

## **Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Media Kultur Fungi Endofit *Nigrospora oryzae* dari *Rhizophora mucronata***

### **(Antibacterial Activity of Ethyl Acetate Culture Broth Extract from Endophytic Fungi of *Nigrospora oryzae* Associated with *Rhizophora mucronata*)**

MUHAMAD S. FAREZA<sup>1\*</sup>, LINGLING T. AYOESTY<sup>1</sup>, SITI R. WARGIYANTI<sup>2</sup>, NUR  
A. CHOIRONI<sup>2</sup>, HARWOKO<sup>2</sup>, SOENARTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Kimia Farmasi Jurusan Farmasi Universitas Jenderal Soedirman

<sup>2</sup>Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi Universitas Jenderal Soedirman  
Jl. Dr. Soeparno, Karangwangkal, Purwokerto Utara, Banyumas, Jawa Tengah, 53122.

Diterima, 15 Maret 2017, Disetujui 8 Juli 2017

**Abstrak:** Tujuan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai sifat antibakteri ekstrak etil asetat media kultur fungi endofit daun bakau (*R. mucronata*). Fungi endofit yang telah diisolasi dari daun *R. mucronata* diidentifikasi secara makroskopik, mikroskopik, dan molekuler. Ekstrak etil asetat dari media kultur fungi endofit diuji aktivitas antibakterinya pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode mikrodilusi untuk mendapatkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Hasil penelitian diperoleh isolat fungi endofit yaitu *Nigrospora oryzae*. Ekstrak etil asetat (EtOAc) media kultur fungi endofit yang diujikan pada *E. coli* menunjukkan nilai KHM 250 µg/mL terhadap bakteri *E. coli* dan 500 µg/mL terhadap bakteri *S. aureus*.

**Kata kunci:** Aktivitas antibakteri, *Nigrospora oryzae*, *Rhizophora mucronata*.

**Abstract:** The purpose of this study was to provide information on the antibacterial activity of ethyl acetate culture broth extract of endophytic fungi associated with *Rhizophora mucronata*. An isolated fungi was identified as *Nigrospora oryzae* using microscopic and molecular analysis. The antibacterial activity was carried out using micro dilution method to get MIC value. The ethyl acetate extract showed antibacterial activity with MIC value of 250 µg/mL against *Escherichia coli* and 500 µg/mL against *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** Antibacterial activity, *Nigrospora oryzae*, *Rhizophora mucronata*.

---

\* Penulis korespondensi, Hp. 085869960605  
e-mail: salman.unsoed@gmail.com

## PENDAHULUAN

*RHIZOPHORA mucronata* merupakan salah satu spesies tumbuhan bakau yang dapat ditemukan disekitar pesisir pantai Indonesia dan lebih sering dikenal dengan sebutan bakau hitam. Secara etnofarmakologi, tumbuhan ini telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit diantaranya diare dan disentri. Selain itu, kajian secara *in vitro* terhadap ekstrak dari daun tumbuhan *R. mucronata* telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antibakteri<sup>(1,2)</sup>. Selain bersifat sebagai antibakteri, ekstrak tumbuhan ini telah dilaporkan memiliki bioaktivitas lainnya seperti antinoseptif dan sifat sitotoksik<sup>(3,4,5)</sup>. Pemanfaatan bagian tumbuhan secara langsung untuk pengobatan biasanya membutuhkan banyak biomassa. Hal ini bila dilakukan secara terus menerus tentunya dapat mengganggu kelestarian alam, termasuk terhadap tumbuhan *R. mucronata* yang memang merupakan salah satu jenis tumbuhan konservasi<sup>(6,7)</sup>. Selain dari tumbuhannya secara langsung, saat ini berkembang pemanfaatan ekstrak fungi endofit sebagai alternatif sumber bahan alam yang memiliki efek farmakologis tertentu termasuk sebagai antibakteri<sup>(8)</sup>.

Fungi endofit merupakan organisme yang hidup secara simbiosis mutualisme dengan tumbuhan inangnya<sup>(9)</sup>. Hubungan antara fungi endofit dengan tumbuhan inangnya diantaranya membantu dalam proses penyerapan unsur hara dan melindungi tumbuhan inang dari serangan penyakit yang disebabkan mikroorganisme tertentu<sup>(10,11)</sup>. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ekstrak fungi endofit memiliki aktivitas kuat sebagai antibakteri sama seperti ekstrak tumbuhan inangnya<sup>(12)</sup>. Hal ini dikarenakan fungi endofit dapat memproduksi metabolit sekunder yang serupa dengan tumbuhan inangnya<sup>(13)</sup>. Selain dari fungi endofit, ekstrak media kultur fungi endofit juga telah dilaporkan memiliki sifat antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak miselium fungi endofitnya<sup>(14)</sup>. Pada penelitian ini dilakukan isolasi fungi endofit dari daun bakau hitam (*R. mucronata*) asal desa Tritih (Cilacap). Ekstrak EtOAc dari media kultur fungi endofit yang diperoleh diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* sehingga didapatkan nilai konsentrasi hambat minimumnya (KHM).

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Sampel daun bakau hitam (*R. mucronata*), etil asetat(EtOAc) teknis, etanol 95%, natrium hipoklorit 5,3%, akuades, dimetil sulfoksida

(DMSO) p.a. , media PDA (*Potato Dextrose Agar*), media PDB (*Potato Dextrose Broth*), media MHB (*Mueller Hinton Broth*), isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, isolat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, amoksisilin, kloramfenikol, dankertas saring.

**Isolasi Fungi Endofit.** Daun bakau hitam dicuci bersih dengan air mengalir. Daun bakau hitam yang sudah dicuci kemudian dipotong kecil dengan ukuran 0,5 cm x 0,5 cm. Bagian permukaan daun disterilisasi dengan melakukan pembilasan secara bertahap yaitu menggunakan etanol 95% selama 30 detik, natrium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, etanol 95% selama 30 detik, dan terakhir menggunakan akuades steril. Potongan daun ditempatkan dalam cawan petri steril yang berisi media PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang sudah ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 1 mg/mL. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 27 °C selama 1 minggu dan dilakukan pengamatan setiap harinya. Selanjutnya, dilakukan pemurnian fungi hingga diperoleh isolat tunggal atau murni dengan cara diinokulasikan ke media PDA secara berulang kali<sup>(15)</sup>

**Identifikasi Fungi Endofit.** Isolat fungi yang telah murni diidentifikasi secara makroskopik, mikroskopik dan molekuler. Identifikasi isolat fungi dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada lokus *Internal Transcribed Spacer* (ITS) ribosomal DNA fungi. Isolasi DNA diawali dengan menumbuhkan isolat fungi dalam media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan diinkubasi selama 72 jam. Biomassa berupa miselia fungi selanjutnya dipanen untuk proses ekstraksi DNA. Ekstrak DNA yang diperoleh kemudian dilakukan amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada ITS menggunakan suatu primer. Purifikasi produk PCR dilakukan dengan metode pengendapan PEG precipitation method dan dilanjutkan dengan siklus sekuensing<sup>(16,17,18)</sup>. Analisis pembacaan urutan basa nitrogen menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer*) (*Applied Biosystems*). Data hasil analisis sekuen DNA dari fungi endofit yang telah diisolasi dibandingkan dengan data yang terdapat pada DNA data bank DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) dan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

**Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Endofit.** Fungi endofit dipindahkan dalam media PDB sebanyak 10 L dan diinkubasi selama 3 minggu pada suhu ruang. Selanjutnya, disaring menggunakan corong Buchner lalu ditampung filtratnya. Seluruh filtrat yang diperoleh kemudian diekstraksi cair-cair dengan EtOAc dengan perbandingan 1:5. Ekstrak EtOAc yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kentalsebanyak

0,214 g.

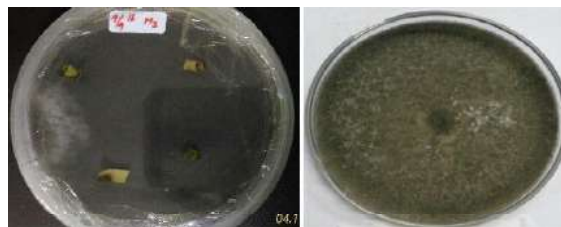
**Uji Antibakteri.** Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi seperti yang terdapat pada *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* <sup>(19)</sup>. Koloni bakteri segar hasil subkultur dipindahkan secukupnya menggunakan ose steril atau *cotton bud* ke dalam tabung reaksi steril dengan tutup berisikan larutan fisiologis NaCl 0,9%. Campuran tersebut kemudian diaduk hingga homogen yang kemudian diukur absorbansinya. Sampel uji dilarutkan dalam DMSO hingga memperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. *Media Mueller Hinton Broth (MHB)* steril sebanyak 200 µL dimasukkan kedalam 96 sumur pada mikroplat. Sampel uji setelah itu dimasukkan kedalam sumur pertama pada mikroplat sebanyak 200 µL yang kemudian dihomogenkan. Dilakukan pengenceran dua kali dengan cara mentransfer 200 µg/mL larutan disumur pertama ke sumur kedua dan seterusnya hingga memperoleh rentang konsentrasi sampel 500-3,91 µg/mL sebanyak 200 µL tiap sumur. Setelah itu ditambahkan 10 µL suspensi bakteri kedalam tiap sumur. Mikroplat kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C di dalam inkubator yang kemudian diukur absorbansinya dengan *Microplate reader*. Nilai KHM ditentukan dengan pengamatan absorbansi pada konsentrasi yang tidak ada pertumbuhan bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometer Mikroplat Bio-Rad xMark pada λ 600 nm. Pengujian dilakukan secara triplo dengan menggunakan antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat fungi endofit dari daun bakau hitam (*R. mucronata*) diisolasi dilakukan secara aseptis di bawah *laminar air flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi dari mikroorganisme lainnya. Sterilisasi bertahap dilakukan pada permukaan daun menggunakan etanol 96% dan natrium hipoklorit 2,25%. Larutan etanol akan mendenaturasi protein pada mikroorganisme sedangkan larutan natrium hipoklorit akan melepaskan radikal klor (Cl<sup>-</sup>) yang mampu merusak membran dan protein mikroorganisme<sup>(20)</sup>. Langkah sterilisasi ini dilakukan untuk menjamin fungi yang akan diisolasi adalah fungi endofit yang berasal dari sampel. Proses kultivasi dilakukan pada suhu ruang karena umumnya fungi akan tumbuh optimum pada suhu ruang yaitu berkisar antara 25-30 °C<sup>(21)</sup>. Pemisahan fungi endofit didasarkan pada karakter morfologi koloni yang diamati secara makroskopis meliputi warna, tepi, dan bentuk koloni dari fungi endofit dengan melakukan subkultur fungi endofit ke media PDA. Pemurnian dilakukan sebanyak

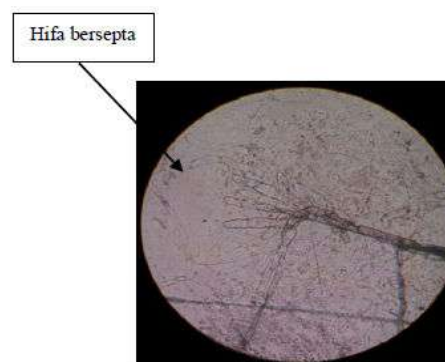
3 kali untuk menjamin bahwa isolat yang dihasilkan sudah murni. Selanjutnya, fungi endofit yang sudah murni difermentasikan ke dalam 10 L media PDB selama 3 minggu untuk dilakukan perbanyakan fungi.

Pada penelitian ini diperoleh fungi endofit berwarna putih dan pada hari ke-5 menjadi hitam (Gambar 1).



**Gambar 1.** Fungi Endofit dari Daun Bakau Hitam yang Tumbuh (kiri) dan Isolat *Nigrospora oryzae* (kanan).

Secara mikroskopik fungi ini merupakan konidia berbentuk halus dan memiliki hifa bersepta (Gambar 2).



**Gambar 2.** Hasil Identifikasi Mikroskopik (40x).

Hasil identifikasi secara makroskopik dan mikroskopik fungi tersebut memperlihatkan kesesuaian sebagai fungi *Nigrospora oryzae*<sup>(22)</sup>. Identifikasi secara molekuler mempertegas bahwa fungi endofit yang diperoleh memang memiliki angka kemiripan (*homology*) sebesar 99% dengan *Nigrospora oryzae* (Tabel 1). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan beberapa fungi endofit telah diisolasi dari daun *R. mucronata* asal Indonesia diantaranya *Aspergillus sp.*, *Acremonium sp.*, *Fusarium sp.* dan *Pestalotiopsis sp.* <sup>(14,23,24)</sup>. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, spesies ini baru pertama kali ditemukan pada *R. mucronata* asal Indonesia.

Berdasarkan uji aktivitas antibakteri, ekstrak EtOAc filtrat fungi endofit *Nigrospora oryzae* memperlihatkan nilai KHM sebesar 250 µg/mL terhadap bakteri *E. coli* dan 500 µg/mL terhadap bakteri *S. aureus* yang diujikan (Tabel 2). Hasil

ini memperlihatkan bahwa ekstrak media kultur fungi *Nigrospora oryzae* memiliki sifat antibakteri yang baik<sup>(25)</sup>. Bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, ekstrak fungi *Nigrospora oryzae* yang berasal dari *R. mucronata* memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik<sup>(26)</sup>. Standar amoksisilin menunjukkan nilai KHM 3,9 bpj terhadap *S. aureus* dan 7,8 bpj terhadap *E. coli*. (Tabel 3).

**Tabel 3. Nilai Serapan Amoksisilin terhadap *S. aureus* dan *E. coli* ( $\lambda = 600$  nm).**

| Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |              |              | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |              |              |              |              |
|----------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | Blanko                      | 1            | 2            | 3                         | Blanko       | 1            | 2            | 3            |
| 500                              | 0,048                       | 0,047        | 0,047        | 0,048                     | 0,059        | 0,053        | 0,058        | 0,064        |
| 250                              | 0,053                       | 0,059        | 0,061        | 0,06                      | 0,054        | 0,056        | 0,055        | 0,073        |
| 125                              | 0,05                        | 0,056        | 0,056        | 0,057                     | 0,052        | 0,053        | 0,056        | 0,055        |
| 62,50                            | 0,05                        | 0,055        | 0,057        | 0,055                     | 0,051        | 0,053        | 0,052        | 0,053        |
| 31,25                            | 0,049                       | 0,053        | 0,054        | 0,056                     | 0,05         | 0,053        | 0,053        | 0,053        |
| 15,63                            | 0,049                       | 0,054        | 0,053        | 0,055                     | 0,05         | 0,053        | 0,052        | 0,052        |
| 7,81                             | 0,049                       | 0,052        | 0,052        | 0,052                     | <b>0,049</b> | <b>0,054</b> | <b>0,053</b> | <b>0,054</b> |
| 3,91                             | <b>0,049</b>                | <b>0,055</b> | <b>0,054</b> | <b>0,055</b>              | 0,049        | 0,357        | 0,355        | 0,459        |

**Tabel 1. Hasil Uji Molekuler Fungi M3 (*Nigrospora oryzae*).**

|  |
|--|
| <b>Urutan DNA</b>  |
| >M3 ITS4   |
| TTGGGGGTTTTACGGCCGGGGGGCAGCGCCTAACAAAAGCGAGATAAAGAATTACTAC<br>GCTCAGAGGACTGCTGCCACTCCGCCAATGTCITTTGGGGAAC TACGAAGCCGTAGAGTCC<br>CAACAATAAGCTGTGCTTAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCACTAGAAT<br>ACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACAT<br>TACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAA<br>AGTTTTGACT   |
| >M3 ITS5   |
| GAGTTATCCAAC TCCCAAACCCATGTGAACTTATCTCTTTGTTGCCTCGGCGCAAGCTAC<br>CCGGGACCTCGCGCCCCGGGGGGCCCGCGGCGGACAAACCAAAC TCTGTTATCTTCGTT<br>GATTATCTGAGTGTCTTATTTAATAAGTCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGG<br>CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT<br>CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAG<br>CGTCATTTCAACCCCTAAGCACAGCTTATTGTTGGGACTCTACGGATTCA |
| <i>Nigrospora oryzae</i> strain CUNO-CPCT  |
| (Accession no: <b>KX246951</b> ) [ Homologi: 99%; Max score: 832; Total score: 832; Query coverage: 100%; E-value: 0.0; Max identities: 453/454 (99%); Gaps:1/454 (0%) ]   |
| <i>Nigrospora oryzae</i> isolate 10LW-2  |
| (Accession no: <b>KU375674</b> ) [ Homologi:99%; Max score: 832; Total score: 832; Query coverage: 100%; E-value: 0.0; Max identities: 453/454 (99%); Gaps:1/454 (0%) ]  |

**Tabel 2. Nilai Serapan Filtrat Etil Asetat Fungi Endofit *Nigrospora oryzae* pada *S. aureus* dan *E. coli* ( $\lambda = 600$  nm).**

| Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |       |       | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |        |       |       |       |
|----------------------------------|-----------------------------|-------|-------|---------------------------|--------|-------|-------|-------|
|                                  | Blanko                      | 1     | 2     | 3                         | Blanko | 1     | 2     | 3     |
| 500                              | 0,056                       | 0,061 | 0,054 | 0,058                     | 0,049  | 0,054 | 0,055 | 0,056 |
| 250                              | 0,054                       | 0,071 | 0,08  | 0,074                     | 0,054  | 0,057 | 0,058 | 0,058 |
| 125                              | 0,054                       | 0,523 | 0,522 | 0,484                     | 0,056  | 0,145 | 0,139 | 0,098 |
| 62,50                            | 0,052                       | 0,504 | 0,525 | 0,492                     | 0,613  | 1,064 | 1,059 | 1,034 |
| 31,25                            | 0,052                       | 0,052 | 0,59  | 0,616                     | 0,052  | 1,334 | 1,31  | 1,313 |
| 15,63                            | 0,05                        | 0,602 | 0,45  | 0,414                     | 0,052  | 1,546 | 1,552 | 1,54  |
| 7,81                             | 1,032                       | 0,416 | 0,637 | 0,541                     | 0,051  | 1,599 | 1,598 | 1,595 |
| 3,91                             | 0,051                       | 0,585 | 0,564 | 0,542                     | 0,05   | 1,534 | 1,521 | 1,508 |

**SIMPULAN**

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi fungi endofit *Nigrospora oryzae* dari tumbuhan inangnya yaitu *R. mucronata*. Ekstrak etil asetat media kultur fungi endofit *Nigrospora oryzae* tersebut memiliki sifat antibakteri dengan nilai KHM 250  $\mu\text{g/ml}$  terhadap bakteri *E. coli* dan 500  $\mu\text{g/ml}$  terhadap *S. aureus*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Indonesia dan Universitas Jenderal Soedirman atas dana yang diberikan pada Skim Riset Fundamental dengan nomor kontrak 1918/UN23.14/PN.01.00/2016.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wet Ecol Manage* 2002;10:421-52.
- Manilal A, Merdekios B, Idhayadhulla A, Muthukumar C, Melkie M, et al. An in vitro antagonistic efficacy validation of *Rhizophora mucronata*. *Asian Pac J Trop Dis* 2015; 5(1):28-32.
- Rahman MdA, Hasan SN, Sampad KS, Das AK, et al. Antinociceptive, antidiarrhoeal and cytotoxic activities of *Rhizophora mucronata* Lamk. *Pharmacology online*. 2011;1:921-9.
- Sahoo G, Mulla NSS, Ansari ZA, Mohandass C, et al. Antibacterial activity of mangrove leaf extracts against human pathogens. *Indian J Pharm Sci*. 2012;74(4):348-51.
- Tarman K, Purwaningsih S, Negara AAAPP, et al. Aktivitas antibakteri ekstrak daun bakau hitam (*Rhizophora mucronata*) terhadap bakteri penyebab diare. *JPHPI*. 2013; 16(3):249-58.
- Hilmi E, Parengrengi, et al. Strategi konservasi mangrove dalam mengurangi dampak bencana di pesisir. *Jurnal Pembangunan Pedesaan*. 2012; 12(2):70-9.
- Sumampouw M, Bara R, Awaloei H, Posangi, J, et al. Uji efek antibakteri jamur endofit akar bakau *Rhizophora stylosa* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal e-Biomedik*. 2014; 2(1):1-5.
- Jalgaonwala RE, Mohite BV, Mahajan RT, et al. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. *J Microbiol Biotech Res*. 2011;1(2):21-32.
- Kumala S, Agustina E, Wahyudi P, et al. Uji aktivitas antimikroba metabolit sekunder kapang endofit tumbuhan trengguli (*Cassia fistula* L). *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 2007; 6(2):46-8.
- Stone JK, Bacon CW and White Jr JF. An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. In: *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker:2000. p: 3-29.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret D, et al. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat Toxin*. 1992;1:185-96.
- Aly AH, Debbab A, Proksch P, et al. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 90:1829-45.
- Xu J, Sherif SE, Peter P, et al. *Pestaliopsis* a highly creative genus: Chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Divers*. 2010; 44:15-31.
- Tarman K, Safitri D, Setyaningsih I, et al. Endophytic fungi isolated from *Rhizophora mucronata* and their antibacterial activity terhadap bakteri penyebab diare. *Squalen Bul Marine & Fisheries Post Biotechnol*. 2013; 8(2):69-76.
- Buatong J, Phongpaichit S, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J, et al. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011; 27:3005-3008.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor, JW. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). *PCR protocols*. Academic San Diego. 1990. p. 315-22.
- O'Donnell, K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. (eds). *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic, and pleomorphic specification in fungal systematics*. CAB International. Wallingford. 1993. p. 225-33.
- Hiraishi A, Kamagata Y, Nakamura N, et al. Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *J Ferment Bioeng*. 1995; 79: 523-9.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved standard (9th ed.)*. CLSI Document M07-A9. USA: Wayne PA.
- Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Erlangga: 2008. p. 34-53.
- Kumala S. *Mikroba Endofit*. Jakarta. ISFI Penerbitan: 2014. p. 25-47.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of soil fungi volume 1*. Eching. 1993. p. 515-6.
- Prihanto AA, Firdaus M, Nurdiani R, et al. Endophytic fungi isolated from mangrove (*Rhizophora mucronata*) and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Food Sci Eng*. 2011; 1:386-9.
- Suciatmih. *Diversitas jamur endofit pada tumbuhan mangrove di Pantai Sampiran dan Pulau Bunaken, Sulawesi Utara*. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon, April, 2015; 1(2):177-83.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches, NR, Cortez DAG, Nakamura GV, Filho BPD, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7):1027-31.
- Pawle G, Singh SK, et al. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. *Curr Res Environ Appl Mycol*. 2014;4(1):1-9.