

# ISOLASI BAKTERI PROBIOTIK PENGHASIL PROTEASE DAN LAKTASE DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS HIJAU

Lidya Sari Utami<sup>1\*</sup>, Sumaryati Syukur dan Jamsari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Prodi Analisis Kesehatan STIKes Perintis Sumbar

<sup>2</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas

<sup>3</sup>Program Studi Bioteknologi, Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Andalas

## ABSTRAK

**Utami dkk.**, 2012. Isolasi bakteri probiotik penghasil protease dan laktase dari fermentasi kakao varietas hijau

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu mikroorganisme yang terlibat pada fermentasi kakao. Bakteri ini umumnya dapat dimanfaatkan sebagai probiotik yang memberikan keuntungan bagi manusia seperti, menghambat pertumbuhan bakteri patogen, menghasilkan berbagai enzim untuk kesehatan pencernaan, contohnya, laktase dan protease. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi, dan mengidentifikasi bakteri probiotik protease dan laktase dari hasil fermentasi kakao, sehingga nantinya dapat dijadikan sebagai sumber probiotik baru yang dapat digunakan dibidang kesehatan dan industri. Pulp kakao difermentasi selama 36 jam, suhu kamar pada media MRS Broth dan MRS agar didapatkan enam isolat bakteri. Bakteri yang didapatkan diuji ketahanan terhadap pH asam (pH 2, 2.5 dan 3), dan didapatkan empat bakteri yang dapat hidup pada kondisi asam, yang kemudian digunakan untuk uji antimikroba terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella thypi* NBRC14237. Zona hambat yang dihasilkan keempat isolat bakteri tersebut termasuk pada golongan yang sangat kuat (20 mM). Media TSIA (Triple Sugar Iron Agar) digunakan pada uji laktase, hanya dua isolat yang mampu menghasilkan laktase. Kedua isolat tersebut selanjutnya digunakan pada uji protease, didapatkan satu isolat (G6) memiliki zona bening terbesar (15mm). Kadar protease dari isolat G6 diukur dengan metode Lowry, dan didapatkan kadar protease maksimum adalah 0,88mg/mL pada waktu inkubasi 18 jam. Identifikasi genomik (16SrRNA) menggunakan primer 9F dan 1541R diketahui bahwa isolat G6 memiliki kesamaan 86% dengan *Lactobacillus brevis* strain FE.

**Kata kunci :** fermentasi kakao, bakteriasam laktat, 16S rRNA, Protease, Laktase

## ABSTRACT

**Utami et al.**, 2012. Isolation of protease and lactase probiotic bacteria fermented from cacao var. Green

Lactic acid bacteria (LAB) is a microorganism involved in the fermentation of cocoa. These bacteria are generally used as probiotics, because it has many benefits for humans, such as inhibiting the growth of pathogenic bacteria, and produce various enzymes, such as, lactase and protease. The goal of this study was to isolate and identify the probiotic bacteria producing protease and lactase from fermented cocoa as a new source of probiotics. Cocoa pulp fermented for 36 hours at room temperature, and the yields are six bacterial colonies which isolated on the MRS broth and MRS agar. The six isolates will be selected to resistance of acid pH (pH 2; 2.5 and 3), then the bacteria were used to antimicrobials test for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhi* NBRC14237. The yields showed that the inhibition zone (antimicrobial activities) of four isolates bacteria are powerful. TSIA medium (Triple Sugar Iron Agar) was used for lactase screening, and obtained two bacteria that produce lactase, then the isolates were tested for protease screening, and the yield is one isolate (G6) has a largest clear zone (15 mm). The Lowry method was used to determine of protease concentration, and the yield showed that maximum concentration of protease is 0.88mg/mL at 18 hours incubation time for isolate G6. The genomic identification of 16SrRNA used the 9F and 1541R primers resulted that the G6 isolate have 86% similarity with *Lactobacillus brevis* strain FE.

**Keywords :** cacao fermentation, lactic acid bacteria, 16S rRNA, Protease, Lactase

## PENDAHULUAN

Fermentasi kakao selama 24–48 jam didominasi oleh bakteri asam laktat (BAL) (Ardhana, 2003). Jenis bakteri ini umumnya digunakan sebagai probiotik, karena dapat hidup pada usus manusia, memiliki aktivitas antimikroba, serta berbagai enzim yang dapat

dimanfaatkan dibidang kesehatan seperti protease untuk penderita hiperglisemia, insomnia, dan osteoporosis, sedangkan laktase dapat membantu penderita intoleran laktosa (Yavuzdurmaz, 2007). Protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis

protein menjadi asam amino. Enzim ini secara komersial digunakan sebagai suplemen makanan dan digunakan pada terapi enzim. Laktase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan glikosida dari laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Enzim ini sangat dibutuhkan untuk mencerna laktosa yang terkandung pada susu. Kedua enzim ini dapat dihasilkan oleh probiotik.

## BAHAN DAN METODE

Media MRS Broth (*Merck*), MRS Agar (*Merck*), Nutrient Agar (*Merck*), reagen Lowry, Spektrofotometer (*Spectronic 20*), Sodium dedosil sulfat (SDS), Proteinase K, Etanol 90%, Isopropanol, Fenol: Clorofrm (PC) 1:10, Ammonuim asetat 3M, Primer 9F (5'-TGACTTTAGGTATAGCCAACTGG-3') dan 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3'), TE (Tris-EDTA) buffer, Agarose gel, Elektroforesis (*Mupid ExU*) dan PCR (BioRad)..

### Isolasi Probiotik

Kakao difermentasi selama 42 dan 36 jam (Ardhana, 2003). Hasil fermentasi kakao dikultur menggunakan MRS broth, dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri dikultur pada medium MRS agar selama 48 jam pada 37°C dengan kondisi anaerob. Beberapa koloni dipilih dan langkah selanjutnya adalah pemurnian koloni untuk mendapatkan isolat. Isolat yang didapat diuji dengan uji Gram. Selanjutnya dilihat kemampuan bakteri untuk tumbuh pada pH 2; 2,5; dan 3.

### Uji Antimikroba

Isolat hasil fermentasi kakao diuji kemampuan antimikroba dengan menggunakan medium NA (Nutrient Agar). Bakteri patogen yang digunakan yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella thypi* NBRC14237. Pengamatan terhadap zona bening dilakukan pada 18, 24, 48 dan 72 jam.

### Uji Enzim Laktase dan Protease

Media TSIA (Triple Sugar Iron Agar) digunakan untuk uji laktase, yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nutrien Agar yang mengandung susu skim 2% b/v digunakan untuk uji enzim Protease, dan diinkubasi dilakukan pada suhu 37°C, 24 jam. Timbulnya zona bening menandakan bakteri dapat menghidrolisis protein.

### Penetapan Kadar Protease

Bakteri dikultur selama 24 jam pada media cair yang telah ditambahkan dengan kasein 10%, kemudian diambil 3 mL dan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar protease dan

diukur kadar enzimnya (substrat yang digunakan yaitu kasein) dengan metode Lowry.

### Isolasi DNA Genomik

Untuk isolasi genomik DNA digunakan prosedur Cardinal, (1997). Bakteri yang telah dikultur selama semalam disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm, 3 menit, kemudian tambahkan TE bufer (Tris-EDTA), SDS 10% dan Proteinase K. Supernatan diinkubasi, setelah itu ditambahkan PC (Fenol:Clorofrm) 25:24. Supernatan yang didapat ditambah dengan amonium asetat 3M dan Isopropanol. DNA yang mengendap dicuci dengan etanol 70%. Pelet disuspensikan dengan TE bufer yang di simpan pada suhu -20°C.

### Amplifikasi Gen 16S rRNA

Duamikroliter DNA genomik yang didapatkan diamplifikasi menggunakan PCR. Primer yang digunakan adalah primer 9F (5'-TGACTTTAGGTATAGCCAACTGG-3') dan 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Total volume campuran untuk reaksi PCR 50µl (3µl MgCl<sub>2</sub>, ddH<sub>2</sub>O 35 µl, Primer masing-masing (10pmol/µl) sebanyak 1µl, dNTP (2mM) 5µl, DNA taq polimerase 5µl). Produk PCR dielektroforesis pada 100 V selama 40 menit pada 1% agarosa gel, dengan kondisi amplifikasi:

Step 1: 94°C selama 5 menit

Step 2: 94°C selama 1 menit (denaturasi)

Step 3: 56°C selama 1 menit (annealing)

Step 4: 72°C selama 1 menit (elongasi)

Step 5: 72°C selama 10 menit

40 siklus

### Sekuensing Gen 16S rRNA

Sampel yang telah dimurnikan dikirim ke Macrogen Korea Selatan untuk penentuan sekuen nukleotidanya. Sekuen data yang diperoleh kemudian dianalisis. Sekuen dibandingkan dengan *data base searches* 16SrRNA NCBI internet site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan program Blastn dan ClustalW.

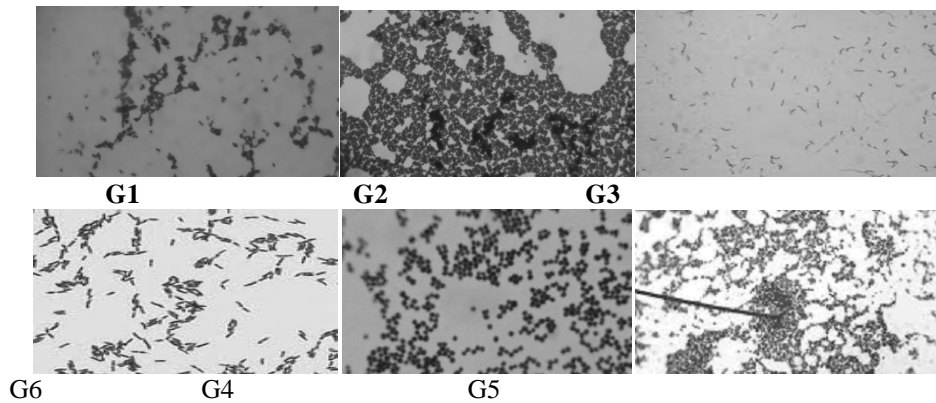
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Bakteri Hasil Fermentasi Kakao

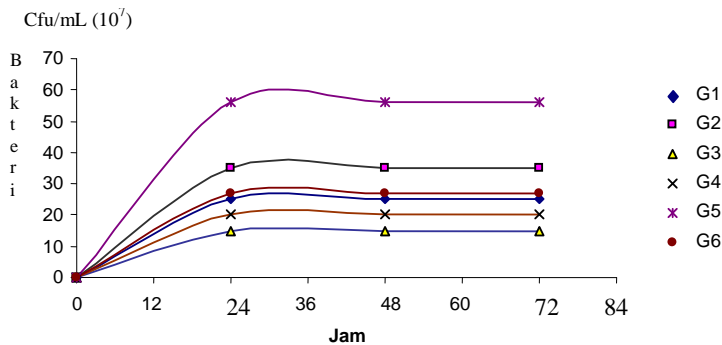
Isolasi bakteri yang telah dilakukan dari hasil fermentasi kakao varietas hijau pada media MRS (de Man, Ragosa, Sharpe) broth dan MRS agar berhasil mendapatkan 6 isolat tergolong bakteri asam laktat yang dipilih dari 63 koloni pada pengenceran 10<sup>-7</sup>. Morfologi keenam isolat diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, dan didapatkan hasil bahwa keenam isolat bakteri Gram positif (Gambar 1). Isolat G1, G2, G3, G4, G5, dan G6 yang mengalami pertumbuhan maksimum pada 24 jam dan mengalami fase stasioner 48 jam dan 72 jam. Kurva pertumbuhan bakteri dapat

dilihat pada Gambar 2. Kurva pertumbuhan diawali dengan fase awal (*lag phase*) yang merupakan masa penyesuaian mikrob yang terjadi pada saat beberapa jam setelah dikultur ke media MRS agar. Pada fase tersebut terjadi sintesis enzim oleh sel yang digunakan untuk metabolisme (Putranto, 2006). Reproduksi

selular terlihat pada 24 jam, yang ditandai dengan bertambahnya jumlah koloni bakteri, fase ini merupakan fase eksponensial bakteri. Fase stasioner terjadi pada 48 sampai 72 jam, dimana pertumbuhan bakteri tidak terjadi lagi.

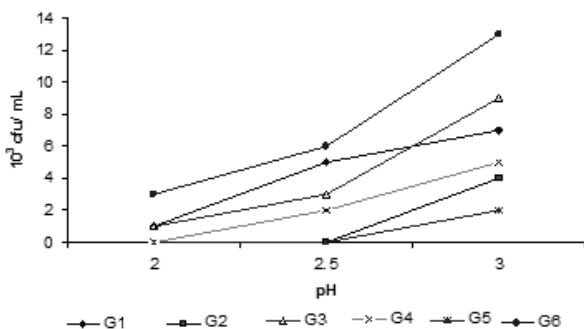


**Gambar 1.** Hasil pewarnaan Gram:keenam isolat berwarna ungu (Gram positif). G1 dan G2 berbentuk basil pendek,gemuk. G3 dan G6 memperlihatkan morfologi bakteri basil panjang dan pipih. G4 dan G5 berbentuk coccus



**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan enam isolat bakteri hasil fermentasi kakao varietas hijau. Pertumbuhan bakteri pada media MRS agar, dengan suhu inkubasi 37°C.

Pertumbuhan bakteri



**Gambar 3.** Pertumbuhan keenam isolat bakteri hasil fermentasi kakao pada pH asam Pada pH 2 hanya tiga isolat yang dapat tumbuh, untuk pH 2,5 empat isolat dapat tumbuh, sedangkan pada pH 3 semua isolat dapat tumbuh.

Hasil yang diperoleh dari uji resistensi terhadap pH asam memperlihatkan bahwa keenam isolat dapat tumbuh pada pH 3. Pada pH 2,5 empat isolat dapat tumbuh, yaitu G1, G3, G4, dan G6, sedangkan pada pH 2 hanya 3 isolat yang dapat bertahan hidup, yaitu G1, G3 dan G6 (Gambar 3). Kemampuan bakteri untuk tumbuh semakin berkurang sebanding dengan penurunan pH. Hal ini disebabkan oleh rusaknya struktur sel bakteri oleh pH yang rendah, sehingga bakteri tidak dapat tumbuh dan berkembang dengan baik (Jawetz, 1996).

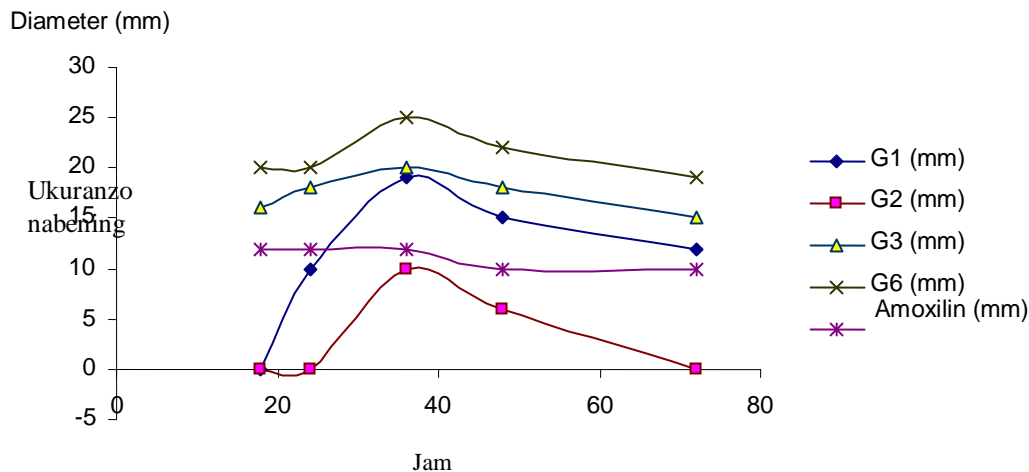
### Hasil Uji Antimikroba

Isolat G3 dan G6 memperlihatkan peningkatan sintesis senyawa antimikroba pada 18 jam, pada fase eksponensial terjadi peningkatan produksi metabolit

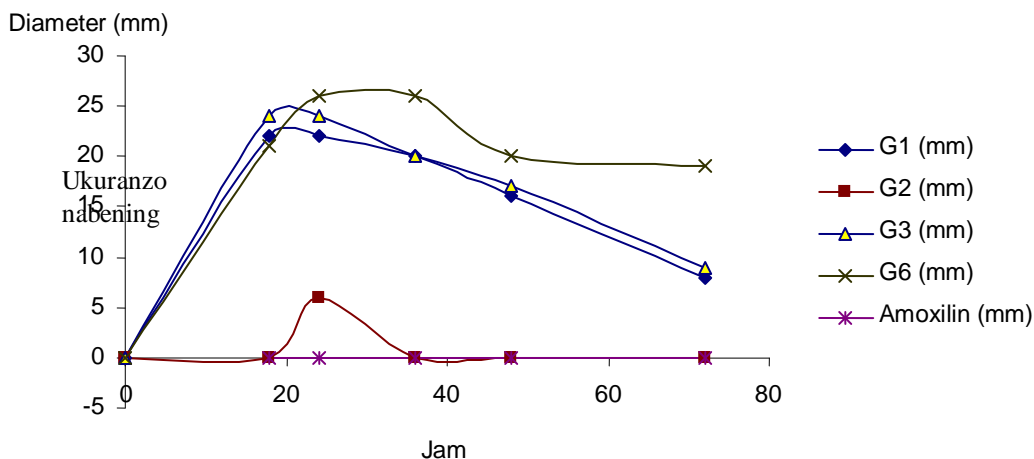
sekunder (senyawa antimikroba). Pertumbuhan zona bening terhadap *E.coli* maksimum untuk semua isolat pada 36 jam. Diameter zona bening pada uji antimikroba terhadap *Salmonella* maksimum pada 18–24 jam, sehingga pada 18–36 jam merupakan waktu yang baik untuk mengisolasi senyawa antimikroba, dimana saat tersebut merupakan waktu maksimum bagi bakteri untuk menghasilkan senyawa antimikroba, seperti bakteriosin.

Bakteriosin merupakan suatu protein ekstraseluler yang dapat menghambat sintesis protein

dan DNA bakteri patogen tanpa menyebabkan sel bakteri patogen mengalami lisis, dan asam laktat hasil dari fermentasi karbohidrat pada bakteri yang menyebabkan suasana asam yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Jawetz, 1996). Diameter zona bening mulai berkurang setelah 48 jam, karena fase ini merupakan fase stasioner selanjutnya menuju fase kematian pada bakteri. Pada fase tersebut, senyawa yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mulai habis, sedangkan bakteri patogen mulai berkembang dan resisten (Gambar 4 dan 5).



**Gambar 4.** Diameter zona bening keempat isolat bakteri hasil fermentasi kakao terhadap bakteri *E. Coli*. Inkubasi dilakukan pada 37°C, pH 7, media Nutrien Agar.



**Gambar 5.** Diameter zona bening isolat bakteri hasil fermentasi kakao terhadap *Salmonella thypii*. Inkubasi dilakukan pada 37°C, pH 7, media Nutrient agar

### Enzim Protease dan Laktase

Hasil uji TSIA pada 24 jam dengan suhu inkubasi 37°C mendapatkan dua isolat yaitu G3 dan G6 berwarna kuning (A atau asam), dan mengeluarkan

gas, sebagian media agar terangkat dan pecah. Hal ini disebabkan oleh terbentuknya asam laktat dan gas CO<sub>2</sub> hasil fermentasi laktosa oleh bakteri. Pada isolat G1 dan G2 warna media yang pada awalnya merah

(K atau basa) menjadi kuning (Tabel 2), tetapi tidak mengeluarkan gas, karena bakteri hanya memfermentasi glukosa menjadi asam laktat, sehingga diketahui bahwa isolat bakteri tersebut tidak memiliki laktase karena tidak dapat memfermentasi laktosa. Dari pengamatan tersebut dapat diketahui bahwa dua isolat, yaitu G3 dan G6 dapat memfermentasi laktosa menjadi asam laktat, artinya kedua isolat memiliki enzim laktase, maka untuk skrining protease digunakan dua isolat, yaitu G3 dan G6.

**Tabel 1.** Fermentasi laktosa oleh bakteri kakao pada media TSIA setelah 24 jam masa inkubasi

Isolat bakteri kakao	Hasil
Kontrol	K/K
G1	A/A
G2	A/A
G3	A/A dan gas
G6	A/A dan gas

**Tabel 2.** Diameter zona bening protease dari kedua isolat hasil fermentasi kakao varietas hijau. Bakteri diinkubasi selama 24 jam, pada suhu 37°C. Metoda yang digunakan untuk kultur bakteri yaitu metoda totol.

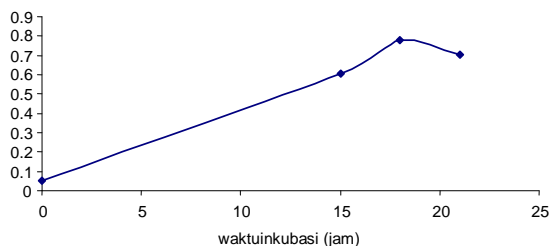
Isolat	Diameter
G3	5 mm
G6	15 mm

Bakteri yang menghasilkan protease dapat diketahui dengan adanya zona bening disekitar koloni. Kasein akan terhidrolisis menjadi peptide dan asam amino dengan adanya protease sehingga akan terbentuk zona bening pada media agar (Vuys, 2007). Hasil uji enzim protease setelah 24 jam, pada suhu inkubasi 37°C untuk kedua isolat yaitu G3 dan G6 memiliki zona bening disekitar koloni dengan diameter 5 mm dan 15 mm (Tabel 2). Berdasarkan besarnya diameter zona bening yang dihasilkan bakteri, maka isolat G6 digunakan untuk penentuan kadar enzim protease yang dihasilkan.

### Kadar Enzim Protease

Kadar protease kasar (*crude extract*) yang dihasilkan bakteri diukur dengan menggunakan metoda Lowry. Variasi waktu yang dilakukan yaitu 15, 18, dan 21 jam pada suhu 37°C. Protease maksimum dihasilkan pada 18 jam waktu inkubasi, yaitu 0,88 mg/mL (Gambar 6). Kadar enzim mengalami peningkatan (maksimum) setelah diinkubasi selama 18 jam karena bakteri berada pada fase pertumbuhan (eksponensial). Pada masa ini

jumlah sel bakteri meningkat, sehingga protease yang dihasilkan juga meningkat. Protease yang dihasilkan bakteri mengalami penurunan setelah 21 jam, karena bakteri mulai menghasilkan metabolit sekunder.



**Gambar 6.** Kurva penentuan kadar protease isolat G6 dengan variasi waktu inkubasi 12 jam, 15 jam dan 18 jam pada suhu 37°C.

### Identitas Molekuler

Setelah diperoleh DNA genomik, kemudian diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer 9F dan 1541R. Hasil penggabungan sekuen dibandingkan dengan data GeneBank melalui program BLASTn didapatkan hasil bahwa isolat G6 memiliki kesamaan nukleotida pada tingkat genomik dengan *Lactobacillus brevis*, dengan E value 0,0 nilai query coverage yang paling tinggi yaitu 95% dan maksimum identifikasinya 86%.

Pada perbandingan hasil sekuen isolat G6 dengan data gen dari *L. brevis* strain FE dengan menggunakan ClustalW, terlihat bahwa isolat G6 memiliki kesamaan dengan *L. brevis*. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Kostinek (2008) yang mendapatkan *L. Brevis* pada hasil fermentasi kakao di Nigeria. Isolat G6 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *L. Brevis* yang termasuk kelas *Bacillus*, ordo *Lactobacillales*, famili *bacillaceae*, genus *Lactobacillus* dan spesies *L. Brevis* (Makarova, 2006).

### KESIMPULAN

Ekstrak spons laut *Haliclona* sp. (Papua) menggunakan pelarut metanol dihasilkan bobot ekstrak 13,678 gram dengan rendemen 2,736%. Pada uji kualitatif pemeriksaan kandungan kimia senyawa alkaloid lebih dominan dibanding steroid dan triterpenoid. Spons *Haliclona* sp. memiliki aktivitas antimalaria karena dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dengan nilai IC<sub>50</sub> lebih kecil untuk galur resisten dari kontrol klorokuin

## DAFTAR PUSTAKA

- Bernan VE., Greenstein M., Maiese WM. 1997. Marine microorganism as a source of new natural products. Academic press. New York.
- Boesri H. 1994. Pemanfaatan Tanaman dalam Penanggulangan Malaria. Media Litbangkes. Vol. 4 (01).
- Bokesch HR., Stull AC, Pannell LK., McKee TR. 2002. A New pentacyclic sulfated hydroquinone from the marine sponge *Haliclona* sp. . *Tetrahedron Letters*. Vol. 43, Issue 16. 3079-3081.
- Conservation International. 2004. Freshwater Biotas of New Guinea and Nearby island: analysis of endemism, richness, and threats. Survey Report No. 004. Washington, D.C. pp 1-46.
- Faulkner DJ & Ghiselin MT. 1983. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Marine ecology progress series*. Oldendorf pres. Germany.
- Hanani E., Mun'im A., Sekarini R. 2005. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons callyspongia sp dari kepulauan seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II, No.3, 127 – 133.
- Harborne. 1987. Metode Fitokimia. Edisi kedua. Patmawinata K. Soediro I. Penerjemah. Terjemahan dari: Phytochemical methods. Bandung: ITB.
- Harvey A. 2005. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today*; 5, 294-300.
- Hentschel L., Fieseler M., Wehri C, Gernert C, Steiner M, Hacker J, Horn M. 2003. Microbial Diversity of Marine Sponges, Springer.
- Jha RK & Zi-rong X. 2004 . Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs*; 2, 123-1462.
- Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI. 2009. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* 325(5948): 2.
- McCarthy PJ. & Pomponi SA. 2004. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. *Marine Biomed. Res*, 1-2.
- McKenna SA., Allen GR., Suer Suryadi. 2002. A Marine Rapid Assessment of the Raja Ampat Islands. Conservation International. Washington DC.
- Miyaoka H, Shimomura M, Kimura H, Yamada Y. 1998. Antimalarial Activity of Kalihinol A and New Relative Diterpenoids from the Okinawan Sponge, *Acanthella* sp. *Tetrahedron*. 13467-13474.
- Opsenica I., Terzic N., Opsenica D., Milhous KW., Solaja B. 2004. 7,8,15,16-tetraoxo-*dispiro*[5.2.5.2]hexadecane-3-carboxylic acid derivatives and their antimalarial activity. Preliminary Communication. *J. Serb. Chem. Soc.* 69 (11) 919–922.
- Plowe CV. 2005. Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295: 55–79.
- Purwantiingsih. 2003. Artemisinin dari *Artemisia sacrorum*, Ledeb dan Turunannya sebagai Komponen Bioaktif Antimalaria. [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ross & Flaningan. 2006. Antimalaria drug. [www.healthatoz.com](http://www.healthatoz.com). [1 Januari 2010]
- Sathe M., Thavaselvam D., Srivastava AK., Kaushik MP. 2008. Synthesis and Antimalarial Evaluation of Cyclic  $\beta$ -Amino Acid-Containing Dipeptides.
- Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. 2003. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *Lancet Infect Dis* 3(11): 722.
- Sipkema D., Snijders APL., Schroen CGPH., Osinga R., Wijffels R. 2004. The life and death of sponge cells. *Biotechnol. Bioeng.* 85(3): 239–247.
- Sukardiman, Poerwono H., Mubarika S., Sismindari. 2002. Skrining aktivitas antikanker fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol dan ekstrak metanol benalu the (*Scurula krthopurpurea*) dengan molekul target enzim DNA topoisomerase. *Majalah Farmasi Airlangga* 2:72-75 [17 Februari 2010]
- Suganuma M., Fujiki H., Okabe S., Nishiwaki. 1992. Structurally different members of the okadaic acid class selectively inhibit protein serine/threonine but not tyrosine phosphatase activity. *Toxicon*. Vol.27. 110-131.
- Wet DH. 2005. An Ethnobotanical and Chemataxonomix Study of South African *Menispermaceae*. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree Philosophiae Doctor in Botany in the Faculty of Science at the at the University of Johannesburg.
- WHO (World Health Organization). 2008. In Vitro Microtest (Mark III) For The Assessment of The Response of *Plasmodium falciparum* to Chloroquin, Mefloquine, Quinine, Amodiaquine, Sulfadoxine/Pyrimethamine and Artemisinin. Division of Control of Tropical Diseases.
- Zhang K. & Rathod PK. 2002. Divergent Regulation of Dihydrofolate Reductase Between Malaria Parasite and Human Host. *Science*. Vol. 296. no. 5567, pp. 545 – 547.