

**EFEK FERRI SITRAT TERHADAP KEMAMPUAN KHAMIR
Candida tropicalis DALAM MEREDUKSI 3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-
2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE (MTT)*
[Effect of ferric citrate on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction in yeast *Candida tropicalis*]**

Heddy Julistiono[✉], Resti Siti Muthmainah dan Adam

Bidang Mikrobiologi – Pusat Penelitian Biologi LIPI

Jln Raya Jakarta-Bogor Km46, Cibinong 16911;

e-mail: heddy_j@yahoo.com

ABSTRACT

Effect of iron (ferric citrate) on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction in yeast *Candida tropicalis* was investigated. Reduction of MTT in yeast grown in YMB media containing 5 mM of ferric citrate decreased significantly compared to that of yeast grown containing 0, or 1.25 or 2.5 mM ferric citrate after 24 h incubation. However, there was no difference in cell density among cultures treated with 0 mM, 1.25 mM, and 5 mM ferric citrate. Ferric citrate of 5 mM caused smaller colony when cells were grown on YPDG media. Reduction of MTT in smaller colony cells was weaker than that of with normal size colony. An antioxidant, Epigallocatechin Gallate (EGCG) of 0.01 % could not reverse MTT reduction caused by 5 mM ferric citrate. Since enzymes responsible in MTT reduction are usually located in mitochondrion, the data suggested that, in the condition of 5 mM ferric citrate might cause mitochondrion disorder without killing the yeast cells. The data was in concordance with other studies on other yeast or human cells. However, this study does not show role of free radicals provoked by high level of iron concentration.

Key words: *Candida tropicalis*, iron pollutant, iron toxicity, MTT reduction, free radical.

ABSTRAK

Pengaruh zat besi (ferri sitrat) terhadap reduksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) pada khamir *Candida tropicalis* telah diteliti. Kemampuan mereduksi MTT pada khamir yang ditumbuhkan selama 24 jam pada media YMB mengandung 5 mM ferri sitrat menurun secara nyata dibanding kultur yang tumbuh pada media mengandung 0, 1,125 dan 2,5 mM. Tidak ada perbedaan yang nyata antara kepadatan populasi kultur khamir yang diperlakukan dengan atau tanpa ferri sitrat. Namun pada kultur yang diperlakukan ferri sitrat 5 mM terdapat koloni berukuran kecil jika ditumbuhkan pada media YPDG dengan rata-rata 3,1 %. Kemampuan mereduksi MTT sel koloni kecil ini rendah dibanding sel dengan koloni besar. Senyawa antioksidan Epigallocatechin Gallate (EGCG) 0,01 % tidak dapat memulihkan kerusakan sel akibat 5 mM ferri sitrat. Mengingat reduksi MTT dilakukan oleh ensim-ensim yang terdapat pada mitokondrion, data ini mengindikasikan bahwa kandungan ferri sitrat yang tinggi (5 mM) dapat menyebabkan kerusakan mitokondrion tanpa membunuh sel. Data ini sesuai dengan yang dilaporkan pada khamir lain maupun sel manusia. Namun, toksisitas zat besi yang biasanya melalui timbulnya senyawa radikal bebas, pada penelitian ini tidak dapat terindikasi.

Kata Kunci: *Candida tropicalis*, polutan zat besi, reduksi MTT, radikal bebas.

PENDAHULUAN

Zat besi merupakan salah satu logam berat polutan yang berpotensi berbahaya bagi kesehatan, yang dapat mencemari tanah maupun udara (Fujimori *et al.*, 2012). Walaupun unsur ini dibutuhkan tubuh dalam jumlah kecil, namun pada jumlah yang berlebihan akan mengakibatkan munculnya penyakit diantaranya Parkinson (Kumar *et al.*, 2012).

Khamir tidak hanya dapat dimanfaatkan sebagai salah satu indikator terhadap pencemaran lingkungan yang dapat menggambarkan respons sel khamir namun sel non-khamir terhadap polutan lingkungan (Fai and Grant, 2009); namun dapat digunakan sebagai sel model untuk mempelajari penyakit pada manusia seperti yang disebabkan antara lain

oleh logam besi (Goffrini *et al.*, 2009). *C. tropicalis* lipimc 0065 adalah khamir yang diisolasi dari lingkungan tercemar oleh limbah hidrokarbon di ladang minyak Cepu, Jawa Tengah (Saono and Gandjar, 1974). Logam berat timbal (Pb) atau kadar garam tinggi diperkirakan dapat mengakibatkan stress oksidasi pada khamir ini yang identik dengan proses yang terjadi pada sel mamalia (Julistiono, 2006). Salah satu mekanisme toksisitas logam besi terhadap sel manusia atau hewan adalah timbulnya radikal bebas yang dikatalisis oleh zat besi itu sendiri yang terutama terjadi pada mitokondrion (Vasquez-Vivar *et al.*, 2000)

Kandungan zat besi dalam bentuk ferri sitrat yang berlebihan dilaporkan mengakibatkan kersu-

*Diterima: 7 Januari 2012 - Disetujui: 4 Februari 2012

kan mitokondrion pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* akibat terbentuknya radikal bebas oksigen reaktif pada mitokondrion (Chen *et al.*, 2002). Pada biak yang sensitif, ferri sitrat mengakibatkan terbentuknya mutan kecil atau “petite” yakni sel yang fungsi mitokondrianya mengalami kerusakan sehingga kemampuan memanfaatkan energi dari substrat sumber respirasi sangat terganggu. Dengan demikian, sel “petite” hidup terutama dimungkinkan oleh energi dari hasil fermentasi saja.

Viabilitas khamir dapat diukur dengan mengamati perubahan warna akibat reduksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yang berwarna kuning menjadi formazan yang berwarna ungu. Reduksi MTT terutama terjadi pada membran dalam bagian luar mitokondrion (Berridge and Tan, 1993). Metoda dengan menggunakan kemampuan mereduksi MTT ini sering dimanfaatkan untuk uji toksisitas senyawa berpotensi antibiotik, dengan asumsi bahwa sel yang mati tidak mampu melakukan reduksi MTT (Hodgson *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ferrisitat terhadap kemampuan *C. tropicalis* mereduksi MTT. Data ini diharapkan juga dapat dijadikan sebagai pertimbangan dalam penggunaan metoda reduksi MTT untuk penapisan senyawa anti-khamir. Pada penelitian sebelumnya, ekstrak air panas teh hijau mampu melindungi sel khamir dari kerusakan oksidasi (Julistiono, 2011a), maka diamati juga kemampuan EGCG, salah satu kandungan teh yang bersifat antioksidan, dalam melindungi kerusakan sel akibat ferrisitat. Riset toksisitas zat besi pada khamir dapat digunakan juga untuk membuat prediksi kasus serupa pada manusia, yakni akumulasi besi yang mengakibatkan kerusakan mitokondrion akibat stress oksidasi (Karthikeyan *et al.*, 2003; Irazusta *et al.*, 2010).

BAHAN DAN CARA KERJA

Media dan pertumbuhan khamir.

Khamir ditumbuhkan pada media cair YMB, (*Yeast Malt Broth*), 3 g ekstrak khamir, 3 g

ekstrak malt, 5 g pepton, 10 gram glukosa, dalam 1 liter dH₂O). disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pertumbuhan khamir.

Suspensi khamir yang akan digunakan dalam percobaan ini dipersiapkan dengan ditumbuhkan pada YMB, diinkubasi pada suhu kamar, dengan rotasi 100 rpm, selama 24 jam.

Media untuk Penghitungan Koloni Khamir.

Media YPDG digunakan untuk menumbuhkan dan membedakan koloni normal dan koloni yang mitokondrianya mengalami gangguan, sedang YPG merupakan media yang cocok untuk koloni normal saja (Sherman *et al.*, 1986). Suspensi khamir disebar pada media YPDG, (*Yeast Peptone Dextrose Glycerol*: 10 g Ekstrak khamir, 20 g pepton, 30 ml gliserol, 1 g desktrorse, 20 g agar, 970 ml dH₂O) dan YPG, (*Yeast Peptone Glycerol*: 10 g ekstrak khamir, 20 g pepton, 30 ml gliserol, 20 g agar, 970 ml dH₂O).

Percobaan

Pada 300 µl media YMB yang diletakkan pada pada tabung reaksi (diameter 15 mm, tinggi 105 mm), diinokulasi sekitar $0,3 \times 10^6$ CFU khamir. Kedalam suspensi tersebut ditambahkan EGCG dan atau ferrisitat, diinkubasi pada suhu ruang dengan rotasi 100 rpm. Untuk pengamatan koloni yang tumbuh pada media YPDG atau YPG, setelah 24 jam, sebanyak 0,1 ml suspensi yang diencerkan 10^4 dan 10^5 kali, disebar pada media padat tersebut. Setiap perlakuan menggunakan 3 ulangan yang independen. Media pertumbuhan mengandung ferri sitrat disiapkan dengan menambahkan ferri sitrat pada media pertumbuhan YMB sebanyak 5 mM. Selanjutnya, media mengandung 5 mM ferri sitrat diencerkan dengan media YMB sehingga diperoleh media mengandung 1,25 mM dan 2,5 mM.

Pengamatan Viabilitas Khamir dengan Metoda Reduksi MTT

Pengamatan kemampuan khamir mereduksi MTT disiapkan sesuai metoda El-Baz dan Shetaia (2005). Suspensi sel khamir sebanyak 300 µl ditambah 50 µl MTT dengan konsentrasi 5 mg/ml, kemudian diinkubasi pada suhu 30 C selama 2 jam.

Pada masing-masing tabung ditambahkan 500 μ l propna-2-ol mengandung 0,04 M HCl, kemudian di-*vortex*, dilakukan “spin” untuk memisahkan suspensi sel dengan larutan mengandung formazan agar pengukuran serapan optiknya tidak terpengaruhi oleh massa sel. Masing-masing supernatan (200 μ l) dari perlakuan dipindah pada “microplate” 96 sumur, serapan optik kemudian diukur dengan “microplate reader” pada panjang gelombang 590 nm. Untuk mengamati kemampuan koloni khamir pada media padat yang tidak mampu mereduksi MTT, koloni ditetesi dengan larutan MTT dengan konsentrasi 1 mg/ml. Koloni yang tetap berwarna putih setelah 1 jam penetesan, merupakan koloni yang tidak mampu mereduksi MTT.

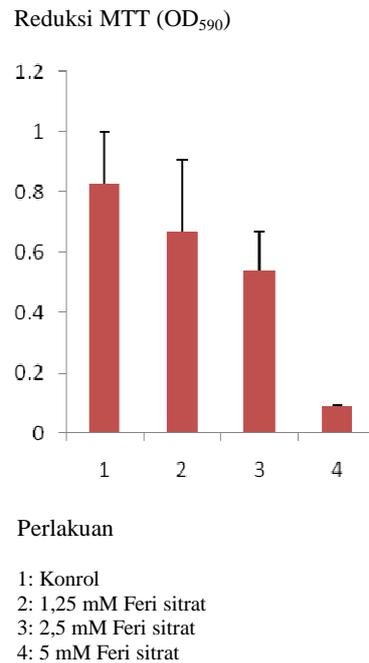
Pengamatan Koloni Kecil dan Kemampuan Mereduksi MTT

Suspensi kultur diencerkan sejuta (10^{-6}) kali, kemudian sebanyak 100 μ l disebar pada media YPDG. Setelah 48 jam, koloni dengan ukuran lebih kecil (sekitar 5 kali lebih kecil dari ukuran) ditentukan sebagai koloni kecil. Untuk mengetahui kemampuan mereduksi MTT, 1 sampai 3 koloni diambil dimasukkan pada 50 μ l MTT, kemudian diukur OD dengan panjang gelombang 590 nm. Sebagai pembandingan, dilakukan hal yang serupa dengan koloni normal.

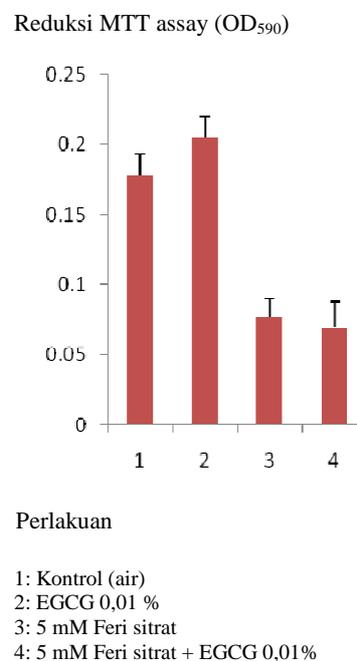
HASIL

Reduksi MTT pada Khamir yang Diperlakukan dengan Ferrisitat

Efek dari ferri sitrat terhadap kemampuan khamir dalam mereduksi MTT disajikan pada Gambar 1. Pada konsentrasi yang rendah yakni sampai 2,5 mM, Fe sitrat tidak berpengaruh terhadap kemampuan sel untuk mereduksi MTT. Namun pada konsentrasi 5 mM, kemampuan sel untuk mereduksi MTT mulai menurun. Sedang pada Gambar 2 disajikan efek antioksidan EGCG terhadap menurunnya kemampuan sel yang diperlakukan dengan ferrisitat 5 mM mereduksi MTT. Dari Gambar 2 terlihat bahwa keberadaan antioksidan EGCG 0,01 % tidak dapat melindungi sel dari turunnya kemampuan sel untuk mereduksi MTT.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi ferri sitrat terhadap kemampuan khamir mereduksi MTT



Gambar 2. Pengaruh ferri sitrat dan EGCG terhadap kemampuan khamir mereduksi MTT

Pengaruh Fe sitrat terhadap kepadatan sel.

Seperti yang tertera pada Tabel 1, tidak ditemui perbedaan kepadatan sel antara kultur yang tidak diperlakukan (kontrol), yang diperlakukan dengan 5 mM ferrisitrat dan yang diperlakukan dengan ferrisitrat + EGCG 0,01 %. Dari Tabel 1 terlihat bahwa toksisitas 5 mM Feri sitrat tidak membunuh sel.

Tabel 1. Efek ferri sitrat dan EGCG pada koloni khamir yang tumbuh pada media YPDG

Perlakuan	Khamir yang tumbuh pada media YPDG (10 ⁶ cfu/ml)
Kontrol	93,3 ± 18,2 a
Fe sitrat 5 mM	64,6 ± 19,9 a
Fe sitrat 5 mM + EGCG 0,5 mg/ml	67 ± 11,7 a

Angka yang diikuti dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5 %

Pengaruh Ferri Sitrat pada Pembentukan Koloni Kecil pada Media YPDG

Terbentuknya koloni kecil dapat dilihat pada Gambar 3/Foto 1; sedang pengaruh ferri sitrat atau ferri sitrat + EGCG 0,01 % terhadap jumlah koloni kecil disajikan pada Tabel 2. Seperti yang terlihat pada Tabel 2, kultur yang tidak diperlakukan dengan ferri sitrat tidak memiliki koloni kecil sedang rata-rata jumlah koloni kecil pada kultur yang diperlakukan dengan ferri sitrat atau ferri sitrat + EGCG masing-masing 3,1 % dan 2,0 % yang tidak berbeda nyata.

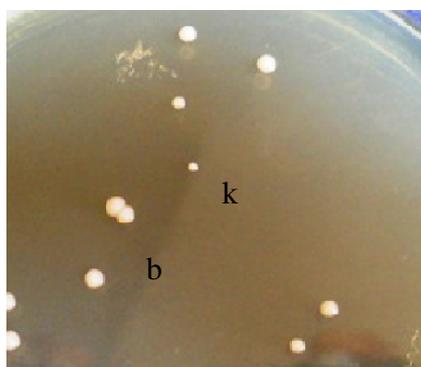


Foto 1. Koloni besar (b) dan koloni kecil (k) umur 24 jam pada media YPDG (perlakuan Fe sitrat).

Tabel 2. Pengaruh ferri sitrat terhadap jumlah koloni kecil dan tidak mereduksi

Perlakuan	Koloni kecil yang tumbuh pada YPDG (%)
Kontrol	0 a
Fe sitrat 5 mM	3,1 ± 2,6 b
Fe sitrat 5 mM + EGCG 0,5 mg/ml	2,0 ± 0,6 b

Angka yang diikuti dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5 %

Kemampuan Koloni Besar atau Kecil dalam Mereduksi MTT

Pada foto 1, terlihat kemampuan koloni besar atau kecil dalam mereduksi MTT secara visual. Seding pada Tabel 3 disajikan kemampuan mereduksi MTT dari koloni besar (b) atau kecil (k) secara kuantitatif. Dari kedua data tersebut dapat ditunjukkan bahwa koloni kecil mengalami penurunan kemampuan mereduksi MTT.

PEMBAHASAN

Sejauh pengetahuan penulis, belum ada informasi mengenai peran zat besi yang secara langsung menghambat proses reduksi MTT, namun senyawa ini justru dapat mereduksi MTT tanpa keterlibatan sistem sel hidup (Habtemariam, 1995). Dengan demikian, menurunnya kemampuan sel dalam mereduksi MTT memang dikarenakan oleh kerusakan sel akibat senyawa besi yang berlebihan. Pada penelitian sebelumnya, dengan menggunakan media pertumbuhan khamir yang berbeda (gliserol sebagai sumber karbon), senyawa besi ini dapat merusak sel yang diduga kuat melalui proses oksidasi, mengingat kandungan lipida peroksida meningkat akibat perlakuan dengan ferrisitrat 5 mM diikuti dengan kematian sel (Julistiono, 2011b). Senyawa ferri mungkin menyebabkan kerusakan pada mitokondria (Berridge dan Tan, 1993) yang biasanya diakibatkan oleh munculnya senyawa radikal bebas akibat kelebihan kandungan zat besi (Chen *et al.*, 2002). Namun Gambar 2 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kemampuan sel mereduksi MTT pada kultur yang diperlaku-



Foto 2. Reduksi MTT oleh berbagai perlakuan koloni khamir.

Keterangan:

Ø :larutan MTT tanpa koloni

1 : MTT + 1 koloni besardari kultur dengan yang diperlakukan denagn air

2 : MTT + 1 koloni besardari kultur yang diperlakukan dengan EGCG 0,01 %

3b : MTT + 1 koloni besardari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM

3k : MTT + 1 koloni kecil dari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM

3kkk : MTT + 3 koloni kecil dari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM

4b: MTT + 1 koloni sel besardari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM dan EGCG 0,01 %

4kk:MTT + 2 koloni kecil dari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM dan EGCG 0,01 %.

Tabel 3. Reduksi MTT oleh koloni besar dan kecil khamir dari berbagai kultur

Kode pada Foto 2	Suspensi	Absorbansi (OD ₅₉₀)
Ø	larutan MTT tanpa koloni	0.009
1	MTT + 1 koloni besar dari kultur dengan perlakuan air	TTD
2	MTT + 1 koloni besardari kultur yang diperlakukan dengan EGCG 0,01 %	TTD
3b	MTT + 1 koloni besardari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM	0,756
3k	MTT + 1 koloni kecil dari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM	0,109
3kkk	MTT + 3 koloni kecil dari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM	0,142
4b	MTT + 1 koloni sel besardari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM dan EGCG 0,01 %	***
4kk	MTT + 2 koloni kecil dari kultur yang diperlakukan dengan Ferri sitrat 5 mM dan EGCG 0,01	0,048

kan dengan ferri sitrat saja dan ferri sitrat + EGCG 0,01. Dengan demikian peran senyawa radikal bebas pada peristiwa ini tidak terindikasi, walau kemungkinan peran tersebut masih ada, mengingat keberhasilan fungsi antioksidan sebagai penjerap elektron dalam melindungi sel dari cekaman oksidasi tergantung dari berbagai faktor (Cotelle, 2001).

Walaupun ada fungsi enzim pada mitokondrion terganggu, yang berakibat menurunnya kemampuan sel mereduksi MTT, namun sel masih dapat tumbuh dan membentuk koloni. Mengingat

khamir pada umumnya dapat melakukan respirasi dan fermentasi, gangguan pada mitokondrion hanya akan mengganggu proses penggunaan energi melalui proses respirasi namun energi masih bisa diperoleh melalui proses fermentasi jika sel ditumbuhkan pada media mengandung gula yang bisa difermentasi (Sherman *et al.*, 1986)

Perlakuan 5 mM ferri sitrat mengakibatkan munculnya koloni yang berukuran kecil yang diduga koloni kecil. Mutan kecil merupakan khamir yang DNA mitokondrionnya mengalami mutasi sehingga

fungsi respirasinya terganggu dan tidak dapat memanfaatkan gliserol sebagai sumber karbon, namun dapat memanfaatkan gula sederhana seperti glukosa melalui proses fermentasi. Oleh karena itu, ukuran koloni mutan “petite” yang tumbuh pada media mengandung glukosa dan gliserol akan lebih kecil dibanding koloni sel normal (Sherman *et al.*, 1986). Namun pada penelitian ini belum dapat dipastikan bahwa koloni berukuran kecil tersebut merupakan mutan mengingat belum dilakukan kajian genetika terhadap koloni kecil tersebut.

Pada penelitian ini, koloni besar yang berasal dari perlakuan dengan ferrisitrat, atau ferrisitrat + EGCG menunjukkan kemampuan mereduksi MTT yang tinggi, sedang kemampuan koloni kecil yang berasal dari kultur yang diperlakukan dengan ferrisitrat serta ferrisitrat + EGCG dalam mereduksi MTT menjadi rendah (Foto 2 dan Tabel 3). Hal ini mengindikasikan bahwa zat besi yang berlebih yang terkandung pada *C. tropicalis* berpotensi merusak mitokondrion walau tidak membunuh selnya. Kerusakan ini belum bisa dipastikan bersifat permanen seperti pada mutan kecil mengingat zat besi yang terakumulasi secara berlebih sebagian dapat digunakan untuk sintesis heme oleh ferritin mitokondrion khamir, sehingga fungsi mitokondrion dapat menjadi pulih kembali (Sutak *et al.*, 2012). Pada *S. cerevisiae*, mutan kecil dapat dihasilkan dengan merusak mitokondrion oleh senyawa radikal bebas (Suzuki *et al.*, 2011). Mutan kecil kurang mampu mereduksi 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) karena terjadi mutasi pada gen suksinat dehidrogenase yang mengakibatkan reduksi MTT menjadi formazan terganggu bersamaan terganggunya respirasi (Goffrini *et al.*, 2009).

Mengingat salah satu carapengukuran viabilitas khamir dalam penapisan antibiotik sering menggunakan metoda reduksi MTT ini, maka perlu diperhatikan bahwa reduksi MTT belum tentu menggambarkan populasi sel yang hidup.

KESIMPULAN

Ferri sitrat dengan konsentrasi 5 mM merusak enzim yang diperkirakan terdapat pada mitokondrion

tanpa membunuh sel namun mengakibatkan timbulnya sel dengan ukuran koloni kecil, jika ditumbuhkan pada media YPDG. Peran senyawa radikal bebas dalam proses kerusakan yang diinduksi oleh zat besi ini belum dapat ditunjukkan. Bila sifat ini mirip pada sifat sel mamalia sehingga diharapkan dapat menjadikan khamir sebagai sel untuk memprediksi efek polutan logam berat pada kesehatan manusia.

Ucapan Terima Kasih.

Penelitian ini didukung oleh proyek Penguatan Manajemen Culture Collection untuk mendukung Biological Resources Center 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Berridge MV and AS Tan. 1993.** Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474-482.
- Chen OS, S Hemenway and J Kaplan. 2002.** Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: Implications for mammalian iron homeostasis. *PNAS* **99**, 16922-16927.
- Cotelle N. 2001.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **1**, 569-590.
- El-Baz AF and YM Shetaia. 2005.** Evaluation of different assays for the activity of yeast killer toxin. *International Journal of Agriculture & Biology* **7**, 1003-1006.
- Fai PB and A Grant. 2009.** A comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity against eight yeast species sensitivities to a range of toxicants. *Chemosphere*. **75**, 10478-10504.
- Fujimori T, H Takigami, T Agusa, A Eguchi, K Bekki, A Yoshida, A Terazono and FC Ballesteros Jr. 2012.** Impact of metals in surface matrices from formal and informal electronic-waste recycling around Metro Manila, the Philippines, and intra-Asian comparison. *J Hazard Mater.* **30**, 139-146.
- Goffrini P, T Ercolino, E Panizza, V Giache, L Cavone, A Chiarugi, V Dima, I Ferrero and M Mannelli. 2009.** Functional study in a yeast model of a novel succinate dehydrogenase subunit B gene germline missense mutation (C191Y) diagnosed in a patient affected by a glomus tumor. *Human Molecular Genetics* **18**, 1860-1868.
- Habtemariam. S. 1995.** Catechols and quercetin reduce MTT through iron ions: A possible artefact in cell viability assays. *Phytotherapy Research* **9**, 603-605.
- Hodgson VJ, GM Walker and D Button. 1994.** A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 201-206.
- Irazusta V, E Obis, A Moreno-Cermeño, E Cabisco, J Ros and J Tamarit. 2010.** Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 411-420.
- Julistiono H. 2006.** Superoxide dismutase and ethanol resistance by sodium chloride and lead in yeast *Candida* Y390.

- Jurnal Biologi Indonesia* **4**, 1-7.
- Julistiono H. 2011a.** Sifat proteksi ekstrak air panas teh hijau (*Camellia sinensis*) pada khamir *Candida tropicalis* yang diperlakukan dengan paracetamol. *BeritaBiologi* **10**, 763-770.
- Julistiono H. 2011b.** Efek proteksi ekstrak air panas buah mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. terhadap stres oksidasi akibat ferri sitrat pada khamir *Candida tropicalis*. *Berkala Penelitian Hayati* **17**, 73-76.
- Karthikeyan G, JH Santos, MA Graziewicz, WC Copeland, G Isaya, B Van Houten and MA Resnick. 2003.** Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Human Molecular Genetics* **12**, 3331-3342
- Kumar H, HW Lim, SV More, BW Kim, S Koppula, IS Kim and DK Choi. 2012.** The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci.* **13**, 10478-10504.
- Saono S and I Gandjar. 1974.** Hydrocarbon-utilizing soil yeasts from oil fields in Tjepu region (central java), Indonesia. *Annales Bogorienses* **5**, 123-129.
- Sherman F, RF Gerald and JB Hicks. 1986.** *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sutak R, A Seguin, R Garcia-Serres, J-L Oddou, A Dancis, J Tachezy, J-M Latour, J-M Camadro and E Le-suisse. 2012.** Human mitochondrial ferritin improves respiratory function in yeast mutants deficient in iron-sulfur cluster biogenesis, but is not a functional homologue of yeast frataxin. *Microbiology Open* **1**, 95-104.
- Suzuki SW, J Onodera and Y Ohsumi. 2011.** Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS ONE* **6(2)**, e17412. doi:10.1371/journal.pone.0017412.
- Vasquez-Vivar J, B Kalyanaraman and MC Kennedy. 2000.** Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J Biol Chem.* **275**, 14064-14069.