

Optimasi Produksi Hydroxy Octadecadienoic Acid (HODE) dari Kapang Endofit *Culvularia lunata* BioMCC FE-00283 dengan Metode Respon Permukaan

(Optimization of Hydroxy Octadecadienoic Acid (HODE) Production by *Culvularia lunata* BioMCC FE-00283 Using Response Surface Methodology)

ERWAHYUNI ENDANG PRABANDARI^{1,2*}, TUN TEDJA IRAWADI¹, WAHONO SUMARYONO³, KHASWAR SYAMSU¹

¹Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Sekolah Pascasarjana IPB, Darmaga, Bogor

²Balai Pengkajian Bioteknologi-BPPT, Gedung 630, Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang

³Kedeputian Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi-BPPT, Jl. MH Thamrin No 10, Jakarta

Diterima 10 Februari 2011, Disetujui 8 Maret 2011

Abstrak: *Hydroxy octadecadienoic acid* (HODE) adalah salah satu senyawa asam lemak alifatik teroksidasi golongan oksilipin yang bersifat bioaktif dan dapat dihasilkan oleh kapang endofit *Curvularia lunata* BioMCC FE-00283 dengan fermentasi kultur terendam. Glukosa, monosodium glutamat dan minyak jagung adalah komponen media yang mempunyai pengaruh signifikan terhadap produksi HODE oleh *C. lunata* BioMCC FE-00283. Optimasi komposisi ketiga komponen media tersebut dilakukan dengan menggunakan metode respons permukaan (*response surface methodology*/RSM). Rancangan percobaan *central composite design* (CCD) digunakan untuk menjelaskan pengaruh interaksi antar komponen medium terhadap produksi HODE. Produksi HODE maksimum yang diprediksi melalui model kuadratik mempunyai luas kromatogram 4540000 yang secara eksperimental diverifikasi mempunyai luas kromatogram 1091338 ± 152489 . Meskipun verifikasi eksperimen menunjukkan hasil lebih rendah dari prediksi melalui model, akan tetapi hasil verifikasi lebih tinggi dibandingkan produksi menggunakan media basal dengan variasi proporsi sumber karbon, nitrogen, dan *inducer* belum dioptimasi yang menghasilkan luas kromatogram HODE 295045 ± 71200 . Hasil verifikasi menunjukkan komposisi media yang optimum dapat meningkatkan produksi HODE 3.7 kali lipat dibandingkan dengan media basalnya.

Kata kunci: optimasi, RSM, hydroxooctadecadienoic acid, kapang endofit, *Curvularia lunata*.

Abstrak: Hydroxyl octadecadienoic acid (HODE) is an oxidized aliphatic fatty acid from the oxylipins group, which shows bioactivity and can be produced by *Curvularia lunata* BioMCC FE-00283 by submerged fermentation. Glucose, monosodium glutamate, and corn oil were media components that showed significant effect toward HODE production by *C. lunata* BioMCC FE-00283. Composition optimization of these three medium components was carried out by Response surface methodology (RSM). A full factorial central composite design (CCD) was used to explain the interaction effect between media components. Maximum HODE production as predicted by the quadratic model have chromatogram area of 4540000, which was verified experimentally to be 1091338 ± 152489 . Eventhough experimental verification showed lower result compared to the model prediction, however it was higher compared to the HODE production using basal media with unoptimized composition of carbon, nitrogen, and inducer which only have chromatogram area of 295045 ± 71200 . The verification also showed that optimization increased HODE production by 3.7 fold compared to that produced by the unoptimized media.

Keywords: optimization, RSM, hydroxy octadecadienoic acid, endophytic fungi, *Culvularia lunata*.

* Penulis korespondensi, Hp. 08161382006
e-mail: nuni_28@yahoo.com

PENDAHULUAN

HYDROXY octadecadienoic acid (HODE) adalah kelompok hidroksi asam lemak, atau yang dikenal luas dengan sebutan oksilipin. HODE yang mempunyai 18 karbon, 2 ikatan rangkap dan 1 gugus hidroksi, adalah salah satu oksilipin yang bersifat bioaktif. HODE yang dihasilkan oleh Basidiomisetes *Gomphus floccosus* dilaporkan mampu menghambat patogen tanaman⁽¹⁾. Senyawa 13-HODE yang diisolasi dari hepatoma tikus dilaporkan mampu menghambat proliferasi sel kanker⁽²⁾. Mundt *et al.*,⁽³⁾ melaporkan bahwa senyawa 13-HODE yang dihasilkan oleh *Oscillatoria redekei* HUB 051 mampu menghambat bakteri Gram positif *Bacillus subtilis* SBUG 14, *Micrococcus flavus* SBUG 16 dan *Staphylococcus aureus* SBUG 11.

HODE dapat dihasilkan oleh makro fungi^(1,4), mikro fungi⁽⁵⁾ sianobakteria⁽³⁾. HODE juga dapat diproduksi dengan biokonversi mikroba, enzimatis atau kimia^(6,7).

Komposisi media merupakan faktor yang kritis dalam proses fermentasi, karena komposisi media mempunyai pengaruh terhadap konsentrasi produk yang dihasilkan. Penentuan komposisi media bukan hal yang mudah karena melibatkan metabolisme yang sangat terpengaruh oleh komponen yang menyusun media⁽⁸⁾. Metode respons permukaan adalah salah satu metode yang efisien sehingga banyak digunakan untuk optimasi dalam proses fermentasi, baik untuk komposisi media^(9,10,11), maupun kondisi proses^(12,13,14). Metode ini banyak dipilih karena dapat menjelaskan interaksi yang muncul antar peubah dan dapat memberikan respons secara simultan dalam waktu yang bersamaan.

Terdapat beberapa rancangan percobaan yang dapat digunakan untuk dapat melakukan optimasi dengan metode respons permukaan. *Central composite design* (CCD) merupakan salah satu rancangan percobaan yang dapat digunakan untuk optimasi dengan metode respons permukaan⁽¹⁵⁾. *Central composite design* diperkenalkan oleh Box dan Wilson pada tahun 1951 yang terdiri dari rancangan faktorial tingkat dua dengan dua level (tertinggi dan terendah) ditambah dengan beberapa titik yang memungkinkan untuk meramalkan adanya efek interaksi antar faktor yang dicoba. Kelompok titik tambahan yang pertama disebut starting point yang merupakan matriks bujur sangkar yang diagonal utamanya bernilai $\pm 2^{k/4}$, dimana k adalah jumlah faktor yang dioptimasi. Sementara, kelompok titik tambahan kedua disebut center point yang merupakan kombinasi dari semua titik tengah faktor yang akan dioptimasi⁽¹⁶⁾.

Dalam tulisan ini dilaporkan hasil optimasi komposisi glukosa, monosodium glutamat (MSG) dan minyak jagung dalam media fermentasi *Curvularia lunata* untuk menghasilkan HODE. Data percobaan diperoleh dari fermentasi pada skala kultur kocok yang

dirancang dengan rancangann CCD, sementara optimasi komposisi media akan dilakukan metode respons permukaan. Optimasi dilakukan untuk mendapatkan komposisi yang dapat menghasilkan HODE tertinggi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Kapang, Kapang *Curvularia lunata* BioMCC FE-00283 adalah koleksi dari Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT. Kapang diisolasi dari tanaman obat *Cibotium barometz* yang diambil dari Lombok Timur Nusa Tenggara Barat, dan diisolasi dengan metode sterilisasi permukaan mengikuti metode Tomita⁽¹⁷⁾. Kapang yang sudah murni dan diidentifikasi kemudian disimpan dalam gliserol 20% pada suhu -80 °C. Kapang diidentifikasi secara morfologi dengan menggunakan mikroskop Olympus CX 51. Morfologi yang diamati dibandingkan dengan definisi morfologi dalam *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*⁽¹⁸⁾.

Media fermentasi. Media fermentasi terdiri dari medium basal dan medium untuk optimasi. Medium basal merupakan modifikasi dari medium *potato dextrose yeast extract* (PDY) yang mengandung glukosa (10 g/L), MSG (4 g/L), minyak jagung (5 g/L) dan ekstrak kentang (200 g/L). Medium optimasi terdiri dari ekstrak kentang (200 g/L), glukosa, monosodium glutamate dan minyak jagung sesuai dengan rancangan CCD.

METODE. Fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dalam 2 tahap, yaitu vegetasi dan fermentasi. Pada tahap vegetasi 1 potong kultur jamur dalam media *potato dextrose agar* (PDA) diinokulasikan kedalam labu Erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 mL media *potato dextrose yeast extract* (PDY) sebagai medium vegetasi. Kultur diinkubasi dalam incubator shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28 °C selama 2 hari. Lima milliliter dari miselia yang sudah tumbuh diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer yang mengandung media optimasi. Kultur diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm, pada suhu 28 °C selama 10 hari.

Ekstraksi dan analisa HODE. Semua kaldu fermentasi diekstrak dengan etil asetat dengan perbandingan volume 1:1. Etil asetat adalah organik terbaik untuk ekstraksi HODE (data tidak dipublikasikan). Fase organik dipisahkan dari fasa air, diukur volumenya dengan volume akhir 100 mL, dan dipekatkan menggunakan *centrifuge concentrator* disertai pengurangan tekanan. Ekstrak kering kemudian dilarutkan kembali menggunakan metanol dengan *grade high pressure liquid chromatography* (HPLC) dengan volume akhir 1 mL. Ekstrak tersebut kemudian dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) Waters menggunakan kolom C18 (Puresil, 150

x 4.6 mm) dan dielusi secara gradien dengan asetonitril-air dari 15% sampai 100% selama 33 menit. Puncak HODE mempunyai waktu retensi 14.6-14.8 menit. Data luas kromatogram HODE akan digunakan sebagai *input* optimasi menggunakan metode respons permukaan.

Rancangan percobaan. Untuk mendapatkan data luas kromatogram HODE pada berbagai perbandingan komposisi media dilakukan dengan menggunakan metode *Central Composite Design* (CCD). Percobaan ini terdiri dari 8 satuan percobaan untuk rancangan faktorial dan diperbesar dengan 6 *starting point* dan 6 *center point*. Rancangan percobaan dengan tiga level faktor yang dikodekan dari selang konsentrasi untuk tiap faktor yang disajikan pada Tabel 1, sedangkan level konsentrasi tiap faktor sebelum dikodekan disajikan pada Tabel 2. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui respons dari setiap komposisi faktor yang dicobakan.

Analisis data dan optimasi media. Untuk membuat model persamaan yang menghubungkan antara respons (luas kromatogram HODE) dengan peubah (komposisi media) data yang diperoleh dari hasil percobaan diolah

dengan menggunakan perangkat lunak *Design Expert* versi 7. Model yang dihasilkan dari pengolahan data percobaan akan dioptimasi dengan menggunakan metode respons permukaan dengan perangkat lunak *Design Expert* versi 7.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode respons permukaan adalah suatu cara empiris yang dapat digunakan untuk mengevaluasi hubungan antara suatu kelompok peubah dari suatu percobaan dan respons yang terukur berdasarkan suatu kriteria tertentu⁽¹⁹⁾. Pengaruh peubah yang akan diuji terhadap proses perlu diketahui terlebih dahulu untuk mendapatkan model yang lebih mendekati kenyataan.

Berdasarkan penelitian pendahuluan yang sudah dilakukan sebelumnya, glukosa dan MSG merupakan sumber karbon dan sumber nitrogen yang mempunyai pengaruh nyata terhadap produksi HODE oleh *C. lumata*⁽²⁰⁾, sementara minyak jagung adalah *inducer* yang mempunyai pengaruh nyata terhadap produksi HODE

Tabel 1. Rancangan percobaan *central composite design*.

No. Percobaan	Rancangan Percobaan	Level faktor yang dikodekan			Respon
		X ₁	X ₂	X ₃	
1	Faktorial	5	8	1	Y ₁
2		5	8	16	Y ₂
3		5	16	9	Y ₃
4		5	16	9	Y ₄
5		15	8	1	Y ₅
6		15	8	9	Y ₆
7		15	16	1	Y ₇
8		15	16	0	Y ₈
9	Starting point	10	5.27	5	Y ₉
10		10	18.73	5	Y ₁₀
11		10	12	0	Y ₁₁
12		10	12	11.73	Y ₁₂
13	Center point	1.59	12	5	Y ₁₃
14		18.41	12	5	Y ₁₄
15		10	12	5	Y ₁₅

Tabel 2. Level Konsentrasi setiap faktor pada *central composite design*.

Faktor	Kode	Level				
		-1.682	-1	0	1	1.682
Glukosa (g/L)	X ₁	1.59	5	10	15	18.41
Sodium glutamat (g/L)	X ₂	5.272	8	12	16	18.73
Minyak jagung (ml/L)	X ₃	0	1	5	9	11.73

(data tidak dipublikasikan). Ketiga peubah tersebut dipilih untuk optimasi komposisi media produksi HODE menggunakan *central composite design* dan metode respons permukaan.

Sebanyak 15 unit percobaan, yang terdiri dari $2^3 (= 8)$ unit percobaan faktorial, 6 *starting point*, dan 1 *center point* telah dikerjakan dalam eksperimen (Tabel 3). Hasil pengolahan data dengan perangkat lunak *Design expert* menunjukkan bahwa model linier dan kuadratik secara

nyata dapat menjelaskan data yang diperoleh (p -value < 0.01) pada tingkat kepercayaan 99% (Tabel 4).

Uji lanjut ketidakcocokan model (*lack of fit*) menunjukkan bahwa hanya model kuadratik yang secara tidak nyata menunjukkan ketidakcocokan (p -value > 0.01). Dengan demikian model kuadratik dipilih sebagai model untuk optimasi komposisi media produksi HODE dari *C. lunata* (Tabel 5).

Analisa ANOVA terhadap model respons permukaan kuadratik kembali menunjukkan bahwa model kuadratik secara nyata (p -value < 0.01) dapat menjelaskan data yang ada (Tabel 6). Dari model yang diperoleh hanya glukosa, minyak jagung dan interaksi antara glukosa dan minyak jagung yang menunjukkan pengaruh nyata terhadap produksi HODE oleh kapang *C. lunata* (p -value < 0.01), sedangkan MSG dan interaksinya dengan peubah lain tidak menunjukkan pengaruh nyata.

Adapun perkiraan pengaruh setiap peubah dan interaksinya disertai dengan hasil uji beda nyata dapat dilihat dari pengolahan data ini. Koefisien dari setiap peubah dalam eksperimen ini disajikan dalam Tabel 7, akan tetapi tidak setiap peubah mempunyai pengaruh signifikan terhadap produksi HODE. Dengan demikian model yang dapat menjelaskan data yang diperoleh adalah:

$$\text{Log } Y = 6.26 - 0.092A - 0.17C + 0.087AC$$

dimana Y = luas kromatogram HODE

A = konsentrasi glukosa

C = volume minyak jagung

Model yang dihasilkan dari pengolahan data percobaan menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi glukosa akan menurunkan HODE yang dihasilkan kapang *C. lunata* sampai konsentrasi glukosa 5 g/L.

Tabel 3. Luas kromatogram HODE sebagai respon dari perlakuan.

No Percobaan	Ulangan	Level faktor yang dikodekan			Luas kromatogram HODE (rerata)
		X ₁	X ₂	X ₃	
1	1	-1	-1	-1	4287768
2	1	-1	-1	1	1764268
3	1	-1	1	-1	3306000
4	1	-1	1	1	1290489
5	1	1	-1	-1	984057
6	1	1	-1	1	1546575
7	1	1	1	-1	1913877
8	1	1	1	1	1360721
9	1	0	-1.682	0	1026659
10	1	0	1.682	0	1588842
11	1	0	0	-1.682	6948121
12	1	0	0	1.682	1142417
13	1	-1.682	0	0	2379913
14	1	1.682	0	0	1286299
15	1	0	0	0	1943203

Tabel 4. Hasil uji anova terhadap model.

Source	Sum of square	Df	Mean of square	F value	P value
Mean	1882.47	1	1882.47	-	-
Linier	1.47	3	0.49	14.56	< 0.0001
Quadratic	0.37	3	0.12	5.45	0.0032
Cubic	0.22	4	0.055	2.91	0.0359
Residual	0.64	34	0.019	-	-
Total	1885.42	48	39.28	-	-

Tabel 5. Hasil uji ketidakcocokan model.

Source	Sum of square	Df	Mean of square	F value	P value (Prob > F)
Linier	0.84	1	0.077	9.85	0.0010
Quadratic	0.23	5	0.045	8.98	0.06432
Cubic	5.340E-003	1	5.340E-003	6.15	0.6027
Pure Error	0.64	3	0.019	-	-

Tabel 6. Analisa ANOVA terhadap model respon permukaan kuadratik.

Source	Sum of square	Df	Mean of square	F value	P value (Prob > F)
Model	2.09	9	0.23	10.21	< 0.0001
A- Glukosa	0.34	1	0.34	15.13	0.0004
B- Glutamat	4.960E-003	1	4.960E-003	0.22	0.6430
C- Minyak jagung	1.12	1	1.12	49.35	< 0.0001
AB	0.043	1	0.043	1.89	0.1773
AC	0.18	1	0.18	7.91	0.0077
BC	0.023	1	0.023	1.02	0.3200
A ²	7.771E-003	1	7.771E-003	0.34	0.5621
B ²	0.072	1	0.072	3.19	0.0821
C ²	0.13	1	0.13	5.94	0.0196
Residual	0.86	38	0.023	-	-
Lack of fit	0.23	5	0.45	2.33	0.0642
Pure error	0.64	33	0.019	-	-
Cor total	2.95	47	-	-	-

Tabel 7. Estimasi pengaruh variabel dalam model.

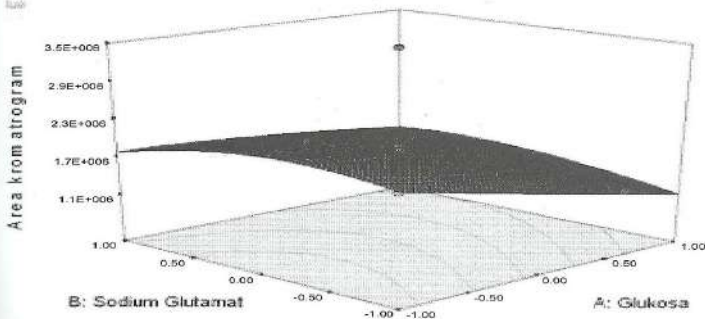
Variabel	Coefficient estimate	Df	Standard Error
Intercept	6.26	1	0.061
A	-0.092	1	0.024
B	0.011	1	0.024
C	-0.17	1	0.024
AB	0.042	1	0.031
AC	0.087	1	0.031
BC	-0.031	1	0.031
A ²	-0.017	1	0.029
B ²	-0.051	1	0.029
C ²	0.070	1	0.029

Bila konsentrasi glukosa dinaikkan lagi, HODE yang dihasilkan akan menurun. Seperti halnya kelompok senyawa asam lemak yang lain, HODE disintesis di dalam kapang melalui jalur sintesis menyerupai jalur poliketida. Menurut Jenni *et al.* (21) triosa sebagai hasil pemecahan glukosa dikonversi menjadi asetat melalui asam piruvat. Penambahan CO₂ secara kedalam gugus asetat akan menghasilkan malonat. Reaksi malonat dengan asetat secara berlanjut akan menghasilkan asam lemak atau poliketida. Enzim piruvat dekarboksilase sebagai penentu konversi piruvat menjadi asetat pada *Saccharomyces cerevisiae*, dilaporkan hanya dapat bekerja dalam keadaan glukosa terbatas(23). Hal yang sama diduga menyebabkan turunnya produksi HODE apabila konsentrasi glukosa meningkat.

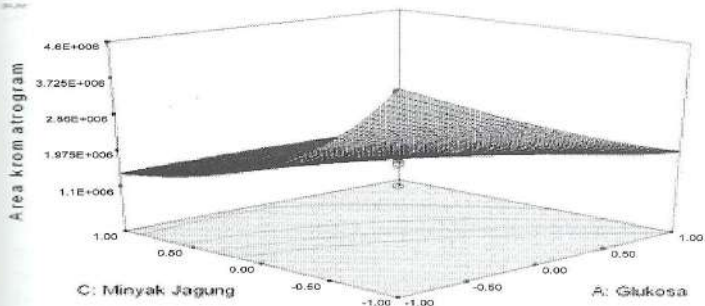
Seperti halnya glukosa, minyak jagung ternyata juga berpengaruh nyata terhadap produksi HODE oleh kapang *C. lunata*. Meskipun penambahan minyak jagung berpengaruh secara nyata terhadap produksi HODE, akan tetapi peningkatan penambahan minyak jagung diatas 1 ml/L justru menurunkan produksi HODE. Penambahan minyak jagung dalam produksi HODE oleh kapang *C. lunata* dimaksudkan sebagai senyawa pemicu (*inducer*). Beberapa publikasi melaporkan minyak nabati yang mengandung asam oleat, linoleat maupun asam linolenat digunakan sebagai substrat untuk produksi oksilipin(4,23, 24).

Pada penelitian sebelumnya *C. lunata* dapat menghasilkan HODE tanpa penambahan minyak jagung akan tetapi penambahan minyak jagung dapat meningkatkan produksi HODE oleh *C. lunata* (data tidak dipublikasikan). Omar *et al.* (6) melaporkan bahwa produksi 13-HODE dari asam linoleat dengan menggunakan enzim lipoksigenase, mencapai 75.8% apabila asam linoleat yang digunakan 800 mg/L. Akan tetapi tingkat konversi menurun ketika konsentrasi asam linoleat dinaikkan, meskipun konsentrasi enzim dinaikkan dari 70 mg/L menjadi 100 mg/L. Kerja enzim lipoksigenase ternyata terhambat apabila konsentrasi asam linoleat terus ditingkatkan. Hal yang sama diduga menjadi penyebab menurunkannya produksi HODE oleh kapang *C. lunata*, karena sintesa oksilipin pada kapang juga melibatkan enzim lipoksigenase, meskipun jenis enzim lipoksigenase yang terlibat bisa berbeda-beda untuk masing-masing kapang.

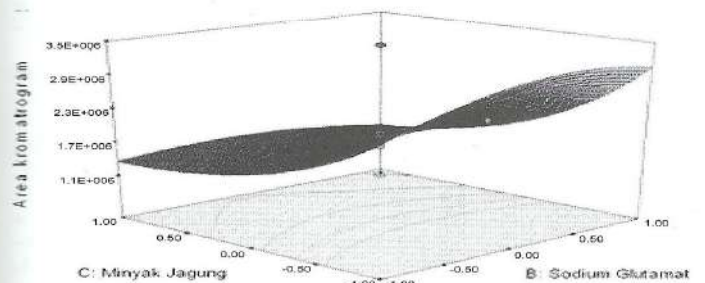
Meskipun dalam penelitian pendahuluan MSG adalah jenis sumber nitrogen yang paling baik untuk



Gambar 1. Pengaruh interaksi glukosa dan MSG terhadap produksi HODE.



Gambar 2. Pengaruh interaksi glukosa dan minyak jagung terhadap produksi HODE.



Gambar 3. Pengaruh interaksi minyak jagung dan MSG terhadap produksi HODE.

produksi HODE, akan tetapi optimasi menggunakan RSM menunjukkan bahwa konsentrasi MSG di dalam media tidak berpengaruh nyata terhadap produksi HODE. Pengaruh interaksi antar peubah disajikan dalam Gambar 1, 2, dan 3. Hasil pengolahan data menunjukkan hanya interaksi antara glukosa dan minyak jagung yang mempunyai pengaruh nyata terhadap produksi HODE, sedangkan interaksi semua peubah dengan MSG tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap produksi HODE.

Optimasi dengan RSM dilakukan menggunakan perangkat lunak *Design Expert* versi 7. Optimasi ini dilakukan untuk mendapatkan komposisi komponen penyusun media yang dapat menghasilkan HODE paling tinggi. Luas kromatogram HODE maksimal hasil optimasi adalah $4.54 \text{ E}+006$ tercapai pada penggunaan glukosa sebagai sumber karbon 5 g/L ; MSG sebagai sumber nitrogen 12 g/L dan minyak jagung sebagai inducer 1 ml/l . Hasil optimasi tersebut mempunyai *desirability* (R^2) sebesar 0.780 (Tabel 8).

Verifikasi produksi HODE dengan komposisi media hasil optimasi menghasilkan HODE dengan area kromatogram 1091338 ± 152489 . Luas area ini masih jauh dibawah area kromatogram yang diprediksi oleh model sebesar 4540000 (Tabel 8). Hasil verifikasi belum menunjukkan HODE sebesar prediksi model akan tetapi hasil optimasi mampu meningkatkan produksi HODE dibandingkan dengan media basal yang menghasilkan HODE dengan luas kromatogram 295045 ± 71200 pada saat bersamaan dilakukan kultivasi.

Metode respons permukaan adalah metode yang terpercaya untuk optimasi. Banyak peneliti yang melaporkan verifikasi hasil optimasi dengan metode respons permukaan sangat dekat dengan prediksi modelnya^(9, 10, 11, 25). Kapang yang digunakan dalam optimasi ini adalah kapang *wild type* yang relatif belum stabil, diduga ketidakstabilan kapang tersebut yang menyebabkan hasil verifikasi jauh dibawah prediksi model.

Tabel 8. Hasil optimasi komposisi media.

Name	Goal	Lower limit	Upper limit	Lower weight	Upper weight	Solution
Glukosa	in range	-1	1	1	1	5.00
MSG	in range	-1	1	1	1	12.00
Minyak jagung	in range	-1	1	1	1	1.00
Area HODE	Maximise	832726	7320000	1	1	4540000
<i>Desirability</i> (R)	-	-	-	-	-	0.780

SIMPULAN

Hydroxy octadecadienoic acid maksimum yang dapat diproduksi oleh kapang endofit *Curvularia lunata* mempunyai luas kromatogram 1091338 ± 152489 pada komposisi media glukosa 5 g/L, MSG 12 g/L dan minyak jagung 1 ml/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Cantrell CL, Kniffin TM, Case BP, Duke SO, Mena EE, Wedge DE. Isolation and Identification of Antifungal Fatty Acids from the *Basidiomycete Gomphus floccosus*. *J Agric Food Chem*. 2008. 56:5062-8.
- Colquhoun A, Miyake JA, Benadiba M. Fatty acid, eicosanoids and cancer. *Nutrit Ther Metabol*. 2009. 27(3):105-12.
- Mundt S, Kreitlow S, Jansen R. Fatty acid with antibacterial activity from cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *J Appl Pshycol*. 2003. 14:263-7.
- Wadman MW, van Zadelhoff G, Hamberg M, Visser Y, Veldink GA, Vliegthart JFG. Conversion of linoleic acid into novel oxylipins by the mushroom *Agaricus bisporus*. *Lipids*. 2005. 40(11):1163-70.
- Wadman MW, de Vries RP, Kalkhove SIC, Veldink GA, Vliegtharat JFG. Charaterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiol*. 2009. 9:59 [serial online]. diambil dari <http://www.biomedcentral.com>. diakses 20 Mei, 2010.
- Omar MN, Moynihan H, Hamilton R. Scaling-up production of 13S-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (13S-HODE) through chemoenzymatic technique. *Bull Korean Chem Soc*. 2003. 24:397-9.
- Rombi M, Bordighera. Method for obtaining oil that is rich in hydroxyoctadecadienoic fatty acids (HODE) or the esters thereof from a mixture containing linoleic acid or esters thereof. US Patent. February 19th, 2002. 6, 348, 609.
- Mandenius CF, Brundin A. Bioprocess optimization using design of experiment methodology. *Biotechnol Prog*. 2008. 24:1191-203.
- Pansuriya RC, Singhal RS. Response surface methodology for optimization of lovastatin by solid state fermentation. *Brazilian J Microbiol*. 2010. 41:164-72.
- Zhang X, Zhou J, Fu W, Li Z, Zhong J, Yang J, et al. Response surface methodology used for statistical optimization of jjean peptide production by *Bacillus subtilis*. *Electronic J Biotechnol*. 2010. 13(4). [serial online]. diakses tanggal 24 November, 2010.
- Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X, Liu X, et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2009. 100:4012-16.
- Jiang L. Optimization of fermentation condition for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. *Carbohidrat Poly*. 2010. 79:414-7.
- Bezerra MA, Syed Q, Nadeem M. Statistical optimization of process variables for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Turk J Biochem*. 2008. 33(2):50-7.
- Yan L, Le-he M. Optimization of fermentation conditions for P450 BM-3 monooxygenase production by hybrid design methodology. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006. 8(1):27-32.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008. 76:965-77.
- Coetzer RLJ, Haines RLJ, Fatti LP. Central composite designs for estimating the optimum conditions for a second-order model. *J Statist Plann Inference*. 2010. [online]. diambil dari doi : 10.1016/j.jspi.2010.11.026. diakses tanggal 19 Januari, 2011.
- Tomita F. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic and potential applications. *Fungal Diversity*. 2003. 14:187-204.
- Watanabe, Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi : Morphologies of Cultured Fungi and key to Species. 2nd edition. Boca Raton. CRC Press; 2002. 237.
- Adinarayana K, Ellaiyah P . Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2002. 5(3):281-7.
- Prabandari EE, Irawadi TT, Sumaryono W, Syamsu K. Selection of Carbon and Nitrogen Source for Hydroxy Octadecadienoic Acid Production using Endophytic Fungi *Curvularia lunata* BioMCC FE-00283. *Microbiol*. [dalam publikasi]
- Jenni S, Leibundgut M, Maier T, Ban N. Architecture of fungal fatty acid synthase at 5 Å Resolution. *Science*. 2006. 311:1263-7.
- Van Maris AJA, Groothuizen MK, Geertman JM, Winkler AA, van Dijken JP, Vermeulen A, Piper MDW, et al. Directed Evolution of Pyruvate decarboxylase - negative *Saccharomyces cerevisiae*, Yielding a C-Independent, Glucose-Tolerant, and Pyruvate-Hyperproducing Yeast. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004. 70(1):159-66
- Arjol M, Galia MB, Bermudo E. Identification of oxylipins antifungal activity by LC-MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. *Chem Phys Lip*. 2010. 163:341-6
- Heo SH, Hou CT, Kim BS. Production of oxygenated fatty acids from vegetable oils by *Flavobacterium sp* strain DS5. *New Biotechnol*. 2009. 26 (1/2):105-8.
- Prabandari EE. Optimalisasi media kultivasi *Aspergillus terreus* untuk produksi lovastatin dengan metode central composite design.[tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2003. 48-9.