

Skrining Aktivitas Antibakteri *Bacillus* sp. PCAR1 dari Rumput Laut *Eucheuma spinosum* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Ni Made Alit Yulianti¹, Anak Agung Gede Indraningrat^{2*}, Ni Wayan Widhidewi²

¹Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Warmadewa, Bali, Indonesia

²Bagian Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Warmadewa, Bali, Indonesia

*email: anak.indraningrat@gmail.com

Abstrak

Mikroorganisme yang berasosiasi dengan organisme laut berpotensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri yang kuat. Penelitian sebelumnya telah mengisolasi bakteri *Bacillus* sp. PCAR1 dari rumput laut *Eucheuma spinosum* dengan potensi antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Namun, potensi bioaktivitas yang dihasilkan *Bacillus* sp. PCAR1 khususnya sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* perlu dieksplorasi menggunakan metode ekstraksi kimia. Pada penelitian ini, sebanyak 100 mL kultur cair *Bacillus* sp. PCAR1 pada media *nutrient broth* steril diinkubasikan selama 5 hari dan digoyang pada kecepatan 150 rpm. Supernatan dipisahkan dari massa sel dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no 1. Filtrat yang diperoleh lalu diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat pro analisa (1:1 v/v). Ekstrak yang diperoleh dianalisis aktivitas antibakterinya dengan metode Kirby-Bauer dan kandungan senyawa kimia dianalisis menggunakan metode *Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (GC/MS). Skrining antibakteri ekstrak etil asetat *Bacillus* sp. PCAR1 menunjukkan diameter zona hambat sebesar $6,23 \pm 0,06$ mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yang tergolong aktivitas antibakteri sedang. Analisis GC/MS menunjukkan ekstrak etil asetat mengandung 10 kandungan senyawa kimia aktif yang potensial sebagai antibakteri dengan empat senyawa aktif dominan yaitu yaitu p-Xylene (7.26%), Ethanol, 2 – butoxy (5,36%), o-Xylene (3.14%), dan Mesitylene (3.41%). Secara umum, hasil ini memberikan gambaran awal potensi sintesis senyawa antibakteri oleh *Bacillus* sp. PCAR1.

Kata Kunci: Bioprospeksi, *Bacillus*, antibakteri, GC/MS

Abstract

[Antibacterial Activity Screening of *Bacillus* sp. PCAR1 from Seaweed *Eucheuma spinosum* against *Staphylococcus aureus* bacteria]

Microorganisms associated with marine organisms have the potential to produce secondary metabolite compounds with strong antibacterial activity. Previous research has isolated *Bacillus* sp. bacteria encoded as PCAR1 from *Eucheuma spinosum* seaweed with antibacterial potential against Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the potential bioactivity produced by *Bacillus* sp. PCAR1, especially as an antibacterial against *Staphylococcus aureus*, still needs to be explored using chemical extraction method. In this research, a total of 100 mL of sterile NB liquid media containing the cell mass of *Bacillus* sp. PCAR1 was fermented for 5 days and then shaken at 150 rpm. The supernatant was separated from the cell mass by filtration using Whatman filter paper no.1. The filtrate was extracted using ethyl acetate pro-analyticals (1:1 v/v). The extracts were analyzed for antibacterial activity using the Kirby-Bauer method, while the chemical composition of the extracts was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) method. Antibacterial screening of ethyl acetate extract of *Bacillus* sp. PCAR1 showed an inhibition zone of 6.23 ± 0.06 mm against *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, which is classified as moderate antibacterial activity. GC/MS analysis showed that the ethyl acetate extract contained 10 chemical compounds that have potential as antibacterial, with four dominant active compounds namely p-Xylene (7.26%), Ethanol, 2-butoxy (5.36%), o-Xylene (3.14%), and mesitylene (3.41%). Overall, these results provide an initial overview of antibacterial compounds that can be synthesized by *Bacillus* sp. PCAR1.

Keywords: Bioprospecting, *Bacillus*, GC/MS

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh masuknya sejumlah mikroorganisme ke dalam tubuh seperti bakteri yang bersifat patogen. Salah satu bakteri yang sering menimbulkan penyakit infeksi dengan berbagai manifestasi klinis yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*⁽¹⁾. Bakteri ini tergolong Gram positif yang berbentuk kokus dan hidup sebagai flora normal pada manusia⁽²⁾. Bakteri *S. aureus* dapat bersifat patogen dan menimbulkan penyakit pada manusia seperti infeksi pada saluran pernapasan yaitu pneumonia dan infeksi kulit seperti selulitis^(3,4). Sejumlah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* umumnya diobati menggunakan antibiotik^(1,3). Penggunaan antibiotik sintetis dengan dosis tinggi tanpa memperhatikan aturan pemakaiannya dan tidak tepat sasaran sesuai dengan diagnosisnya dapat menyebabkan resistensi antibiotik^(5,6).

Eksplorasi mikroorganisme dari alam yang berpotensi menghasilkan senyawa aktif metabolit sekunder khususnya antibakteri perlu untuk terus digalakkan. Salah satu mikroorganisme dari alam yang memiliki potensi sebagai sumber senyawa antibakteri adalah bakteri endofit dari rumput laut *Eucheuma spinosum*. Penelitian sebelumnya melaporkan isolasi bakteri dengan kode PCAR1 yang menunjukkan potensi antibakteri berdasarkan skrining awal menggunakan metode *perpendicular streak*⁽⁷⁾. Berdasarkan penelitian tersebut, isolat bakteri PCAR1 ini berbentuk kokus atau batang sehingga diidentifikasi sebagai *Bacillus* sp. PCAR1.

Sejauh ini, penelitian yang mengkaji kemampuan dan kandungan senyawa pada isolat *Bacillus* PCAR1 belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menskrining aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat *Bacillus* sp. PCAR1 terhadap bakteri *S. aureus* dan *profiling* ekstrak menggunakan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) untuk mendapatkan gambaran komposisi senyawa penyusun ekstrak.

METODE

Penyegaran Isolat Bakteri

Penyegaran isolat bakteri dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 *loop* ose dari kultur murni isolat bakteri PCAR1 secara aseptik dan dipindahkan pada 10 mL media *nutrient broth* (Himedia) steril yang mengandung *artificial seawater* (33 gr/L). Kultur PCAR1 diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 28°C hingga dicapai kekeruhan sebagai pertanda kultur telah tumbuh. Selanjutnya, 10 mL kultur cair PCAR1 ini dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media *nutrient broth*. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 hari dan digoyang menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm.

Ekstraksi Komponen Metabolit Sekunder *Bacillus* sp. PCAR1

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat pro analisa dengan perbandingan 1:1 (v/v) dan filtrat selanjutnya dipisahkan menggunakan corong pisah. Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan dan hasil total ekstraksi dievaporasi pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dilarutkan pada 1 mL etil asetat.

Skrining Aktivitas Antibakteri

Ekstrak *Bacillus* sp. PCAR1 diskriming aktivitas antibakterinya dengan metode *Kirby-Bauer* terhadap bakteri uji pada media agar Luria-Bertani (LB). Secara singkat, suspensi bakteri diratakan pada media agar menggunakan *cotton swab* steril. Kertas cakram dengan diameter 6 mm diletakkan diatas media LB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan dalam 1 cawan petri yang dibagi menjadi 3 kuadran. Zona hambat diukur dari terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan sesuai kategori yaitu lemah (0 – 5 mm), sedang (5 – 10

mm), kuat (10 – 20 mm), dan sangat kuat (> 20 mm). Semakin besar zona bening yang terbentuk maka semakin kuat kemampuan daya hambat isolat terhadap bakteri uji.

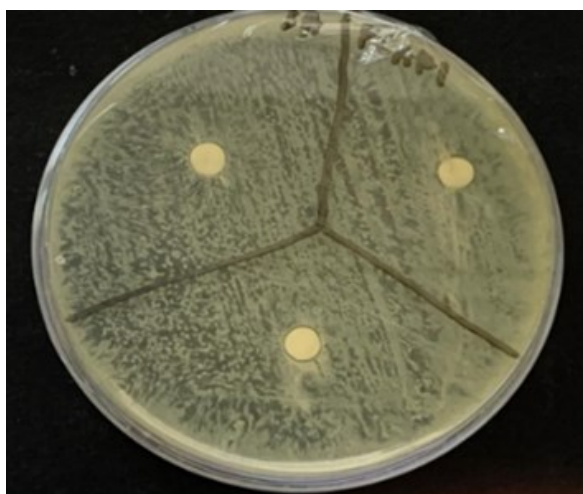
HASIL Evaluasi Aktivitas Antibakteri dari *Bacillus sp. PCAR1*

Hasil skrining uji aktivitas antibakteri menggunakan metode *Kirby-Bauer* dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Zona Hambat dari *Bacillus sp. PCAR1* Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel	Zona Daya Hambat (mm)
	<i>S. aureus</i>
<i>Bacillus sp. PCAR1</i>	6,23 ± 0,06
Levofloxacin	26,25 ± 0,05
Etil Asetat	0,00 ± 0,00

Pada hasil tersebut menunjukkan bahwa pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923, ekstrak etil asetat *Bacillus sp. PCAR1* memiliki daya hambat dengan rata-rata sebesar 6,23±0,06 mm yang menyatakan aktivitas antibakteri sedang, seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Daya hambat isolat bakteri PCAR1 pada bakteri *S.aureus* ATCC 25923

Data diameter zona hambat pada uji aktivitas antibakteri dianalisis dengan SPSS versi 25. Pada uji normalitas dengan *Shapiro-wilk* didapatkan bahwa data terdistribusi normal (Tabel 2). Pada uji One Way ANOVA didapatkan nilai p= 0.000 yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada data (p<0.05) (Tabel 3).

Tabel 2. Hasil Uji Normalitas

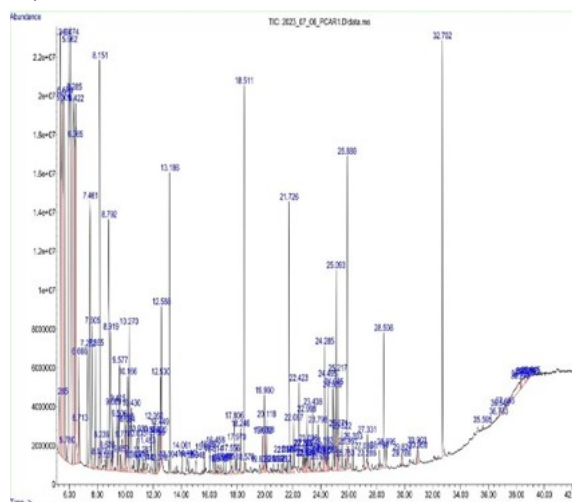
Sampel	Nilai p
	<i>S. aureus</i>
<i>Bacillus sp. PCAR1</i>	0,717
Levofloxacin	
Etil Asetat	

Tabel 3. Hasil Analisis One Way ANOVA

Sampel	Kontrol	p
<i>Bacillus sp. PCAR1</i>	Levofloxacin	0,00
	Etil Asetat	0,54

Profiling Senyawa Kimia Ekstrak *Bacillus sp. PCAR1*

Hasil analisis GC-MS ekstrak etil asetat *Bacillus sp. PCAR1* menunjukkan bahwa *Bacillus sp. PCAR1* memiliki 22 senyawa aktif yang berhasil teridentifikasi (Tabel 4 dan Gambar 2). Dari 22 senyawa tersebut, diketahui terdapat 10 senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba (Tabel 5).



Gambar 2. Kromatogram GC-MS *Bacillus sp. PCAR1*

Tabel 4. Senyawa Aktif yang Terdeteksi Berdasarkan Hasil GC-MS.

Nama Senyawa	Area Puncak (%)	Waktu Retensi (Menit)
P-Xylene	7,26	6.07
Bycyclo [4.2.0] octa - 1,3,5 - triene	5,36	5.96
Ethanol, 2 – butoxy -	5,99	6.28
Propane, 1 – (chloromethoxy) – 2 – methy - 1	5,99	6.28
Ethylene glycol monoisobutyl ether	1,49	6.36
o-Xylene	3,14	5.50
Mesitylene	3,41	7.46
3 – hexanol, 3,4 – diethyl -	4,65	6.42
Benzene, 1,2,3 – trimethyl -	4,32	8.15
Benzene, 1 – ethyl – 2 - methyl	1,00	7.85
D - Limonene	1,04	8.91
2 – butoxyethyl acetate	1,12	10.27
Benzene, 1,2,4,5 – tetramethyl-	0,23	10.83
3-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4- (1-methylethyl)-	0,12	11.24
Estragole	0,92	12.58
Benzoic acid, 2-hydroxy- phenylmethyl ester	0,93	24.49
Pyrrolo [1,2-a] pyrazine – 1,4 – dione, hexahydro – 3 – (2-methylpropyl)-	1,56	25.09
Cyclohexane, 1 – (cyclohexylmethyl)-2-methyl, cis-	1,68	21.72
Hexadecanoic acid, ethyl ester	2,07	25.88
2,4 – Di – tert-butylphenol	2,74	18.51
Diisooctyl phthalate	3,35	32.70
2-Propeonic acid, 6 – methylhepathyl ester	1,66	13.18

Tabel 5. Senyawa Antimikroba yang Teridentifikasi

Nama Senyawa	Sifat Senyawa	Aktivitas
o-Xylene	Senyawa organik	Antibakteri ⁽⁸⁾
D-Limonene	Senyawa organik	Antibakteri dan Antijamur ⁽⁹⁾
Ethanol, 2 – butoxy	Senyawa organik	Antibakteri ⁽¹⁰⁾
p-Xylene	Senyawa organik	Antibakteri ⁽¹¹⁾
Mesitylene	Senyawa organik	Antibakteri ⁽¹²⁾
Estragole	Senyawa organik	Antibakteri ⁽¹³⁾
Diisooctyl phthalate	Senyawa organik	Antibakteri dan Antijamur ⁽¹⁴⁾
Hexadecanoic acid, ethyl ester	Senyawa organik	Antibakteri ⁽¹⁵⁾
Pyrrolo [1,2-a] pyrazine – 1,4 – dione, hexahydro – 3 – (2-methylpropyl)-	Senyawa organik	Antibakteri ⁽¹⁶⁾
2,4 – Di – tert-butylphenol	Senyawa organik	Antibakteri dan Antijamur ⁽¹⁷⁾

PEMBAHASAN

Evaluasi Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini, data evaluasi antibakteri yang diperoleh menunjukkan ekstrak etil asetat dari *Bacillus sp. PCAR1* pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923 memiliki aktivitas antibakteri yang sedang dengan daya hambat sebesar $6,23 \pm 0,06$ mm. Hal ini dapat disebabkan oleh struktur morfologi bakteri *S. aureus* yang merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif memiliki struktur morfologi yang lebih kompleks dibandingkan Gram positif sehingga aktivitas antibakteri pada bakteri Gram positif akan lebih kuat daripada Gram negatif⁽¹⁸⁾. Hasil uji aktivitas antibakteri menyatakan bahwa pada bakteri *S. aureus*, senyawa antibakteri relatif lebih mudah untuk dapat menembus dinding selnya karena hanya memiliki satu lapisan pada struktur dinding selnya yaitu 90% lapisan peptidoglikan. Hal ini juga berkaitan dengan hasil zona hambat pada kontrol positif menggunakan levofloxacin yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang sangat kuat yaitu 26,52 mm. Levofloxacin merupakan antibiotik golongan kuinolon yang berspektrum luas sehingga dapat bekerja pada bakteri Gram positif dan negatif⁽¹⁹⁾. Antibiotik ini akan menghambat enzim yang diperlukan oleh bakteri untuk memperbanyak dirinya sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat. Selain itu, tercapainya fase stasioner dalam pertumbuhan *Bacillus sp. PCAR1* menjadi salah satu faktor penyebab terbentuknya daya hambat pada bakteri uji. Pada fase stasioner, metabolit sekunder akan banyak diproduksi oleh sel bakteri untuk bertahan hidup di lingkungan sel yang berubah⁽¹⁸⁾. Hasil yang diperoleh memberikan kemungkinan bahwa *Bacillus sp. PCAR1* mampu memproduksi metabolit sekunder sehingga terbentuk daya hambat terhadap bakteri uji.

Evaluasi Kandungan Senyawa Kimia

Pada hasil kandungan senyawa kimia yang dianalisis dengan metode GC-MS diperoleh 10 senyawa aktif yang mampu

berperan sebagai senyawa antibakteri. Pada 10 senyawa tersebut, ditemukan terdapat 4 senyawa aktif yang dominan pada ekstrak etil asetat *Bacillus sp. PCAR1* diantaranya p-Xylene (7,26%), Ethanol, 2-butoxy (5,36%), o-Xylene (3,14%), dan Mesitylene (3,41%). Senyawa p-Xylene merupakan senyawa yang paling dominan pada ekstrak etil asetat *Bacillus sp. PCAR1*. Senyawa ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, serta jamur *Candida albicans* dan *Aspergillus niger*⁽¹¹⁾. Senyawa o-Xylene memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecialis*. Senyawa Mesitylene memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹²⁾.

Pada ekstrak *Bacillus sp. PCAR1* didapatkan hasil antibakteri yang berkaitan dengan hasil analisis GC-MS. Hal ini dapat disebabkan karena *Bacillus sp. PCAR1* yang sudah mampu mencapai fase stasioner sehingga metabolit sekunder yang dihasilkan cukup optimal. Metabolit sekunder akan disintesis secara optimal pada akhir fase pertumbuhan sel yaitu fase stasioner ketika populasi jumlah sel tetap karena pada fase ini sel akan lebih mempertahankan diri pada lingkungan sel yang ekstrem untuk bertahan hidup^(20,21). Oleh karena itu, kemampuan *Bacillus sp. PCAR1* sebagai antimikroba dalam menghambat mikroorganisme akan berkaitan dengan siklus pertumbuhan sel yang dilalui dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder.

SIMPULAN

Ekstrak *Bacillus sp. PCAR1* menunjukkan aktivitas antibakteri yang sedang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan diameter daya hambat $6,23 \pm 0,06$ mm. Selain itu, ditemukan pula 10 kandungan senyawa aktif yang berperan sebagai antimikroba, dengan empat senyawa aktif yang mendominasi ekstrak yaitu p-Xylene

(7.26%), Ethanol, 2 – butoxy (5,36%), o-Xylene (3.14%), dan Mesitylene (3.41%). Penelitian selanjutnya sebaiknya difokuskan untuk melakukan optimasi media pertumbuhan isolat dan variasi pelarut kimia pada proses ekstraksi senyawa aktif untuk membandingkan dan memverifikasi hasil terbaik dari aktivitas antimikroba yang telah diamati.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pande Putu Christine Putri Purnami yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini. Serta penulis juga mengucapkan terima kasih untuk dukungan finansial dari hibah penelitian dasar RISTEKDIKTI untuk Dr. Anak Agung Gede Indraningrat, S.Si.,M.Sc no hibah 184/E5/PG.02.00.PL/2023;3538/LL8/AL.04/2023, 837/UNWAR/LEMLIT/PD-13/2023.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pragita AS, Shafa DP, Nursifah D, Rumidatul A. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kulit dan Kayu Sakit Ranting Sengon Terhadap Bakteri dan Jamur. *Jurnal Analis Kesehatan*. 2020;9(2):41–8.
2. Fitri K SA, K. Agung MU, Meika J. Skrining Antibakteri Produk Ekstrasel Eksosimbion Bakteri Laut Pada Makroalga Terhadap Biofilm *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923. *Jurnal Akuatika Indonesia*. 2015;6(2):128–39.
3. Pratiwi RH. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-life*. 2017;4(3):418–29.
4. Arifin Z, Khotimah S, Rahmayanti S. Aktivitas Antijamur Ekstrak Etil Asetat Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida L.*) terhadap *Candida albicans* secara In Vitro. *Jurnal Cerebellum*. 2018;4(3):1106–19.
5. Susanto A. Buku Ajar Bakteriologi (Carrier Penyakit Typus). STIKES MAJAPAHIT 2020. p. 1–95 .
6. Lim T, Rialita A, Mahyarudin M. Aktivitas Antijamur Isolat Bakteri Endofit Tanaman Kunyit Terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Malassezia furfur* Secara In-Vitro. *Jurnal Ilmiah Umum dan Kesehatan Aisyiyah*. 2022;7(1):1–11.
7. Ekaryani, Indraningrat, Singapurwa, Sudiarta, Semariyani, Candra. Skrining Aktivitas Antibakteri dari Isolat Bakteri yang Berasosiasi dengan Rumput Laut *Eucheuma spinosum*. *Journal of Biological Science*. 2022;1–18.
8. Rizwana H, Alwhibi MS, Soliman DA. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Flowers of *Matricaria aurea* a Native Herb of Saudi Arabia. *International Journal of Pharmacology*. 2016;12(6):576–86.
9. Han Y, Sun Z, Chen W. Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene Against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*. 2020;25(33):1–15.
10. Woiski C, Dobsław D, Engesser KH. Isolation and Characterization of 2-butoxyethanol Degrading Bacterial Strains. *Biodegradation* [Internet]. 2020;31(3):153–69. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10532-020-09900-3>
11. Morah FNI, Emechige EP, Mowang MM. Chemical composition and antimicrobial activity of *Eleusine indica* leaf essential oil. *International Journal of Chemical and Biochemical Science*. 2018;11:44–50.
12. Savithri JS, Rajakumar P. Synthesis, Photophysical Property and Antibacterial Activity of Rhodamine B Decorated, Mesitylene Cored and Methylene p-Phenoxy Bridged Dendrimers. *ChemistrySelect*. 2019;4(34):10143–8.
13. Song Y rim, Choi M seon, Choi G won, Park I kwon, Oh C sik. Antibacterial Activity of Cinnamaldehyde and Estragole Extracted from Plant Essential Oils against *Pseudomonas syringae* pv .

- actinidiae Causing Bacterial Canker Disease in Kiwifruit. *The Plant Pathol J.* 2016;32(4):363–70.
14. Habib M, Karim M. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di- (2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from. *Mycobiology.* 2009;37(1):31–6.
15. Mohadjerani M, Hosseinzadeh R, Hosseini M. Chemical Composition and Antibacterial Properties of Essential Oil and Fatty Acids of Different Parts of *Ligularia persica* Boiss. *Avicenna Journal Phytomedicine.* 2016;6(3):357–65.
16. Kiran GS, Priyadharsini S, Sajayan A, Ravindran A, Selvin J. An Antibiotic Agent pyrrolo[1,2-: A] pyrazine-1,4-dione,hexahydro Isolated from a Marine Bacteria *Bacillus tequilensis* MSI45 Effectively Controls Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Royal Society of Chemistry.* 2018;8(32):17837–46.
17. Zhao F, Wang P, Lucardi RD, Su Z, Li S. Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs. *Toxins (Basel).* 2020;12(35):1–26.
18. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman rafik. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules.* 2020;25(6):3–4.
19. Kasper DL, Fauci AS. Harrison's Infectious Disease. In: *The McGraw-Hill*, 17 Edition. 2010. p. 1–1313.
20. Jaishankar J, Srivastava P. Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. *Frontiers in Microbiology.* 2017;8:1–12.
21. Purbowatiningrum, Mulyani NS, Rahman IA, Ismiyanto, Ngadiwiyana, Prasetya N. Isolasi Bakteri Endofit dari Daun Sirsak dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekundernya. *Jurnal Penelitian Saintek.* 2023;28(1):14–23.