), maserator, timbangan analitik, lemari pengering (oven) (Memert®), corong pisah, kolom kromatografi, bejana Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (chamber), plat KLT GF254 nm, lampu UV254 nm dan UV366 nm, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), FT-IR (Perkin Elmer®), *Melting point apparatus* (Stuart Scientific®), termometer, dan peralatan laboratorium yang lazim.

2.2. Bahan

Isolat jamur *A. niger* "In-Habiting" sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen., Saboraud Dextrose Agar (SDA) (Merck, Jerman), akuades, etanol (Merck, Jerman), etil asetat (Merck, Jerman), n-heksan (Merck, Jerman), metanol (Merck, Jerman), natrium sulfat anhidrat, FeCl₃, vanilin, asam sulfat pekat, pereaksi Dragendorff, silika Wakogel PF 60.

2.3. Prosedur

2.3.1. Pemiakan Jamur Uji

Isolat jamur *A. niger* dibiakkan dengan cara menggoreskan satu Ose isolat yang diambil dari stok murni pada permukaan media SDA di dalam cawan petri, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama tiga minggu.

2.3.2. Maserasi Jamur *A. niger*

Biakan jamur *A. niger* diekstraksi dengan cara memasukkan pelarut metanol ke dalam cawan petri, diaduk perlahan supaya medium agar tidak terbawa dan dipindahkan ke dalam maserator. Hal ini dilakukan hingga spora dan hifa jamur relatif sempurna terpisahkan. Biakan *A. niger* dimaserasi menggunakan pelarut metanol selama 3x5 hari. Maserat metanol diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* sampai kental sehingga didapatkan ekstrak kental metanol jamur.

2.3.3. Fraksinasi

Ekstrak kental metanol dari jamur *A. niger* dilarutkan dengan *aquadest*. Dilakukan fraksinasi di dalam corong pisah dengan menggunakan etil asetat dan diulang beberapa kali hingga larutan terlihat jernih. Fraksi etil

asetat diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental etil asetat.

2.3.4. Kromatografi dan Pemurnian

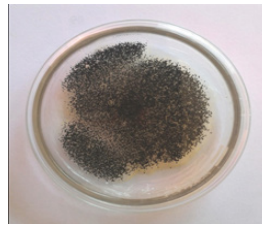
Fraksi kental etil asetat dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Sampel direabsorpsi dengan cara melarutkan sampel dengan sedikit etil asetat, kemudian ditambahkan silika gel hingga larutan sampel diserap oleh silika, lalu di vakum hingga terbentuk serbuk silika. Selanjutnya dilakukan kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksan, etil asetat, dan metanol, dengan perbandingan yang selalu ditingkatkan secara bertahap (Step Gradient Polarity / SGP). Eluen ditampung dalam vial @ 5 mL, masing-masing fraksi di-KLT, spot noda yang mempunyai nilai R_f yang sama digabung. Subfraksi dimurnikan kembali menggunakan etil asetat sehingga didapatkan pola noda tunggal sehingga diperoleh senyawa murni.

2.3.5. Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Identifikasi dan karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan fisika, kimia, dan fisikokimia. Pemeriksaan fisika meliputi pemeriksaan organoleptis, pemeriksaan kelarutan, dan penentuan jarak leleh menggunakan *melting point apparatus*. Pemeriksaan kimia meliputi penentuan golongan senyawa, pemeriksaan KLT, dan pemeriksaan kemurnian dengan penampak noda lampu UV 250 nm dan UV 365 nm. Sementara itu, pemeriksaan sifat fisikokimia meliputi penentuan panjang gelombang maksimum melalui pengukuran spektrum ultraviolet dan penentuan gugus fungsi melalui spektrum inframerah.

3 Hasil

Hasil kultivasi jamur *A. niger* dapat dilihat pada Gambar 1. Terhadap senyawa murni hasil isolasi dilakukan karakterisasi dengan pemeriksaan fisika, kimia, KLT dan spektrofotometri UV-Vis dan IR. Hasil pemeriksaan fisika, kimia, dan KLT senyawa murni hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 1. Pemeriksaan spektrum UV-Vis dan spektrum IR ditunjukkan pada Gambar 2, 3, 4, dan 5.



Gambar 1. Koloni jamur *Aspergillus niger* “*In-Habiting*” sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen.

4 Pembahasan

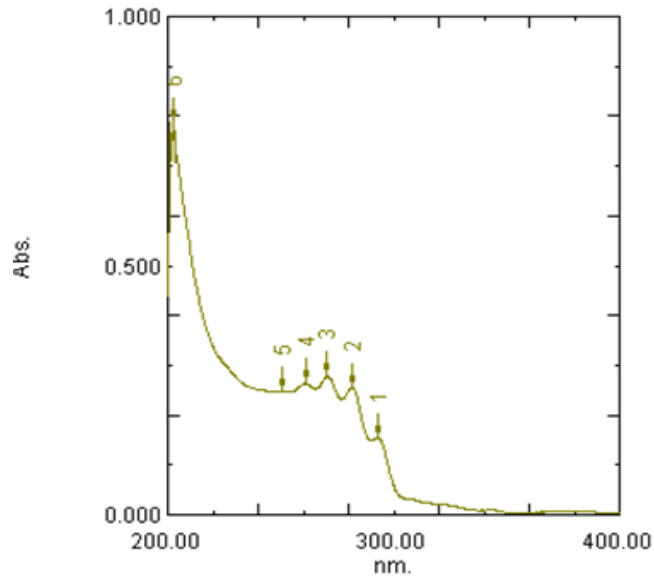
Pemeriksaan pendahuluan potensi ekstrak jamur *A. niger* “*In-Habiting*” sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen. dilakukan terhadap beberapa mikroba uji. Dari penelitian tersebut, didapatkan ekstrak metanol yang aktif menghambat bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada konsentrasi 10.000 ppm²³. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, selanjutnya dilakukan isolasi metabolit sekunder dari ekstrak metanol jamur *A. niger* “*In-Habiting*” sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen.

Sampel jamur dikoleksi dari perkebunan kelapa sawit Silaut, Pesisir Selatan, Sumatera

Barat. Proses isolasi senyawa murni dimulai dengan pembuatan starter kultur untuk kultivasi jamur di dalam media padat yaitu SDA, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 3 minggu. Pembuatan starter kultur ini bertujuan untuk memperoleh spora yang masih muda untuk menghasilkan senyawa metabolit yang lebih baik, sehingga pada tahap ini diharapkan memperoleh jamur dengan metabolit yang aktif²¹. Dari proses pembiakan jamur, koloni jamur *A. niger* menunjukkan adanya hifa berwarna abu-abu dan spora berwarna hitam (Gambar 1). Selanjutnya proses kultivasi 168 petri *A. niger* dihasilkan jamur sebanyak 468,72 g.

Tabel 1. Pemeriksaan fisika, kimia, dan kromatografi lapis tipis (KLT) senyawa murni hasil isolasi

No	Karakterisasi	AM-12-22-01	AM-12-60-01
1	Pemeriksaan fisika	Organoleptis	Kristal jarum warna putih, tidak berbau
		Kelarutan	Larut dalam EtOAc dan CHCl ₃ , sukar larut dalam n-heksan & metanol
	Jarak leleh	151-153°C	91-93°C
	Dragendorff	-	-
2	Pemeriksaan kimia	FeCl ₃	biru kehitaman
		Sitoborat	-
		Vanilin asam sulfat	-
3	Pemeriksaan KLT	n-heksan:EtOAc 8:2 Rf 0,45	n-heksan:EtOAc 7:3 Rf 0,45

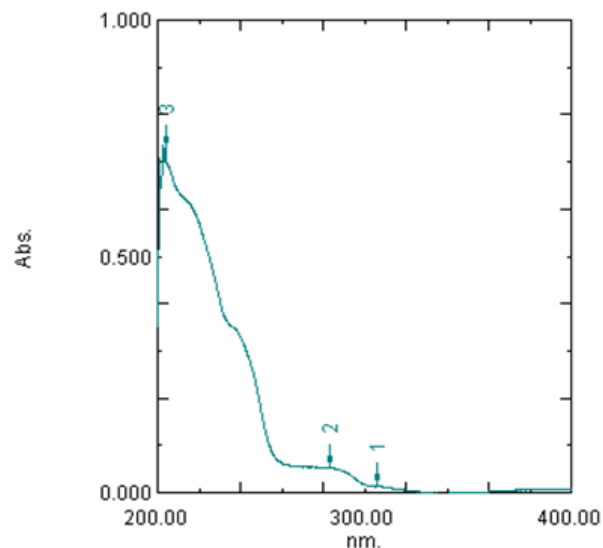


Gambar 2. Spektrum UV-Vis senyawa AM-12-22-01

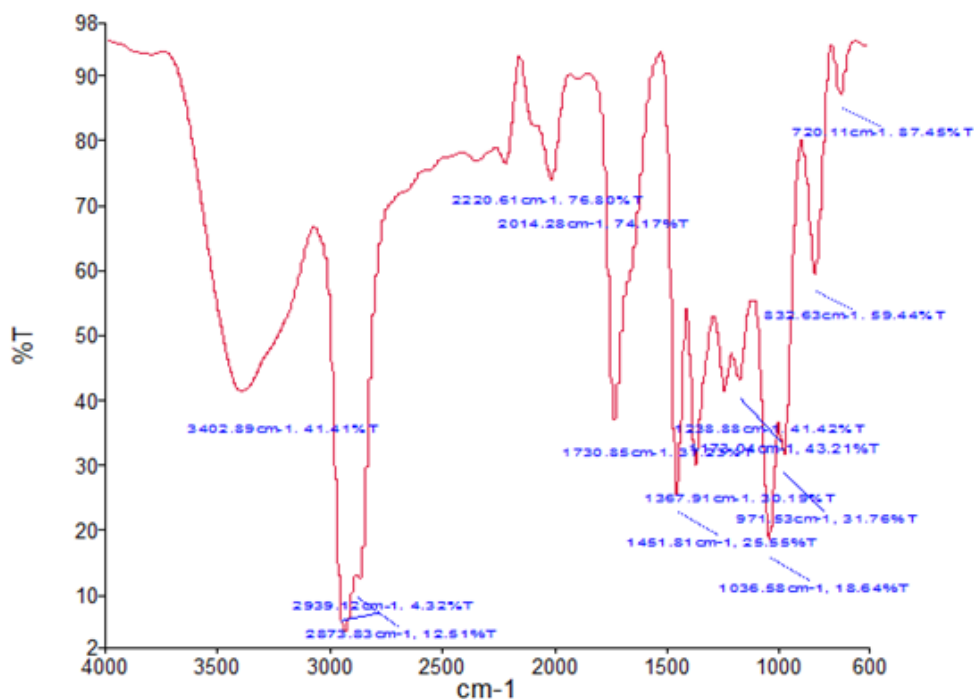
Setelah dilakukan ekstraksi jamur dari media pertumbuhan SDA, selanjutnya dilakukan ekstraksi senyawa metabolit sekunder dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Pemilihan metode maserasi dalam ekstraksi ini dikarenakan teknik pengerjaan dan alat-alat yang digunakan lebih sederhana serta dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa termolabil²². Dari proses ekstraksi, diperoleh ekstrak kental metanol sebanyak 20,2943 g (rendemen ekstrak 4,32% dari berat sampel).

Selanjutnya ekstrak kental tersebut dilakukan pemeriksaan kromatografi lapis

tipis (KLT) untuk melihat pemisahan bercak dan tingkatan kepolaran senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Hasil KLT ekstrak metanol menggunakan eluen etil asetat : metanol (9:1) dan pendeteksian bercak di bawah sinar UV254nm, menunjukkan bahwa terdapat bercak atau spot pada ukuran Rf 0,52; 0,68; 0,78; dan 0,84; serta kelompok senyawa yang masih belum terpisah sempurna pada ukuran Rf 0-0,16. Berdasarkan pemeriksaan tersebut, terlihat empat bercak atau spot yang cukup terpisah yang selanjutnya senyawa akan dilanjutkan untuk proses fraksinasi.



Gambar 3. Spektrum UV-Vis senyawa AM-12-60-01



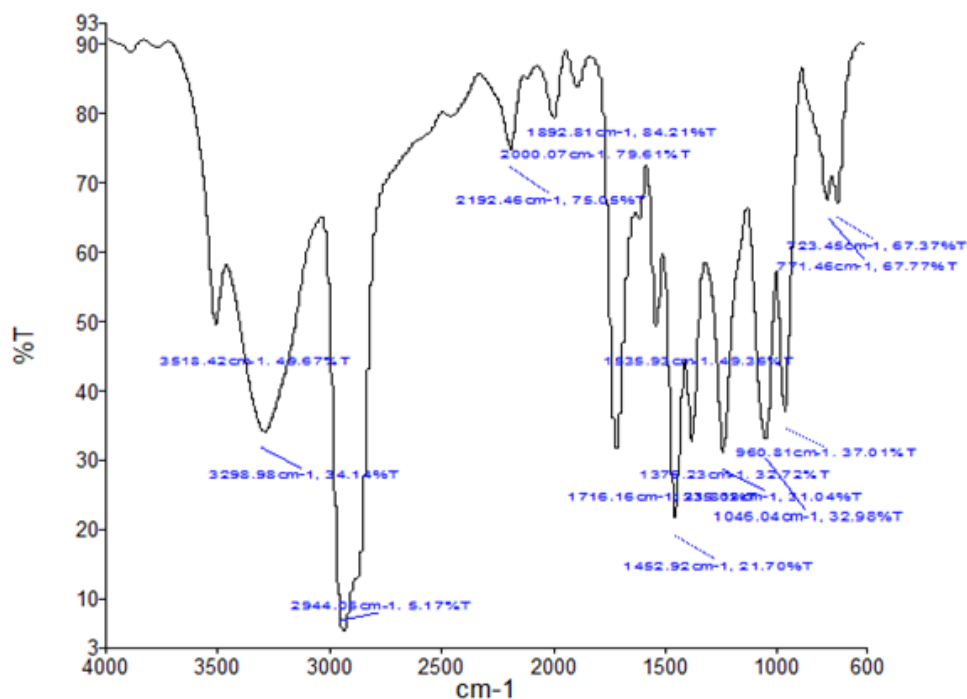
Gambar 4. Spektrum inframerah senyawa AM-12-22-01

Ekstrak kental metanol difraksinasi dengan etil asetat menggunakan corong pisah. Berdasarkan hasil fraksinasi, didapatkan fraksi etil asetat sebanyak 2,92 g (rendemen fraksi 14,39% dari berat ekstrak). Dari hasil pengamatan penyebaran noda dengan metode kromatografi lapis tipis, fraksi etil asetat memperlihatkan pemisahan noda yang sederhana dan jelas dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (6:4), yang selanjutnya digunakan sebagai eluen untuk proses pemisahan senyawa. Proses pemisahan dilakukan menggunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan yang selalu ditingkatkan secara bertahap atau *Step Gradient Polarity* (SGP).

Dari proses isolasi senyawa metabolit sekunder dari *A. niger* "In-Habiting" sarang ratu rayap *M. gilvus* Hagen., diperoleh dua senyawa murni, yaitu senyawa dengan notasi AM-12-22-01 dengan berat 35 mg (rendemen 1,19 % dari fraksi etil asetat) dan AM-12-60-01 seberat 15 mg (rendemen 0,51 % dari fraksi etil asetat). Senyawa AM-12-22-01 memberikan Rf 0,45 dengan eluen n-heksana : etil asetat (8:2), sedangkan senyawa AM-12-60-01 memberikan nilai Rf 0,45 dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3).

Pemeriksaan fisika senyawa hasil isolasi terdiri dari pemeriksaan organoleptis, kelarutan, dan jarak leleh. Secara organoleptis, senyawa AM-12-22-01 berbentuk kristal jarum, berwarna putih, dan tidak berbau dengan jarak leleh 151-153°C. Senyawa ini mudah larut dalam etil asetat dan kloroform, sukar larut dalam n-heksana dan metanol. Sementara itu, senyawa AM-12-60-01 berbentuk kristal jarum, berwarna putih, dan tidak berbau dengan jarak leleh 91-93°C. Senyawa ini mudah larut dalam etil asetat dan kloroform, sukar larut dalam metanol dan sukar larut dalam n-heksana. Kedua senyawa ini relatif murni karena menunjukkan jarak leleh yang sempit.

Pemeriksaan kimia yang dilakukan menggunakan penampak noda. Dari hasil pemeriksaan, senyawa AM-12-22-01 dan AM-12-60-01 menghasilkan warna biru kehitaman setelah direaksikan dengan FeCl₃. Berdasarkan hal tersebut, kedua senyawa hasil isolasi ini merupakan termasuk golongan fenolik. Kemurnian senyawa ditegaskan dengan *Multiple Developing System*, yang tetap menunjukkan pola KLT satu noda setelah dilakukan KLT berulang pada satu plat tersebut.



Gambar 5. Spektrum inframerah senyawa AM-12-22-01

Dari hasil analisis data spektrofotometer Ultraviolet-visible (UV-Vis) senyawa AM-12-22-01 memperlihatkan adanya serapan pada panjang gelombang 292,80 nm (Abs: 0,153); 261,60 nm (Abs: 0,256); 270,60 nm (Abs: 0,277); 261,00 nm (Abs: 0,264); 250,80 nm (Abs: 0,249); dan 202,20 (Abs: 0,788), hasil ditunjukkan pada Gambar 2. Sedangkan, untuk senyawa AM-12-60-01 pada panjang gelombang 306,40 nm (Abs: 0,013); 283,00 nm (Abs: 0,053); dan 203,80 nm (Abs: 0,729), hasil ditunjukkan pada Gambar 3. Berdasarkan spektrum UV-VIS kedua senyawa menunjukkan adanya transisi dari π ke π^* dari ikatan rangkap terkonjugasi yang lazimnya adalah cincin aromatis, karena sistem konjugasi menyerap cahaya pada panjang gelombang 200-400 nm dan kenaikan intensitas yang besar. Adanya sistem aromatis ini didukung oleh hasil analisis spektrofotometer IR dimana hasil analisis data spektrofotometer IR senyawa AM-12-22-01 menunjukkan adanya gugus hidroksi (OH) diindikasikan dengan pita serapan pada bilangan gelombang 3402,89; serapan pada bilangan gelombang 2939,12 dan 2873,83 menunjukkan adanya gugus metilen (regang -C-H); 1730,85 (regang

C=O); 1451,81 (regang cincin C=C) dan 832,63 (C-H bending) cm⁻¹ (Gambar 4), serta senyawa AM-12-60-01 pada bilangan gelombang 3298,98 (regang O-H); 2944,05 (regang -C-H); 1892,81 dan 1716,16 (regang C=O); 1535,93 dan 1452,92 (regang cincin C=C); dan 771,46 (C-H bending) cm⁻¹ (ditunjukkan pada Gambar 5).

Dari hasil penelusuran literatur, belum ditemukan adanya senyawa yang memiliki karakteristik yang sama dengan menggunakan pelarut yang sama dengan kedua senyawa tersebut. Hal ini membutuhkan penelitian selanjutnya untuk melihat elusidasi kimia kedua senyawa tersebut.

5 Kesimpulan

Penelitian dapat disimpulkan bahwa diperoleh dua senyawa metabolit sekunder *A. niger* simbiotik sarang ratu *M. gilvus* Hagen., yaitu senyawa AM-12-22-01 seberat 35 mg (rendemen 1,19 % dari fraksi etil asetat) dan AM-12-60-01 seberat 15 mg (rendemen 0,51 % dari fraksi etil asetat). Selanjutnya dari data pemeriksaan golongan kimia utama, senyawa AM-12-22-01 dan AM-12-60-01 diduga merupakan golongan fenolik.

6 Ucapan Terima Kasih

Artikel ini merupakan bagian dari penelitian skripsi sarjana farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang telah dipresentasikan dalam Seminar Nasional dan Workshop Perkembangan Terkini Sains dan Farmasi Klinik 6. Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemenristekdikti) dalam bentuk dana hibah penelitian Program Kreativitas Mahasiswa bidang Penelitian (PKM-P). Penulis mengucapkan terima kasih pada semua pihak yang turut membantu, mendukung, memberikan kritik dan saran yang membangun, bimbingan dan arahan.

Daftar Pustaka

1. Fox EM, Howlett BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr opin microbiol.* 2008;11(6):481-7.
2. Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(12):937-47.
3. Pelaez FE. Biological activities of fungal metabolites. *Handbook of industrial mycology.* New York: Marcel dekker; 2004 Aug 30:49-92.
4. Yager LN, Bennet J, Klich MA. *Aspergillus: biology and industrial applications.* Aspergillus biology and industrial applications. 1992.
5. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., & Oorschot, C.A.N. *Introduction to food borne fungi.* Netherland: Centra albureau for schimmcl cultures; 1996.
6. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck P. On the safety of *A. niger*—a review. *Appl microbiol biotechnol* 2002;59(4-5):426-35.
7. Elfita E, Muharni M, Munawar M, Aryani S. Secondary Metabolite from Endophytic Fungi *A. niger* of The Stem Bark of Kandis Gajah (*Garcinia Griffithii*). *Indones J Chem.* 2012;12(2):195-200.
8. Zhang Y, Li XM, Wang BG. Nigerasperones A~ C, New Monomeric and Dimeric Naphtho- γ -pyrones from a Marine Alga-derived Endophytic Fungus *A. niger* EN-13. *Journal antibiot.* 2007;60(3):204-10.
9. Alen, Y., Sari, M.P., & Putra, D.P. Penapisan jamur dari sarang anai-anai (*M. gilvus* Hagen.) dan uji aktivitas anti-jamur. Abstrak paper dan prosiding seminar nasional dan workshop perkembangan terkini sains farmasi dan klinik V. Padang; 6-7 November 2015a.
10. Roonwal ML, Chhotani OB. The termite *M. gilvus malayanus* (Haviland) (Termitidae) in Burma. *In Proc Nat Inst Sci India* 1961 (Vol. 27, No. 308, p. e16).
11. Subekti, Niken., D. Duryadi, D. Nandika, S. Surjokusumo, dan S. Anwar. Distribution and Morphology Characteristic of *M. gilvus* Hagen. in The Natural Habitat. *Jurnal Ilmu Dan Teknologihasil Hutan.* 2008; 1(1): 27-33.
12. Ayitso AS, Onyango DM, Wagai SO. Antimicrobial Activities of Microorganisms Obtained from the gut of *Macrotermes michaelseni* in Maseno, Kenya. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* Vol. 2015;3(06):048-52.
13. Lommelen E, Schoeters E, Billen J. Ultrastructure of the labial gland in the ant *Pachycondyla obscuricornis* (Hymenoptera, Formicidae). *Netherlands journal of zoology.* 2002;52(1):61-8.
14. Alen, Y., Okta, F.N., Rusdian, R., Agresa, F.L., Marcelina, S., & Fitri, A.M. Analisis metabolit primer sarang ratu anai-anai *M. gilvus* Hagen. dari kebun sawit mukomuko bengkulu. Abstrak paper dan prosiding seminar nasional dan workshop perkembangan terkini sains farmasi dan klinik V; 6-7 November 2015b; Padang, Indonesia. Indonesia: Padang; 2015.
15. Alen Y, Lakmi NS, Orindia S, Harrizul R. Analysis of amino acids levels of freeze-dried termite queen *M. gilvus* Hagen., *Int J Ind Herbs Drugs,* 2017; 2; 1-5.
16. Alen Y, Lakmi NS, Orindia S, Agus S, Ayu L, Fuji Y, Febriyenti. Isolasi (Penetapan Kadar) Metabolit Primer Ratu Rayap (*M. gilvus* Hagen.) dan Potensi Sebagai Obat Luka Bakar. Abstrak paper dan prosiding seminar nasional dan workshop perkembangan terkini sains farmasi dan

- klinik V; 6-7 November 2015b; Padang, Indonesia. Indonesia: Padang; 2015.
17. Alen, Y., Suci, L.N., Suarmin, O., Suhatri, Larassati, A., Suparman, A., & Yeni, Y.F. Primary metabolites analysis of termite queen (*M. gilvus* Hagen.) and burn healing assay. Paper abstract the international conference on advancing the life sciences and public health awareness. Nagoya, Jepang. 10-11 Juli 2016a.
 18. Alen Y, Orindia S, Lakmi NS, Harrizul R. Analysis of Fatty Acids levels of Freeze-dried termite queen *M. gilvus* Hagen using gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*. 2017; 2(4): 1-4.
 19. Alen, Y., Suarmin, O., Suci, L.N., Kurniawan, R., Yasardi, F., & Ramadhani, V. Analysis levels of fatty acids from freeze-dried termite queen *M. gilvus* Hagen., using gc-ms and anti-hyperlipidemia test. Paper abstract the international conference on advancing the life sciences and public health awareness. Nagoya, Jepang. 10-11 Juli 2016b.
 20. Alen, Y., Rahmawati, R., Aldi, Y., Nitoda, T., Baba, N., & Nakajima, S. Immunomodulatory activity of freeze dried termite queen *M. gilvus* Hagen. Paper abstract the international conference on advancing the life sciences and public health awareness. Nagoya, Jepang. 10-11 Juli 2016c.
 21. Wuryanti. Pengaruh Penambahan Biotin Pada Media Pertumbuhan Terhadap Produksi Sel *A. niger*. *Bioma*. 2008; 10(2): 46-50
 22. Bassets, J., R.C. Denny, G.H. Jeffrey, dan J. Mendham. Buku Ajar Vogel : Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik. Terjemahan oleh A. Hadyana P. dan Ir. L. Setiono. Jakarta: EGC; 1994.
 23. Alen, Y., M.P. Sari, dan D.P. Putra. Penapisan Jamur dari Sarang Anai-Anai (*Macrotermes gilvus* Hagen.) dan Uji Aktivitas Anti-Jamur. Abstrak paper dan prosiding seminar nasional dan workshop perkembangan terkini sains farmasi dan klinik V; 6-7 November 2015b; Padang, Indonesia. Indonesia: Padang; 2015.
 24. Dachriyanus. Analisis struktur senyawa organik secara spektrofotometri. Padang: Andalas university press; 2004.