

OPTIMASI WAKTU FERMENTASI JAMUR SIMBION DARI SPONGE *Rhabdastrella* SP. DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA

*Mahfur Mahfur**, *Khafid Mahbub*, *Nada Safira Salsabila*, *Maulida Nur Istiqomah*
Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pekalongan,
Pekalongan, Indonesia

*Email: mahfur.isfa@gmail.com

ABSTRAK

Spons diketahui memiliki banyak kandungan senyawa metabolit yang berpotensi sebagai bahan baku obat dan memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan mikroorganisme. Spons *Rhabdastrella* diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder terutama golongan Triterpenes. Proses fermentasi merupakan metode yang digunakan untuk menghasilkan produk metabolit sekunder dalam jumlah melimpah yang berasal dari mikroorganisme seperti jamur simbion. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu lama fermentasi yang paling optimal pada jamur simbion *Rhabdastrella* sp. dengan melihat metabolit sekunder yang dihasilkan dan aktivitas antibakteri nya. Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental. Kultivasi dari spons *Rhabdastrella* sp. untuk memperoleh pertumbuhan jamur simbion. Dilanjutkan dengan proses fermentasi dengan variasi waktu, yaitu 2, 4, 6, 8,10,12, dan 14 hari untuk mendapatkan metabolit sekunder yang dihasilkan. Ekstraksi cair dilakukan untuk mendapatkan metabolit sekunder. Tahap akhir adalah dengan melihat profil KLT dan pengujian antibakteri ekstrak dengan metode difusi sumuran. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu lama fermentasi mempengaruhi metabolit sekunder yang diperoleh, dan aktifitas antibakteri nya. Profil metabolit sekunder yang terlihat dari hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan waktu ke 12 hari fermentasi memiliki metabolit sekunder yang kompleks dan rendemen yang paling tinggi dan memiliki zona hambat sebesar $12.5 \pm 0,26$ mm.

Kata kunci: Jamur simbion, Fermentasi, Spons, *Rhabdastrella* sp, Antibakteri

ABSTRACT

Sponges are known have many metabolites compounds and potential to be used as raw materials for medicines. sponges are have the ability to form symbiosis with microorganisms. Rhabdastrella sp is have to contain various secondary metabolites, especially the Triterpenes group. The fermentation process is a method to produce abundant secondary metabolite from microorganisms such as symbiont fungi. This study aims to determine the optimal fermentation time for the symbiont fungus Rhabdastrella sp. by looking at the secondary metabolites produced and their antibacterial activity. This research is included of experimental research. Cultivation of the sponge Rhabdastrella sp. for the growth of symbiont fungi. Followed by a fermentation process with variations in time with 2,4,6,8,10,12, and 14 days to get the secondary metabolites produced. Liquid liquid extraction was carried out to obtain secondary metabolites. The final stage is TLC profile and test the antibacterial activity of extract using the well-diffusion method. The results

showed that the long fermentation time affected the secondary metabolites obtained, and their antibacterial activity. The profile of secondary metabolites showed that the 12th day of fermentation had the most complex secondary metabolites and the highest yield and had a clear zone of 12.5 ± 0.26 mm.

Keywords: *Symbiont fungi, Fermentation, Sponge, Rhabdastrella sp, Antibacterial*

PENDAHULUAN

Spons merupakan organisme invertebrata dari filum porifera yang hidup menetap yang memiliki sifat *filter feeder*^{1,2}. Spons diketahui memiliki banyak kandungan senyawa metabolit yang berpotensi sebagai bahan baku obat^{2,3}. Spons sebagai sumber senyawa bioaktif baru dan bahan baku obat menjadi yang terbesar dibandingkan dengan produk laut lainnya⁴. Identitas lain terkait spons adalah kemampuan untuk bersimbiosis dengan mikroorganisme lain secara mutualisme, baik secara inter maupun intra selular⁵. Secara umum struktur tubuh spons adalah berpori, tidak memiliki organ yang sejati dan dapat menjadi habitat bagi mikroorganisme lain⁶. Berbagai komunitas mikroba yang bersimbion dengan spons merupakan sumber lain penghasil produk alami yang memiliki aktivitas biologis yang bersifat sitotoksik, antimikroba, antioksidan, anti inflamasi dan masih banyak lagi^{7,8}. Banyak sekali

senyawa metabolit sekunder yang telah ditemukan pada beberapa tahun terakhir dari jamur yang bersimbiosis dengan spons⁹. Sekitar hampir 8% metabolit sekunder dari inang diproduksi oleh mikroorganisme simbion¹⁰.

Sponsge *Rhabdastrella sp* merupakan spons kelas Demospongiae, kelas ini merupakan kelas terbesar yang mencakup 90% dari seluruh jenis spons⁵. Spons ini berwarna coklat pudar, kekuningan, dan sebagian tertutup lumpur, permukaan spons bertekstur keras. Memiliki bentuk yang tidak beraturan dan terdapat pori-pori untuk saluran keluar dan masuknya air. Spons *Rhabdastrella* diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder terutama golongan Triterpenes¹¹. Isomalabaricane Triterpenes adalah jenis senyawa yang berhasil diisolasi dari Sponsge *Rhabdastrella sp*. dan memiliki aktivitas anti cancer¹¹. Jenis spons *Rhabdastrella* yang lain yaitu *Rhabdastrella globostellata*

berhasil diisolasi senyawa Rhabdastrenones A–D. Spons *Rhabdastrella sp* tidak bisa dijadikan sumber utama bahan metabolit sekunder dikarenakan jumlah yang sangat terbatas, akan tetapi dapat memanfaatkan jamur yang bersimbion dengan spons tersebut. Alternatif jamur simbion bisa digunakan dengan memanfaatkan bioteknologi fermentasi.

Proses fermentasi merupakan metode yang digunakan untuk menghasilkan produk metabolit sekunder yang bersifat unggul dan dalam jumlah melimpah yang berasal dari mikroorganisme seperti jamur simbion. Banyak faktor yang mempengaruhi proses fermentasi tersebut salah satunya adalah variable waktu. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui waktu lama fermentasi yang paling optimal pada jamur simbion *Rhabdastrella sp*. dengan melihat metabolit sekunder yang dihasilkan dan aktivitas antibakteri nya.

METODE PENELITIAN

Alat Dan Bahan.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikro pipet,

hand refractometer, plastic wrap, alumunium foil, sumuran, jangka sorong, autoclave, Leminar Air Flow (LAF), inkubator, oven, hot plate, plat silica gel GF 254, jangka sorong, dan water bath. Bahan yang digunakan adalah *fungus* Spons *Rhabdastrella sp* yang diambil dari Gili Layar, Sekotong, Lobok Barat, NTB., Bakteri *Eschericia coli*, media Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Himedia, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) Himedia, Muller Hinton Agar (MHA) Himedia, Aquadest, Natural Sea Salt, Natrium Klorida dari Widatra Bhakti, Ciprofloxacin injeksi, alkohol 70%, Etil asetat pro analisis, N-hexsan, Kloroform, Methanol.

Identifikasi spons.

Dilakukan identifikasi di Laboratorium marine natural product Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia untuk memastikan kebenaran identitas sponsge yang digunakan.

Kultifasi jamur simbion.

Rhabdastrella sp dibersihkan bagian permukaannya dengan *sea salt* steril. Kultivasi dengan menanam bagian kecil dari spons *Rhabdastrella*

sp pada cawan petri yang berisi media SDA saline dan kloramfenikol sebanyak 1 mL, dibudidayakan pada penyimpanan 37°C selama 5-7 hari untuk mendapatkan biakan jamur simbiosis *Rhabdastrella sp*¹².

Pemurnian jamur dan kultur.

Tahapan kultivasi akan diperoleh beberapa jamur yang tumbuh dalam media SDA saline. Jamur simbiosis yang dipilih adalah jamur yang tumbuh dominan dalam kultivasi tersebut. Jamur dominan di kultur ulang untuk memperoleh koloni yang terdiri dari 1 jamur saja. Kultur jamur yang mendominasi dilakukan pada media SDA saline dengan teknis steril dan diinkubasi selama 14 hari.

Fermentasi jamur simbiosis.

Fermentasi dilakukan dengan waktu inkubasi menggunakan variasi hari yaitu 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 hari. Inkubasi dilakukan dengan menggunakan metode inkubasi shaker dengan menggunakan media SDB (Subboroud Dextrose Broth) saline. Beberapa bagian jamur hasil kultur dimasukkan ke dalam 200 ml media SDB saline.

Eksraksi metabolit sekunder.

Tahapan fermentasi akan memperoleh dua bagian yaitu bagian miselia dan supernatan. Dilakukan pemisahan antara miselia jamur dan supernatan hasil fermentasi. Supernatan yang diperoleh diekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1. Hasil ekstraksi diuapkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 60°C¹³

Identifikasi profil metabolit.

Identifikasi metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silika GF254 dan fase gerak yang digunakan adalah kloroform : metanol (9:1). Pereaksi semprot yang digunakan adalah dengan menggunakan vanillin asam sulfat.

Uji antibakteri ekstrak.

Pengujian dilakukan pada media Mueller Hinton Agar (MHA). Bakteri yang sudah diinokulasi, diambil dengan ose untuk membuat suspensi bakteri dengan kesamaan konsentrasi 0.5% McFarland. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 25 mg/ml. Suspensi bakteri selanjutnya

diolahkan pada media MHA yang berjumlah sebanyak 2 petri, masing-masing dibagi menjadi 4 bagian untuk pengujian sample ekstrak hasil dari variasi hari fermentasi dan inkubasi pada suhu 38°C selama 24 jam. Uji bakteri ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Area jernih (*clear zone*) di sekeliling sumuran menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri kemudian diukur dengan jangka sorong dan dihitung^{14,15}

HASIL DAN PEMBAHASAN

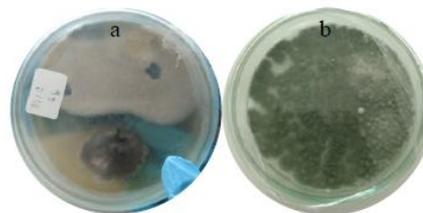
Identifikasi spons.

Hasil identifikasi di Laboratorium Marine Natural Product Universitas Diponegoro berdasarkan surat no. Idn.201101-Sp menunjukkan bahwa spons yang digunakan termasuk spesies *Rhabdastrella sp.*

Kultivasi jamur simbion.

Hasil kultivasi menunjukkan terdapat 2 jenis jamur yang tumbuh (Gambar 1). Jamur dominan dipilih untuk dilanjutkan ke tahap berikutnya. kemudian diinokulasikan ke media SDA salin baru untuk dilakukan pemurnian. Pemurnian dilakukan untuk mendapatkan

pertumbuhan jamur simbion koloni murni pada setiap cawan petri (Ginting et al., 2019). Setelah dilakukan pemurnian selama 14 x 24 jam didapatkan isolat jamur murni yaitu isolat yang mengandung satu bentuk morfologi koloni yang sama. Jamur dominan yang awalnya memiliki koloni berwarna putih berubah menjadi berwarna hijau setelah kultur selama 14 hari. Hal tersebut bisa terjadi karena ada proses adaptasi dengan lingkungan yang ada pada media pertumbuhan. Pertumbuhan awal pada proses kultivasi dalam satu lingkungan terdapat 2 jamur. Tahapan pemurnian lingkungan media hanya terdapat satu jamur saja. Isolat jamur murni yang diperoleh dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu fermentasi, dengan tujuan untuk memperbanyak jamur simbion^{12,18}



Gambar 1. a.) Hasil kultivasi spons *Rhabdastrella sp.* b.) kultur fungus dominan simbion

Fermentasi jamur simbion.

Media SDB (*subboroud dextrose broth*) salin adalah media yang digunakan padatahapan fermentasi. Media cair SDB adalah media yang cocok untuk pertumbuhan jamur karena mengandung dextrosa, karbohidrat, nitrogen, dan memiliki pH yang sesuai yaitu 5-6¹⁰. Sejumlah bagian jamur dimasukan kedalam 200 ml media SDB salin. Inkubasi dilakukan dengan menggunakan metode inkubasi *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Proses fermentasi dengan menggunakan media cair akan membuat jamur tersebut menghasilkan senyawa bioaktif. Fermentasi mikroorganismen dalam hal ini dipengaruhi oleh lingkungan pertumbuhan. Faktor yang mempengaruhi mikroorganismen meliputi suhu, pH, dan salinitas osmotik, sumber karbon, nitrogen, dan nutrisi dalam media kultur (Gutiérrez et al., 2020).

Waktu fermentasi menjadi *variable* bebas yaitu hari ke 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 hari. *Variable* waktu tersebut didasarkan pada fase pertumbuhan mikroorganismen¹⁰. Fase pertumbuhan meliputi fase beradaptasi dengan kondisi

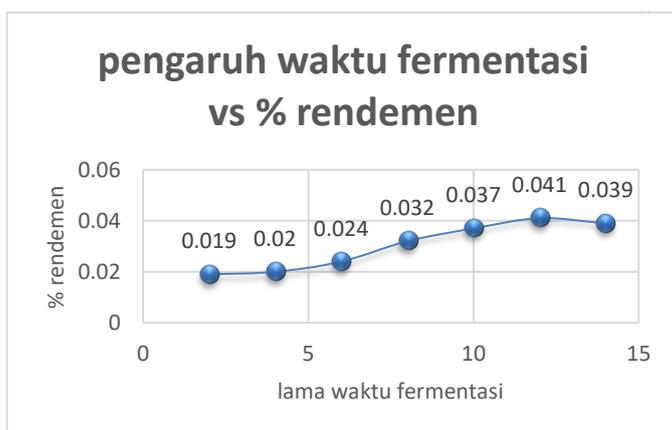
lingkungannya, fase peningkatan jumlah biomasa, selanjutnya pertumbuhan bisa berlanjut dikarenakan adanya lisis pada sel mati yang digunakan sebagai sumber nutrisi, dan fase kematian²².

Eksraksi metabolit sekunder.

Ekstraksi isolat jamur simbion dari spons *Rhabdastrella sp.* dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dari supernatan hasil fermentasi sesuai dengan penelitian sebelumnya (Kjer et al., 2010).

Hasil ekstraksi diperoleh rendemen pada masing masing hari fermentasi secara berturut turut adaah sebagai berikut, hari ke-2 mendapatkan rendemen sebanyak 0.019% b/v, hari ke-4 sebanyak 0.02% b/v, hari ke-6 sebanyak 0.024% b/v, hari ke-8 sebanyak 0.032% b/v, hari ke-10 sebanyak 0.037% b/v, hari ke-12 sebanyak 0.041% b/v dan hari ke-14 sebanyak 0.039% b/v dapat dilihat pada (Gambar 2). Hasil rendemen yang diperoleh menggambarkan bahwa waktu fermentasi mempengaruhi jumlah rendemen. Puncak pertumbuhan dari fermentasi fungi simbion *Rhabdastrella sp* bisa

disimpulkan terjadi pada hari ke 12 jika dilihat dari rendemen yang dihasilkan. Semakin banyak rendemen yang diperoleh, maka semakin banyak juga metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak tersebut.



Gambar 2. Kurva pengaruh waktu fermentasi dengan % rendemen yang dihasilkan

Identifikasi profil metabolit.

Hasil identifikasi kandungan metabolit sekunder ekstrak etil asetat jamur simbiosis menunjukkan bahwa ekstrak mengandung beberapa golongan senyawa kimia. Adapun identifikasi golongan senyawa kimia yang dianalisis dengan menggunakan pereaksi semprot untuk masing-masing golongan senyawa kimia diperoleh hasil seperti pada tabel 1.

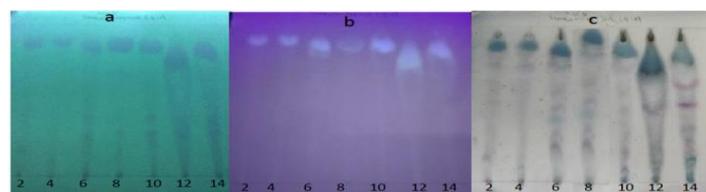
Tabel 1. Hasil identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder.

Nama senyawa	Hasil pengamatan
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Steroid/Triterpenoid	+
Fenolik	+

Profil KLT dari masing-masing ekstrak hasil waktu fermentasi menunjukkan hasil yang berbeda,

mana hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu fermentasi mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan (Gambar 3). Waktu fermentasi yang semakin lama menunjukkan profil KLT yang semakin banyak kandungan senyawa

Hari ke 12 sampai hari ke 14 fermentasi terlihat memiliki profil yang lebih kompleks dibandingkan waktu fermentasi yang lain.



Gambar 3. Hasil KLT ekstrak etil asetat fungus symbiosis spon *Rhabdastrella sp.* a) UV 254 b) UV366 c) pereaksi vanillin as. Sulfat

Uji antibakteri ekstrak.

Uji aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* ATCC 25922 dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Pengujian antimikroba ini bertujuan untuk

mengetahui aktivitas antimikroba dari jamur simbiosis yang berasosiasi dengan spons *Rhabdastrella sp.* Aktivitas antibakteri yang muncul dikarenakan ekstrak etil asetat jamur simbiosis mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, fenolik dan flavonoid (tabel 1) dengan melakukan penghambatan pertumbuhan pada pembentukan DNA dan RNA, fungsi membran sel, dan penggunaan oksigen oleh bakteri.^{25,26}

Hasil yang diperoleh dalam pengujian antibakteri terhadap *E-coli* yaitu dengan adanya zona bening yang ada di sekitar sumuran. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona bening tersebut menggunakan jangka sorong. Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam. Hasil pengujian antibakteri dari ekstrak etil asetat hasil fermentasi hari ke 2 sampai hari ke 14 secara berturut-turut menunjukkan zona hambat seluas 7.5 ± 0.01 mm, 7.73 ± 0.01 mm, 8.36 ± 0.2 mm, 10.5 ± 0.4 mm, 11.8 ± 0.72 mm, 12.5 ± 0.26 mm, 12.6 ± 0.36 mm (Gambar 4 dan Table 2). Kriteria aktifitas antibakteri berdasarkan zona hambat mengikuti penggolongan

yang sebelumnya, dimana penggolongan kriteria terbagi menjadi 4 kriteria, yaitu lemah, sedang, kuat, dan sangat kuat²⁷. Hasil pengujian antibakteri ekstrak etil asetat fungus simbiosis menunjukkan 2 kriteria, yaitu kriteria sedang dan kriteria kuat.

Tabel 2. Hasil pengujian antibakteri terhadap *E-coli*.

Waktu fermentasi (hari)	Zona hambat (mm)	kriteria
2	7.5 ± 0.1^a	Sedang
4	7.73 ± 0.01^a	Sedang
6	8.36 ± 0.2	Sedang
8	10.5 ± 0.4^b	Sedang
10	11.8 ± 0.72^{bc}	Kuat
12	12.5 ± 0.26^c	Kuat
14	12.6 ± 0.36^c	Kuat
kontrol -	0	-

*) Data disajikan dalam rata-rata \pm SD.

^{a,b,c} menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna $P > 0.05$



Gambar 4. Hasil pengujian antibakteri ekstrak berdasarkan optimasi waktu fermentasi jamur simbiosis.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu fermentasi mempengaruhi hasil ekstrak yang dihasilkan dan juga mempengaruhi

aktivitas antibakteri nya. Fermentasi hari ke 12 memiliki profil metabolit yang kompleks dan hasil rendemen yang lebih banyak serta memiliki zona hambat yang lebih baik dibandingkan dengan hari yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan untuk Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Pekalongan yang sudah memberikan hibah pendanaan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Haedar *et al.* Potensi Keanekaragaman Jenis Dan Sebaran Spons Di Perairan Pulau Saponda Laut Kabupaten Konawe. *J. Sapa Laut (Jurnal Ilmu Kelautan)* **1**, 1–9 (2016).
2. Mahfur, M., Setyowati, E. P., Wahyuono, S. & Purwantini, I. Sponge *Hyrtios reticulatus*: Phytochemicals and Bioactivities. *Res. J. Pharm. Tech.* **15**, 1–7 (2022).
3. Mahfur, M., Wahyuono, S., Purwantini, I. & Setyowati, E. P. In vitro antiplasmodial activities of the fractions of *Hyrtios reticulatus* sponge extract. *J. Appl. Pharm. Sci.* **12**, 114–120 (2022).
4. Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C. & Zhang, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar. Drugs* **12**, 4539–4577 (2014).
5. Marzuki, I. *Eksplorasi Spons Indonesia: Seputar Kepulauan Spermonde*. vol. 1 (2018).
6. Isnaeni, D. & Rahmawati. Isolasi dan Karakterisasi Mikrosimbion dari Spons *Callispongia vaginalis* dan Uji Daya Hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Maj. Farm. Nas.* **13**, 8–19 (2016).
7. Etesami, H., Alikhani, H. A., Hosseini, H. M. & Xx. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX* **2**, 72–78 (2015).
8. Casertano, M., Menna, M., Imperatore, C. & Xx. The ascidian-derived metabolites with antimicrobial properties. *Antibiotics* **9**, 1–30 (2020).
9. Chen, L., Hu, J. S., Xu, J. L., Shao, C. L. & Wang, G. Y. Biological and chemical diversity of ascidian-associated microorganisms. *Mar. Drugs* **16**, 1–33 (2018).
10. Thacker, R. W. & Freeman, C. J. *Sponge-Microbe Symbioses. Recent Advances and New Directions. Advances in Marine Biology* vol. 62 (Elsevier Ltd., 2012).
11. Lai, K. H. *et al.* Isomalabaricane Triterpenes from the Marine Sponge *Rhabdastrella* sp. *Mar. Drugs* **19**, 4–11 (2021).
12. Strobel, G. & Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 491–502 (2003).
13. Niah, R. & Febrianti, D. R. Optimasi Ekstrak Daun Karamunting (*Melastoma malabathricum* L.) dari Berbagai Pelarut sebagai Antibakteri Tifoid. *J. Insa. Farm. Indones.* **1**, 191–200 (2018).

14. Nurbaety, B., Haeroni, A. S. & Hambat, D. 'Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dengan Menggunakan Metode Sumuran'. *J. Insa. Farm. Indones.* **1**, 274–281 (2018).
15. Nowin, E. *et al.* Penapisan (skrining) aktivitas antibakteri beberapa ekstrak spons dari Teluk Manado. *J. Pesisir Dan Laut Trop.* **6**, 52 (2018).
16. Ginting, E. L., Rangan, L., Wantania, L. L. & Wullur, S. Isolation of Symbiotic Bacteria with Red Algae from Tongkaina Waters, North Sulawesi. *J. Ilm. Platax* **7**, 395 (2019).
17. Rosmania, R. & Yanti, F. Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri. *J. Penelit. Sains* **22**, 76 (2020).
18. Suhanah, R. A., Suryeleti, S., Etika, S. B., Ulfa, M. & Riga, R. Jamur Endofitik Yang Diisolasi Dari Bunga *Andrographis Paniculata* (Sambiloto) Sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *J. Insa. Farm. Indones.* **4**, 139–148 (2021).
19. Gutiérrez, M. H. *et al.* Biochemical fingerprints of marine fungi: Implications for trophic and biogeochemical studies. *Aquat. Microb. Ecol.* **84**, 75–90 (2020).
20. Mahapatra, S. & Banerjee, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydr. Polym.* **97**, 627–634 (2013).
21. Anuhya, G., Jyostna, V., Yvv, A. K., Bodaiah, B. & Sudhakar, P. Influence Of Physico-chemical Parameters On Secondary Metabolite Production By Marine Fungi. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **9**, 112–119 (2017).
22. Carranza, C. S., Barberis, C. L., Chiacchiera, S. M. & Magnoli, C. E. Assessment of growth of *Aspergillus* spp. from agricultural soils in the presence of glyphosate. *Rev. Argent. Microbiol.* **49**, 384–393 (2017).
23. Rendowaty, A., Djamaan, A. & Handayani, D. Waktu Kultivasi Optimal dan Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etil Asetat Jamur *Symbion Aspergillus unguis* (WR8) dengan *Haliclona fascigera*. *J. Sains Farm. Klin.* **4**, 49 (2017).
24. Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H. & Proksch, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.* **5**, 479–490 (2010).
25. Azzahra, F., Padmasari, D., Adhiarta, K., Farmasi, A. & Yogyakarta, I. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Etanol Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa sinensis* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis* Dan *Streptococcus mutans*. *J. Insa. Farm. Indones.* **1**, 243–250 (2018).
26. Bouarab-Chibane, L. *et al.* Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Front. Microbiol.* **10**, 1–22 (2019).
27. Valgas, C., Souza, S. M. De, Smânia, E. F. A. & Jr, A. S. Screening Methods To Determine Antibacterial Activity Of Natural Products. *Brazilian J. Microbiol.* **38**, 369–380 (2007).