

Isolation of Endophyte Fungi from Twigs maja (*Aegle marmelos* L.) as an Antibacterial Producer Against *Escherichia coli* Bacteria and *Staphylococcus aureus*

Nurhidayah Makmur¹, Herlina Rante², Yasnidar Yasir³

^{1,3} Fakultas MIPA, Universitas Islam Makassar, Makassar, Indonesia

² Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

Corresponding Author

Nurhidayah.19.084@gmail.com

ABSTRAK

Tumbuhan maja (*Aegle marmelos* L.) sebagai penghasil Antibakteri terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan fungi endofit dari ranting Maja yang dapat menghasilkan senyawa antibakteri. Tahap pertama isolasi fungi dengan metode direct seed planting pada medium Potato Dextrose Agar (PDA). Hasil isolasi fungi endofit diperoleh 3 isolat yang diberi kode IFRM 1, IFRM 2 dan IFRM 3. Selanjutnya dilakukan uji antagonis isolat fungi endofit terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, dari uji antagonis ketiga isolat tidak menunjukkan adanya daya hambat terhadap bakteri uji. Produksi metabolit sekunder dilakukan dengan fermentasi pada medium Potato Dextrosa Broth (PDB) dan ekstrak yeast. Isolat fungi endofit yang difermentasi didasarkan pada laju pertumbuhan fungi endofit. Proses fermentasi dilakukan selama 14 hari dengan kondisi teragitasi 150 rpm pada suhu kamar. Hasil fermentasi dionisasi kemudian di ekstraksi dengan etil asetat (1:1 v/v). Ekstrak etil asetat yang diperoleh diuji aktivitasnya pada *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%. Aktivitas antibakteri ditunjukkan pada konsentrasi 5% dan 10% dengan diameter hambat 6,47 mm, 7,19 mm dan 6,47 mm, 7,70 mm.

Kata Kunci: Antibakteri; Endofit; Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.)

PENDAHULUAN

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup dalam jaringan tumbuhan. Mikroba endofit berfungsi untuk mempertahankan eksistensi tumbuhan inang untuk tetap dapat bertahan hidup dan untuk melindungi dirinya dari predator. Hal ini membuat mikroba endofit secara terus-menerus memproduksi senyawa-senyawa kimia baru sebagai pertahanan untuk melindungi inangnya (Hasanuddin, Alim, and Rahma 2023; Rozirwan, Muda, and Ulqodry 2020).

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder yang sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan. Peluang dapat dilihat dari siklus hidup mikroba endofit lebih singkat dibandingkan siklus hidup tanaman inangnya (Radji 2011).

Umumnya tumbuhan memiliki satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur. Mikroba endofit yang diisolasi dari suatu tumbuhan obat dapat menghasilkan metabolit sekunder sama dengan tumbuhan aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari isolasi mikroba endofit tidak perlu dilakukan penebangan tumbuhan aslinya untuk diambil sebagai simplisia,

yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Hasanuddin, Jasmidi, and Abdillah 2021; Higginbotham et al. 2013; Rusman, yasnidar 2020).

Salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat adalah tumbuhan maja. Tumbuhan maja merupakan tumbuhan yang mudah tumbuh dan berkembang hampir di seluruh wilayah Indonesia serta sering digunakan sebagai obat tradisional. Buah maja sering digunakan sebagai obat disentri kronik, diare dan sembelit. Getah maja juga diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Patil, Kulkarni, and Patil 2010). Sehingga pada penelitian dilakukan uji aktivitas anti bakteri fungi endofit ranting maja terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf, bunsen, cawan petri, corong pisah, deck glass, gelas ukur, gelas kimia, inkubator, labu erlenmeyer, laminar air flow (LAF), lemari pendingin, ose bulat, objek glass, oven, penangas, pisau scalpel steril, pinset, spoit, tabung reaksi, timbangan analitik, mikroskop.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah air suling (H₂O), etanol (C₂H₅OH) 70%, etil asetat (C₄H₈O₂), Dimetil sulfoksida (DMSO), lachtofenol cotton blue, Natrium hipoklorit (NaOCl) 5,3%, Natrium klorida (NaCl) 0,9%, medium Mueller Hinton Agar (MHA), medium Potato Dextrosa Agar (PDA), Potato Dextrosa Broth (PDB), ekstrak yeast dan sampel ranting maja (*Aegle marmelos* L.).

Pengambilan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah tumbuhan maja (*Aegle marmelos* L.) bagian ranting diperoleh dari Kelurahan Bori Bellaya, Kecamatan Turikale, Kabupaten Maros, Provinsi Sulawesi Selatan.

Isolasi Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah ranting maja. Sampel dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat pada sampel, kemudian disterilkan permukaannya dengan cara didesinfeksi dengan alkohol 70% (1 menit), larutan natrium hipoklorit 5,3% (1 menit), lalu dicelupkan kembali dalam alkohol 70% (30 detik) dan dibilas dengan aquadest selama 1 menit (Alim et al. 2022; Hasanuddin et al. 2023).

Bagian ranting maja dipotong-potong secara membujur dengan pisau scalpel steril menjadi ukuran ± 1 cm. Bagian tersebut ditanam dalam medium PDA ditambahkan kloramfenikol 0,2 g/L. Eksplan air bilasan terakhir diinokulasi pada medium PDA yang ditambahkan kloramfenikol 0,2 g/L sebagai kontrol. Selama pengerjaan dibuat pula kontrol ruangan berupa cawan petri yang berisi medium PDA yang dibiarkan terbuka selama pengerjaan berlangsung, kontrol medium yang berisi medium dan kontrol sampel tanpa sterilisasi. Keseluruh cawan petri yang berisi sampel maupun kontrol diinkubasi pada suhu ruangan selama 5–14 hari. Dilakukan pengamatan setiap hari hingga tampak fungi yang tumbuh, kemudian fungi endofit tersebut dimurnikan pada medium PDA baru.

Pemurnian Fungi Endofit

Medium yang digunakan untuk pemurnian fungi endofit yaitu medium PDA yang baru. Kemudian diinkubasi pada medium PDA selama 5x24 jam pada suhu kamar. Pengamatan dilakukan terhadap bentuk dan warna koloni pada medium PDA. Koloni yang berbeda bentuk maupun warnanya disubkultur lagi pada medium PDA baru sampai diperoleh koloni murni (Hasanuddin, dkk., 2023).

Skrining Isolat Fungi Endofit sebagai Penghasil Antibakteri dengan Metode Uji Antagonis

Bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri diremajakan dalam medium MHA lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Bakteri uji diinokulasi dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% sesuai dengan kekeruhan Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL).

Fungi endofit dipotong $\pm 1 \times 1$ cm dan ditanam pada medium NA yang telah disuspensi dengan bakteri uji sebanyak 0,1 mL, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati zona bening yang terbentuk di sekitar bakteri uji.

Fermentasi Isolat

Isolat aktif difermentasi menggunakan medium Potato Dextrose Broth (PDB) dan

ekstrak yeast. Medium fermentasi dibuat sebanyak 1000 mL yang dibagi dalam 200 mL setiap wadah. Isolat dipotong pada cawan petri dengan ukuran $\pm 1 \times 1$ cm. Potongan tersebut kemudian diinokulasikan ke dalam medium dan digojok menggunakan shaker selama 14 hari secara konstan.

Ekstraksi Hasil Fermentasi

Penyaringan dilakukan untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi pada mikroba yang tumbuh di dalam media setelah fermentasi isolat. Cairan fermentasi diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (partisi) dengan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah selama 20 menit sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan larut etil asetat (lapisan atas) dan lapisan larut air (lapisan bawah).

Lapisan larut etil asetat dipindahkan ke wadah baru, sedangkan lapisan larut air ditambahkan lagi etil asetat (1:1 v/v) dan digojok kembali selama 20 menit. Lapisan larut etil asetat diuapkan dan lapisan larut air di freeze dryer. Biomassa digerus dalam lumpang dan diekstraksi menggunakan metanol (1:10 b/v) selama 1x24 jam kemudian disaring dan diuapkan. Biomassa diremaserasi kembali selama 1x24 jam kemudian disaring dan diuapkan.

Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* yang mewakili bakteri Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang mewakili bakteri Gram positif. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan paper disc. Ekstrak dibuat seri konsentrasi 2,5% (25mg/1mL), 5% (50mg/1mL), dan 10% (100mg/1mL) kemudian dilarutkan dengan DMSO 10%. Paper disk kemudian diteteskan 20 μ L sampel. Paper disk yang telah berisi sampel, dидiamkan hingga sampel menyerap sebelum diletakkan pada suspensi bakteri. Setelah sampel menyerap dalam paper disk, masing-masing paper disk ditanam di atas medium yang telah berisi mikroba uji (Hasanuddin, dkk., 2023).

Cakram Amoxicillin 25 μ g digunakan sebagai kontrol positif dan cakram yang berisi DMSO 10% digunakan sebagai control negatif. Pengukuran diameter zona hambat yaitu zona bening yang terbentuk di sekitar cakram dilakukan setelah diinkubasi dengan menggunakan jangka sorong.

Identifikasi Fungi Secara Mikroskopik

Fungi endofit yang dihasilkan diambil menggunakan ose bulat dan disuspensikan

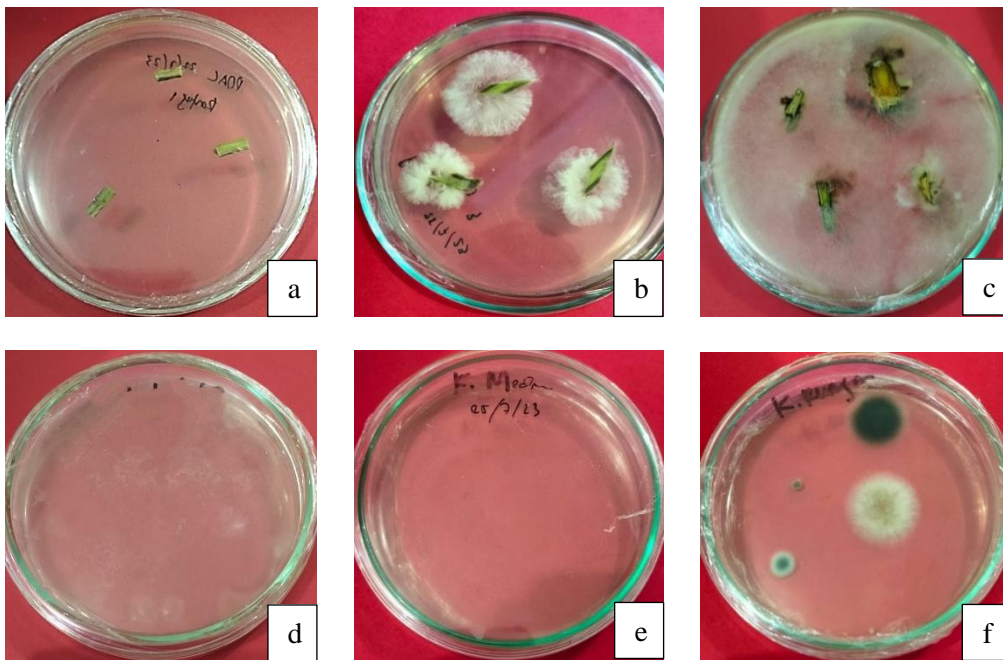
dengan air steril pada objek glass. Preparat dibiarkan mengering dan difiksasi dengan cara melewatkan pada nyala api bunsen, perlu dijaga agar tempat gesekan sampel tidak langsung tersentuh nyala api. Setelah preparaf mengering, dapat dilakukan pewarnaan menggunakan lactofenol cotton blue dan dibiarkan selama 1 menit. Kaca objek dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan hati-hati, kemudian diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran 40 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ranting maja (*Aegle marmelos* L.) yang berasal dari Kelurahan Bori Bellaya, Kecamatan Turikale, Kabupaten Maros. Ranting maja yang digunakan adalah ranting yang sehat dan segar untuk mencegah tumbuhnya mikroorganisme patogen.

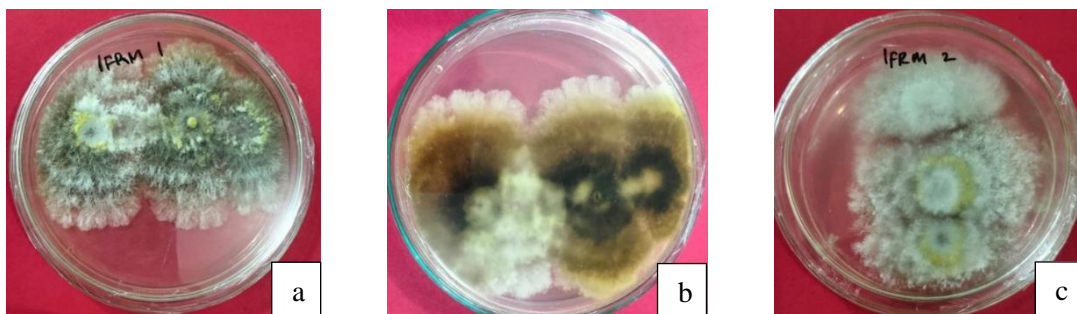
Sampel ranting maja terlebih dahulu dibersihkan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan sampel, maupun organisme epifit yang menempel pada permukaannya. Sterilisasi permukaan dilakukan untuk menghilangkan mikroba yang mencemari permukaan sampel sehingga yang tumbuh pada medium isolasi merupakan koloni endofit (Strobel and Daisy 2003).

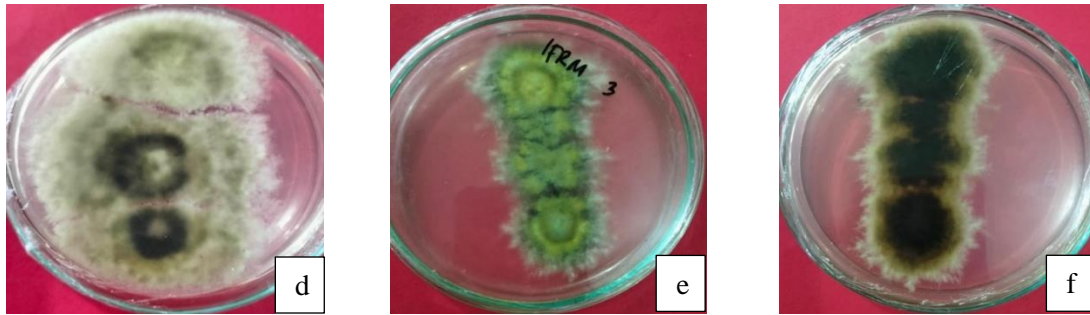
Isolasi fungi endofit dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi dari lingkungan. Isolasi fungi yang dilakukan menggunakan metode *direct seed planting* yaitu sampel langsung ditempelkan pada medium isolasi. Medium isolasi yang digunakan yaitu medium *Potato Dextrosa Agar* (PDA) yang mengandung nutrisi yang diperoleh dari mikroba yaitu ekstrak kentang sebagai sumber protein dan pepton sebagai sumber asam amino yang terdapat dalam medium. Penggunaan media PDA dengan penambahan klorampenikol bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri sehingga diharapkan hanya fungi yang tumbuh pada medium. Kontrol medium, control sampel tanpa sterilisasi permukaan dan control bilasan terakhir digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui terjadi kontaminasi atau tidak. Ranting maja yang telah diisolasi kemudian diinkubasi pada suhu 25° selama 3 hari dan diamati pertumbuhannya setiap hari (Ratnaningtyas, N.I.; Purnomowati,; Mumpuni, A.; Risyanto, S.; Dewi 2011).



Gambar 1. Isolasi Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.)
 Keterangan:
 a. Sebelum Inkubasi; b. Setelah Inkubasi; c. Kontrol Sampel Tanpa Sterilisasi Permukaan; d. Kontrol Bilasan Terakhir; e. Kontrol Media; f. Kontrol Ruang

Isolat fungi endofit ditumbuhkan kembali pada media PDA baru yang bertujuan untuk mendapatkan biakan murni dari masing-masing isolat. Hasil isolasi diperoleh 3 isolat fungi endofit yang diberi kode IFRM 1, IFRM 2 dan IFRM 3.





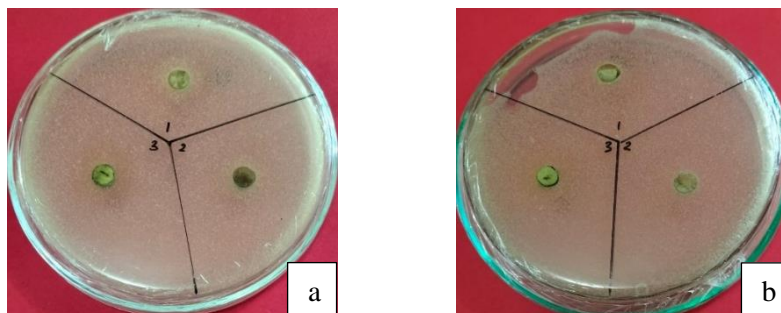
Gambar 2. Hasil Pemurnian Isolat Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.)

Keterangan:

- a. IFRM 1: Isolat Fungi Endofit Ranting Maja 1 tampak depan
- b. IFRM 1: Isolat Fungi Endofit Ranting Maja 1 tampak belakang
- c. IFRM 2: Isolat Fungi Endofit Ranting Maja 2 tampak depan
- d. IFRM 2: Isolat Fungi Endofit Ranting Maja 2 tampak belakang
- b. IFRM 3: Isolat Fungi Endofit Ranting Maja 3 tampak depan
- c. IFRM 3: Isolat Fungi Endofit Ranting Maja 3 tampak belakang

Pemurnian endofit bertujuan untuk memisahkan koloni endofit dengan mengamati perbedaan morfologi koloni. Pemurnian jamur dilakukan dengan cara mengambil miselium jamur yang tumbuh dengan menggunakan kawat ose steril, bagian dari jamur tersebut dipindahkan kembali ke media PDA steril. Hal yang sama juga dilakukan pada miselium jamur yang memiliki morfologi makroskopis koloni yang berbeda sampai dihasilkan biakan murni (Bara et al. 2015).

Hasil pemurnian isolat fungi endofit IFRM 1, FRM 2 dan IFRM 3 selanjutnya diuji antagonis untuk mengetahui aktivitas awal ketiga isolat dalam menghambat bakteri uji. Medium MHA tersebut kemudian diinokulasikan dengan bakteri uji yang telah disuspensikan menggunakan aquadest steril. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk memperoleh jumlah mikroba yang dapat diukur dan disesuaikan dengan standar kekeruhan *Mc. Farland* 0,5% ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) yang telah ditetapkan (Djide 2008).



Gambar 3. Hasil Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Keterangan:

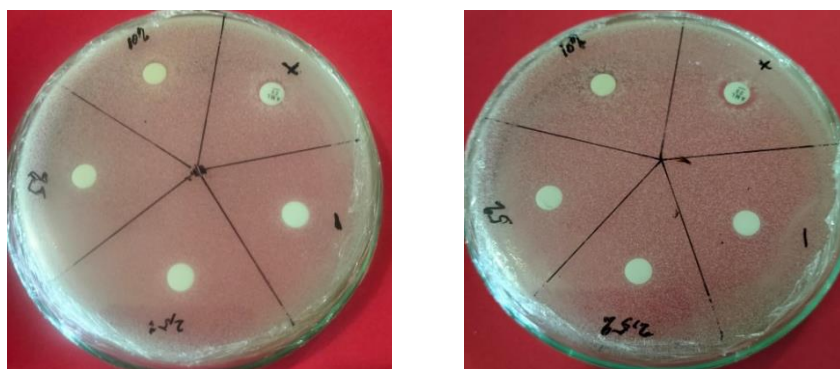
- a. Uji Antagonis terhadap Bakteri *Escherichia coli*

b. Uji Antagonis terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa ketiga isolat fungi endofit tidak menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak terbentuk zona bening di sekeliling isolat. Uji antagonis dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas awal isolat dalam menghambat bakteri uji. Fermentasi Isolat fungi endofit dilakukan dengan melihat isolat yang memiliki waktu pertumbuhan jamur yang cepat. Isolat yang memiliki laju pertumbuhan cepat berkode IFRM 1 yang kemudian dilakukan fermentasi. Medium fermentasi dibuat sebanyak 1000 mL yang dibagi dalam 200 mL setiap wadah.

Proses fermentasi dilakukan selama 14 hari karena pada hari ke 14 telah memasuki fase stasioner. Fase stasioner merupakan suatu keadaan seimbang antara laju pertumbuhan dengan laju kematian, dan pada fase ini akan menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Stanbury *et al* (2017) menjelaskan bahwa proses fermentasi dilakukan pada suhu kamar, karena produksi metabolit sekunder akan meningkat pada suhu 20–27°C. Penelitian Nasih (2009) menjelaskan bahwa proses fermentasi dari isolat fungi endofit dilakukan selama 14 hari untuk mendapatkan aktivitas antibakteri.

Hasil fermentasi fungi endofit dilakukan sonikasi selanjutnya dipisahkan menggunakan kertas saring dengan tujuan memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi diekstraksi menggunakan etil asetat (1:1) sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan larut etil asetat (lapisan atas) dan lapisan larut air (lapisan bawah), kemudian lapisan larut etil asetat diuapkan dan dilarutkan dengan DMSO.



Gambar 4. Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Hasil Fermentasi Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

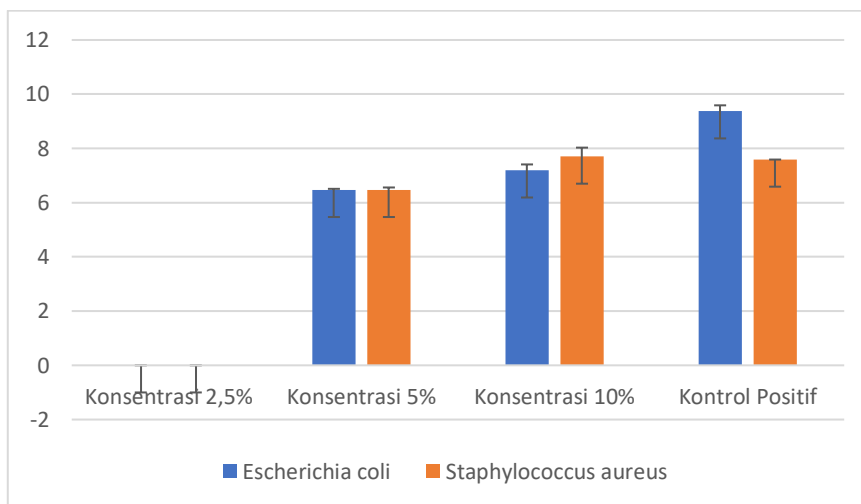
Keterangan:

- a. Uji Aktivitas terhadap Bakteri *Escherichia coli*
- b. Uji Aktivitas terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Ekstrak yang diperoleh dari isolat fungi endofit kemudian diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dengan tujuan untuk melihat apakah isolat tersebut memiliki potensi sebagai antibakteri.

Bakteri uji	Replikasi	Perlakuan				
		2,5 %	5%	10%	+	-
<i>Escherichia coli</i>	1	-	6,52	6,93	9,69	-
	2	-	6,42	7,16	9,22	-
	3	-	6,48	7,48	9,21	-
	Rerata ± SD	-	6,47±0,04	7,19±0,22	9,37±0,22	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	-	6,34	7,29	7,41	-
	2	-	6,51	8,12	7,57	-
	3	-	6,56	7,69	7,80	-
	Rerata ± SD	-	6,47±0,09	7,70±0,33	7,59±0,16	-

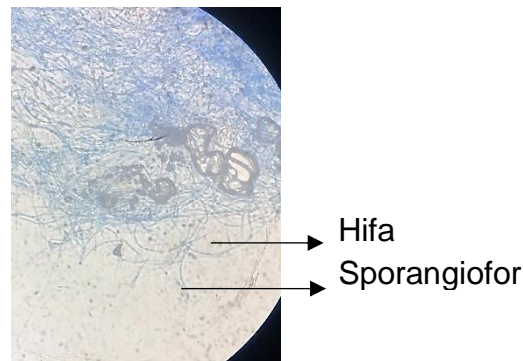
Tabel 1. Uji Aktivitas Ekstrak Hasil Fermentasi Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*



Gambar 5. Kurva Uji Aktivitas Ekstrak Hasil Fermentasi Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Ekstrak hasil isolasi fungi endofit ranting maja yang diperoleh menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dengan diameter hambat pada konsentrasi 2,5%: tidak menghambat (-), konsentrasi 5%: 6,47 mm, konsentrasi 10%: 7,19 mm. *Staphylococcus aureus* dengan diameter hambat pada konsentrasi 2,5%: tidak menghambat (-), konsentrasi 5%: 6,47 mm, dan konsentrasi

10%: 7,70 mm. Diameter zona hambat yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* memiliki daya hambat yang tergolong sedang. Aktivitas zona hambat antimikroba dikelompokkan menjadi empat kategori, yaitu: aktivitas lemah (<5 mm), sedang (5–10 mm), kuat (>10–20 mm), sangat kuat (>20–30 mm). Aktivitas daya hambat antimikroba dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram (Morales et al. 2003).



Gambar 6. Pengamatan Secara Mikroskopik Isolat Fungi Endofit Ranting Maja (*Aegle marmelos* L) pada Perbesaran 40

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa isolat fungi endofit ranting maja (*Aegle marmelos* L.) dengan kode isolat IFRM 1 memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* hingga 5% dengan daya hambat masing-masing 6,52 mm, 6,42 mm, 6,48 mm dan 6,34 mm, 6,51 mm, 6,56 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Alim, Nur, Tahirah Hasan, Rusman Rusman, Jasmiadi Jasmiadi, and Zulfetri Zulfetri. 2022. "Phytochemical Screening, Relationship of Total Phenolic with Antioxidant Activity Of Ethanol and Methanol Extracts of Kesambi (*Schleichera Oleosa* (Lour.) Oken) Bark." *Jurnal Ilmiah Sains* 22(2):118.
- Bara, Robert A., Grace D. Kandou, Antonius R. B. Ola, and Jimmy Posangi. 2015. "Analisis Senyawa Antibiotik Dari Jamur Simbion Yang Terdapat Dalam *Ascidia Didemnum Mole* Di Sekitar Perairan Bunaken-Sulawesi Utara." *Jurnal LPPM Bidang Sains Dan Teknologi* 2(2):28–35.
- Djide, M. N. dan Sartini. 2008. *Analisis Mikrobiologi Farmasi*. Makassar: UNHAS.
- Hasanuddin, Rusman, Nur Alim, and Ahmad Fauzan. n.d. "Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daging Buah Beligo (*Benincasa Hispida* (Thunb.) Cogn.)

Terhadap Escherichia Coli Dan Staphylococcus Aureus Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Beligo Fruit Meat (Benincasa Hispida (Thunb .) Cogn .) Agains.” 1(3):14–21.

Hasanuddin, Rusman, Nur Alim, and Nur Riska Rahma. 2023. “Characterization of Endophytic Fungi in Robusta Coffee (Coffea Canephora L .) Beans Through 18S RRNA Gene Sequencing and Evaluation of Antioxidant Activity and Chlorogenic Acid Content.” 9(11):9964–72.

Hasanuddin, Rusman, Jasmiadi Jasmiadi, and Nurliana Abdillah. 2021. “The Analysis of the Chlorogenic Acid in the Ethanol Fraction of Robusta Coffee Beans and Its Effect on Glucose Levels in Wistar Rats.” *Disease Prevention and Public Health Journal* 15(2):118.

Higginbotham, Sarah J., A. Elizabeth Arnold, Alicia Ibañez, Carmenza Spadafora, Phyllis D. Coley, and Thomas A. Kursar. 2013. “Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants.” *PLoS ONE* 8(9).

Morales, Glauco, Patricia Sierra, Arlett Mancilla, Adrián Paredes, Luis A. Loyola, Oscar Gallardo, and Jorge Borquez. 2003. “Secondary Metabolites from Four Medicinal Plants from Northern Chile: Antimicrobial Activity and Biototoxicity against Artemia Salina.” *Journal of the Chilean Chemical Society* 48(2):13–18.

Patil, D. N., A. R. Kulkarni, and B. S. Patil. 2010. “Fruit Gum of Aegle Marmelos as Pharmaceutical Aid.” *International Journal of Pharmacology* 6(1):68–71.

Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi Dan Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Ratnaningtyas, N.I.; Purnomowati,; Mumpuni, A.; Risyanto, S.; Dewi, R. S. 2011. *Petunjuk Praktikum Mikologi*. Purwokerto: Universitas Jendral Soedirman.

Rozirwan, Hebbri Iskandar Muda, and Tengku Zia Ulqodry. 2020. “Short Communication: Antibacterial Potential of Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediment in Tanjung Api-Api, South Sumatra, Indonesia.” *Biodiversitas* 21(12):5723–28.

Rusman, yasnidar, Risman. 2020. “Isolasi Bakteri Rhizosfer Penghasil Antimikroba Tanah Disekitaran Akar.” 1(2):0–4.

Strobel, Gary, and Bryn Daisy. 2003. “Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):491–502.