

ISOLASI, IDENTIFIKASI MOLEKULER, DAN POTENSI BIOAKTIVITAS JAMUR YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS LAUT *Stylissa massa*, *Nigrospora sphaerica* SP2-2-4

N.K.D.E. Witantri¹, I.M.A.K. Adi¹, N.P.E. Leliqia^{1,2}, dan N.P. Ariantari^{1,2*}

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jl. Raya Kampus Unud, Jimbaran, Badung, 80361, Indonesia

²Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jl. PB Sudirman, Denpasar 80234, Indonesia

*e-mail: putu_ariantari@unud.ac.id

Article Received on: 1st January 2026

Revised on: 25th May 2026

Accepted on: 28th July 2026

ABSTRAK

Jamur yang berasal dari spons laut dikenal sebagai produsen potensial senyawa bioaktif dengan aktivitas biologis yang luas. Dalam studi ini, kami mengisolasi dan mengidentifikasi strain jamur dari spons laut *Stylissa massa* yang dikoleksi dari Pantai Amed, Bali, Indonesia beserta evaluasi aktivitas antimikroba, antioksidan, dan toksisitas ekstrak metanolnya. Setelah prosedur isolasi strain jamur SP2-2-4 dari spons *S. massa*, protokol biologi molekuler dengan amplifikasi pada daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) digunakan untuk mengidentifikasi strain tersebut. Strain tersebut kemudian difermentasi pada media beras dengan dan tanpa penambahan garam laut buatan. Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan etil asetat ke dalam labu fermentasi untuk mendapatkan ekstrak kasar. Ekstrak tersebut kemudian dipisahkan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan campuran metanol-air dan n-heksana untuk mendapatkan ekstrak metanol yang digunakan dalam analisis fitokimia dan uji bioaktivitas. Aktivitas antimikroba diuji terhadap beberapa mikroba patogen menggunakan metode difusi cakram. Aktivitas antioksidan dievaluasi dengan uji DPPH, sedangkan toksisitas ekstrak dievaluasi dengan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BLST). Identifikasi molekuler pada region ITS menunjukkan bahwa isolat SP2-2-4 memiliki kemiripan paling dekat (99,41%) dengan *Nigrospora sphaerica*. Analisis fitokimia menunjukkan bahwa triterpenoid hanya terdeteksi pada ekstrak jamur dari fermentasi tanpa penambahan garam laut buatan sedangkan, polifenol hanya terdeteksi dalam ekstrak dari fermentasi beras yang mengandung garam laut buatan. Alkaloid terdeteksi dalam ekstrak yang diperoleh dari kedua kondisi fermentasi. Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa hanya ekstrak yang difermentasi tanpa penambahan garam laut buatan menunjukkan aktivitas antimikroba lemah terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan zona hambat sebesar $2,57 \pm 0,24$ mm. Ekstrak ini juga menunjukkan aktivitas antioksidan sedang ($IC_{50} = 224,42 \pm 12,14$ µg/mL) dan toksisitas sedang ($LC_{50} = 103,31 \pm 21,71$ µg/mL). Sebaliknya, ekstrak dari fermentasi beras yang diperkaya dengan garam laut buatan menunjukkan toksisitas yang lebih tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar $59,45 \pm 1,54$ µg/mL. Studi ini menunjukkan bahwa jamur endofit yang diisolasi dari spons laut merupakan sumber potensial senyawa alami bioaktif, di mana aktivitas biologisnya dapat dipengaruhi secara signifikan oleh kondisi salinitas selama fermentasi. Optimalisasi kondisi fermentasi yang dilakukan pada penelitian selanjutnya digunakan untuk mengeksplorasi keragaman kimia dan farmakologis metabolit sekunder dari jamur *N. sphaerica* SP2-2-4.

Kata kunci: Antimikroba, antioksidan, jamur laut, *Nigrospora sphaerica*, senyawa bioaktif, spons laut, *Stylissa massa*.

ABSTRACT

Sponge-derived marine fungi are well recognized as promising producers of bioactive compounds with a broad range of biological activities. In the present study, we isolated and identified a fungal strain from marine sponge *Stylissa massa* collected from Amed beach, Bali, Indonesia, along with the evaluation of antimicrobial, antioxidant, and toxicity of the methanolic extract. Following the isolation procedure a fungal strain SP2-2-4 from *S. massa*, the molecular biology protocol by amplification of the *Internal Transcribed Spacer* (ITS) region was used to identify the strain. The strain was then fermented on rice medium with and without the addition of sea salt. Extraction was done by adding ethyl acetate to the fermentation flask to obtain crude extract. The extracts were partitioned between aqueous methanol and *n*-hexane to obtain a methanolic extract for phytochemical analysis and bioassay. Antimicrobial activity was tested against several pathogens using the disc diffusion method. Antioxidant activity was evaluated by the DPPH assay, and the toxicity of the extract was evaluated by the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Molecular identification of the ITS region showed that the fungal isolate SP2-2-4 was the most closely related to *Nigrospora sphaerica* with a similarity of 99.41%. Phytochemical analysis showed triterpenoid was only detected in the extract from the fungal fermentation on rice without salt addition. Meanwhile, polyphenols were

detected only in the extract from salt-containing rice fermentation. Alkaloids were detected in extracts afforded from both fermentation conditions. Only the extract obtained from the salt-free rice fermentation showed weak antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with an inhibition zone of 2.57 ± 0.24 mm. This extract also exhibited moderate antioxidant activity ($IC_{50} = 224.42 \pm 12.14$ $\mu\text{g/mL}$) and moderate toxicity ($LC_{50} = 103.31 \pm 21.71$ $\mu\text{g/mL}$). In contrast, the extract from the salt-enriched rice fermentation showed higher toxicity in BSLT with an LC_{50} value of 59.45 ± 1.54 $\mu\text{g/mL}$. This study showed that fungi isolated from marine sponges are a potential source of bioactive natural compounds whose biological activity can be significantly influenced by salinity conditions during cultivation. Therefore, further fermentation optimization would be promising to uncover the hidden chemical and pharmacological diversity of secondary metabolites produced by the isolated *N. sphaerica* SP2-2-4.

Keywords: Antimicrobial, antioxidant, bioactive compounds, marine fungus, marine sponge, *Nigrospora sphaerica*, *Stylissa massa*.

PENDAHULUAN

Ekosistem laut merupakan sumber keanekaragaman hayati yang kaya dengan berbagai organisme yang telah mengembangkan adaptasi biokimia unik untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan ekstrem. Spons laut merupakan salah satu organisme yang menarik perhatian sebagai sumber potensial senyawa bioaktif karena hubungan simbiosisnya dengan berbagai jamur endofit (Ariantari *et al.*, 2023). Jamur yang berasosiasi dengan spons laut telah terbukti menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba, antioksidan, dan sitotoksik. Lingkungan unik yang ditempati oleh jamur yang berasosiasi dengan spons laut ditandai dengan kadar garam yang tinggi, fluktuasi suhu, dan persaingan mikrobial yang intens, yang mendorong produksi senyawa alami dengan struktur dan aktivitas biologis yang berbeda secara signifikan dari jamur terestrial (Varijakzhan *et al.*, 2021).

Spons laut *Stylissa massa* yang umum ditemukan di perairan Indo-Pasifik termasuk wilayah pesisir Bali, Indonesia telah diidentifikasi sebagai inang bagi beragam komunitas jamur. Berbagai studi yang pernah dilakukan mengenai jamur yang berasosiasi dengan *S. massa* melaporkan keberadaan berbagai genus jamur termasuk *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Nigrospora* yang mampu menghasilkan metabolit sekunder bioaktif (Wigati *et al.*, 2024). Jamur-jamur ini telah dilaporkan menghasilkan senyawa dari golongan alkaloid, poliketida, terpen, dan peptida dengan aktivitas biologis yang beragam (Presson *et al.*, 2021). Sebagai contoh, penelitian dari Trifani *et al.*, (2021) berhasil mengisolasi satu isolat jamur endofit yang berasosiasi dengan *S. massa* yang diberi kode K9. Jamur tersebut dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen seperti *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* dengan nilai rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,35 dan 7,9 mm. Pada penelitian ini, sampel *S. massa* dikumpulkan dari Pantai Amed, Kabupaten

Karangasem, Bali, mewakili lokasi geografis unik dengan kondisi lingkungan laut yang berbeda, yang kemungkinan menjadi sumber strain jamur potensial dengan potensi biosintesis yang belum dieksplorasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jamur dari spons laut *S. massa* yang dikumpulkan dari Pantai Amed, Kabupaten Karangasem, Bali, serta mengevaluasi aktivitas biologis isolat jamur tersebut. Penelitian ini juga mengkaji pengaruh kadar garam media pertumbuhan terhadap produksi metabolit sekunder melalui fermentasi isolat jamur pada media dengan dan tanpa penambahan garam laut buatan. Identifikasi molekuler isolat jamur dilakukan menggunakan primer ITS1+4 untuk mengonfirmasi spesies jamur endofit, diikuti dengan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi golongan metabolit sekunder yang diproduksi. Evaluasi aktivitas biologis meliputi pengujian aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram-positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA ATCC 3351, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, dan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), bakteri Gram-negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922), dan jamur patogen (*Candida albicans* ATCC 10231). Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Studi ini diharapkan dapat berkontribusi dalam upaya eksplorasi produk alami bioaktif yang berasal dari jamur yang berasosiasi dengan spons laut.

MATERI DAN METODE

Bahan

Isolasi, purifikasi, dan pemeliharaan jamur menggunakan media agar yang mengandung *malt extract* (Himedia®, India), Bacto agar (Difco BD®, Maryland, AS), *yeast extract* (Oxoid®, Prancis), *artificial sea salt broth* (Himedia®, India), dan gliserol (Vivantis®, Malaysia). Media beras (Putri Sejati®, Indonesia) dengan atau tanpa penambahan

garam laut buatan digunakan untuk fermentasi jamur. Identifikasi molekuler menggunakan primer ITS1 dan ITS4, DNA polymerase, *nuclease free water* (Thermo Scientific®, Lithuania), agarosa (1st BASE®, Singapura), dan larutan tris-asetat-EDTA/TAE (1st BASE®, Singapura). Uji aktivitas antimikroba menggunakan *Mueller-Hinton Agar/MHA* (Oxoid®, Prancis), *Mueller-Hinton Broth/MHB* (Himedia®, India), *Sabouraud Dextrose Agar/SDA* (Oxoid®, Prancis), dan *Sabouraud Dextrose Broth/SDB* (Himedia®, India). Kloramfenikol (Nalgene®, AS) dan ketokonazol (Zoralin®, Indonesia) digunakan sebagai kontrol positif untuk uji aktivitas antimikroba. Uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH (Smart-Lab®, Indonesia) dengan asam askorbat (Supelco®, Jerman) sebagai kontrol positif. Etil asetat, metanol, dan n-heksana digunakan untuk proses ekstraksi. Uji toksisitas (BSLT) menggunakan *artificial sea salt broth* (Himedia®), akuades, metanol, dimetil sulfoksida (DMSO) (Sigma Aldrich®), dan larva udang *Artemisia salina* (Supreme Plus®).

Peralatan

Isolasi jamur dari spons laut *S. massa* dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) (LabTech®), menggunakan cawan Petri (Citotest®), tabung Erlenmeyer (Duran®), jarum inokulasi, dan skapel. Ekstraksi cair-cair menggunakan kertas saring (Whatman®), gelas ukur (Iwaki®), beaker (Iwaki®), corong pisah (Phyrex®), spatula logam, dan tabung bulat (Duran®). Sterilisasi alat dan bahan menggunakan autoklaf (Gemmy®). Penguapan ekstrak dilakukan menggunakan *Vacuum Rotary Evaporator* (Eyela®) dan *Heating block* (DLAB®). Ekstraksi DNA menggunakan Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research®, Amerika Serikat). Pengukuran absorbansi bakteri dan jamur untuk uji aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan spektrofotometer (Thermo Scientific®, Lithuania). Uji toksisitas menggunakan *microwell* 24-sumur (Biologix®), aerator, dan lampu pijar.

Cara Kerja

Pengambilan Sampel

Spons laut *S. massa* dikumpulkan dari Pantai Amed, Kecamatan Abang, Kabupaten Karangasem, Bali, Indonesia (8°21'00.8"S 115°40'58.4"E) pada bulan Juni 2024. Sampel spons segar ditempatkan dalam tabung *Eppendorf* steril 50 mL dan disimpan dalam wadah.

Isolasi Jamur dari Spons *Stylissa massa*

Sampel spons dibersihkan menggunakan air steril untuk menghilangkan kontaminasi permukaan dan mikroorganisme epifit. Jaringan spons yang telah dibersihkan dipotong kecil berukuran sekitar 0,5 cm² dalam kondisi aseptik. Potongan spons tersebut kemudian disterilkan dengan cara mencuci secara berurutan menggunakan etanol 70% selama 1 menit, natrium hipoklorit selama 3 menit, dan etanol 70% selama 30 detik, diikuti dengan tiga kali bilasan menggunakan akuades steril. Potongan spons yang disterilkan dipindahkan secara aseptik ke media isolasi yang mengandung ekstrak malt, Bacto agar, *artificial sea salt broth*, dan kloramfenikol dalam air demineralisasi untuk menghambat pertumbuhan bakteri kontaminasi (Reo *et al.*, 2025). Selanjutnya, media beras disiapkan dengan dan tanpa penambahan garam laut buatan untuk isolasi jamur. Kemudian, media yang telah diinokulasi, diinkubasi pada suhu ruang (28°C) dan pertumbuhan jamur diamati secara berkala selama 7-14 hari. Koloni jamur yang muncul dengan karakteristik morfologis yang berbeda di sub-kultur secara individual ke dalam media purifikasi yang mengandung campuran ekstrak malt, Bacto agar, dan *artificial sea salt broth* dalam air demineralisasi. Proses pemurnian diulang hingga diperoleh kultur jamur yang murni (Putra *et al.*, 2023). Pada penelitian ini diperoleh satu isolat jamur yang diberi kode SP2-2-4.

Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler isolat jamur dilakukan melalui analisis perbandingan urutan DNA di wilayah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) menggunakan pasangan primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGGG-3') sebagai primer awal dan ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3') sebagai primer akhir (Wulandari *et al.*, 2025). Ekstraksi DNA jamur dilakukan menggunakan *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit*. Amplifikasi wilayah ITS dari DNA yang diekstraksi dilakukan menggunakan Labcycler 48 Thermocycler dengan komposisi reaksi PCR yang terdiri dari 1 µL primer ITS1, 1 µL primer ITS4, 20 µL DNA polimerase, 17 µL *nuclease free water*, dan 1 µL DNA genomik jamur sebagai *template*. Program amplifikasi PCR diatur dengan kondisi pra-denaturasi pada suhu 95°C selama 1,5 menit diikuti oleh 35 siklus yang masing-masing terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C, *annealing* pada suhu 56°C, dan ekstensi pada suhu 72°C dengan setiap tahap berlangsung selama 1 menit serta diikuti dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 15 menit. Produk amplifikasi PCR

kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dalam *buffer* TAE (*Tris-asetat EDTA*) 1x pada tegangan 75 volt selama 45 menit untuk memastikan keberhasilan amplifikasi. Produk PCR yang terkonfirmasi lalu disekuensing untuk menentukan urutan basanya. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan *database* urutan nukleotida menggunakan program BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*) melalui GenBank di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Penyelarasan antara urutan referensi dan isolat jamur dilakukan secara berpasangan menggunakan algoritma MUSCLE. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan perangkat lunak MEGA versi 11.0.11 dengan metode *neighbor-joining* dan *bootstrap* 1.000 replikasi untuk mengevaluasi stabilitas topologi pohon filogenetik yang dihasilkan (Putra *et al.*, 2025).

Fermentasi dan Ekstraksi

Isolat jamur SP2-2-4 ditumbuhkan pada media beras dengan dua variasi, yaitu media tanpa garam dan media yang diperkaya dengan garam laut buatan. Komposisi media terdiri dari 100 g beras dan 110 mL akuades dengan penambahan 3,8 g *artificial sea salt broth* untuk media yang mengandung garam. Secara aseptis, proses kultur jamur murni dari media agar yang mengandung isolat jamur dipotong menjadi potongan kecil dan kemudian disebar secara merata di permukaan media beras yang telah disiapkan. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang hingga pertumbuhan miselium jamur menutupi seluruh permukaan media beras (Reo *et al.*, 2025). Kultur diekstraksi dengan dengan cara maserasi menggunakan 500 mL etil asetat. Proses maserasi dilakukan pada *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 8 jam. Hasil maserasi kemudian disaring dan pelarut diuapkan menggunakan *Vacuum Rotary Evaporator*. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dipisahkan menggunakan metode ekstraksi cair-cair antara pelarut metanol yang mengandung 10% air dan n-heksana (Ariantari *et al.*, 2023). Fraksi metanol yang diperoleh kemudian digunakan untuk skrining fitokimia dan uji aktivitas.

Skrining Golongan Kandungan Kimia

Identifikasi kandungan kimia dilakukan terhadap senyawa golongan alkaloid, terpenoid, steroid, triterpenoid, saponin, polifenol, dan flavonoid. Alkaloid dideteksi menggunakan reagen Dragendorff, Wagner, dan Bouchardat. Larutan ekstrak uji disiapkan dengan konsentrasi 6000 µg/mL. Prosedur dilakukan dengan mencampurkan 100 µL larutan ekstrak dengan 100 µL HCl 2N, kemudian ditambahkan masing-masing tiga tetes

reagen uji. Hasil positif alkaloid ditandai dengan pembentukan endapan oranye dengan reagen Dragendorff, endapan putih hingga kuning dengan reagen Wagner, dan endapan coklat hingga hitam dengan reagen Bouchardat. Terpenoid dideteksi melalui reaksi antara 200 µL ekstrak dengan 100 µL kloroform dan 100 µL H₂SO₄ pekat. Pembentukan lapisan merah kecokelatan di bagian atas larutan menandakan adanya senyawa terpenoid. Steroid dan triterpenoid dideteksi menggunakan reagen Lieberman-Burchardat. Adanya steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi biru kehijauan sementara triterpenoid ditandai dengan pembentukan cincin coklat atau ungu di antarmuka kedua pelarut. Deteksi saponin dilakukan dengan mengocok 200 µL larutan ekstrak secara vertikal selama 10 detik, diikuti penambahan satu tetes HCl 2N. Ketahanan busa yang terbentuk setelah penambahan asam menunjukkan adanya saponin. Selanjutnya, untuk deteksi polifenol, reagen FeCl₃ 10% direaksikan dengan 200 µL larutan ekstrak. Perubahan warna larutan menjadi biru gelap, biru kehitaman, atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa polifenol. Uji flavonoid dilakukan dengan menguapkan 200 µL larutan ekstrak hingga kering kemudian residu ditambahkan secara berurutan dengan 200 µL aseton, asam borat, asam oksalat, dan eter. Larutan yang dihasilkan diamati di bawah lampu UV 366 nm. Munculnya fluoresensi kuning yang intensif menunjukkan adanya flavonoid (Putra *et al.*, 2023).

Uji Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba mengacu pada protokol *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Aktivitas antimikroba ekstrak dianalisis menggunakan metode difusi cakram terhadap tujuh strain mikroba uji, termasuk bakteri Gram-positif yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 12228, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, dan *Bacillus cereus* ATCC 11778, serta bakteri Gram-negatif termasuk *Escherichia coli* ATCC 25922 dan jamur patogen *Candida albicans* ATCC 10231. Larutan uji disiapkan untuk mendapatkan konsentrasi akhir 5%. Suspensi mikroorganisme uji disiapkan dengan standar kekeruhan McFarland 0,5. Sebanyak 600 µL suspensi bakteri dan 550 µL suspensi jamur disebar merata di permukaan media agar yang sesuai. Cakram steril ditempatkan di permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Kemudian 10 µL larutan uji diteteskan ke setiap cakram. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam untuk bakteri dan 48-52 jam untuk jamur

(Wulandari *et al.*, 2025). Zona penghambatan yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur sebagai indikator aktivitas antimikroba. Semua uji dilakukan dalam tiga replikasi.

Uji Antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak dievaluasi menggunakan metode perendaman radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dengan berbagai konsentrasi yang dimulai dari 4, 6, 8, 10, dan 12 µg/mL. Prosedur uji dilakukan dengan mencampurkan 40 µL larutan DPPH 0,5 mM dengan 160 µL sampel ekstrak yang dilarutkan dalam metanol dalam *microwell* 96-sumur. Campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu ruangan dalam kondisi gelap selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm (Wulandari *et al.*, 2025). Prinsip metode ini didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan sebagai donor proton untuk menangkap radikal bebas DPPH yang ditandai dengan penurunan absorbansi akibat berkurangnya konsentrasi radikal bebas dalam larutan uji (Setiawan *et al.*, 2018). Setiap uji dilakukan tiga replikasi.

Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan larva udang *A. salina* yang diperoleh dari penetasan telur selama 48 jam dalam air laut buatan pada suhu 25-30°C dengan aerasi dan pencahayaan lampu pijar. Larutan uji disiapkan dengan melarutkan 10 mg ekstrak dalam 50 µL DMSO kemudian dilarutkan dengan air laut buatan hingga volume 5 mL untuk mendapatkan konsentrasi induk 2000 µg/mL. Selanjutnya, pengenceran seri dua kali lipat dilakukan menggunakan *microwell* 24-sumur untuk memperoleh seri konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250; 500, dan 1000 µg/mL. Sepuluh larva udang yang aktif bergerak ditempatkan dalam setiap sumur yang mengandung larutan uji pada berbagai konsentrasi dengan kontrol negatif berupa campuran 1% DMSO dalam air laut buatan. *Microwell* diinkubasi pada suhu ruangan di bawah cahaya selama 24 jam, kemudian jumlah larva hidup dan mati dihitung untuk analisis persentase mortalitas dan penentuan nilai LC_{50} melalui analisis probit (Ariantari *et al.*, 2023). Ekstrak dikategorikan sebagai toksik jika menyebabkan kematian 50% larva uji pada konsentrasi <1000 µg/mL, sementara ekstrak dengan nilai LC_{50} >1000 µg/mL diklasifikasikan sebagai non-toksik (Dangeubun and Katja, 2022).

Analisis Data

Aktivitas antimikroba ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat di sekitar kertas cakram. Aktivitas antimikroba dianalisis berdasarkan kategori penghambatan yang diklasifikasikan ke dalam empat kategori, yaitu daya hambat lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat (>20 mm). Diameter zona penghambatan dihitung sebagai berikut:

$$\text{Zona Inhibisi} = \frac{(A-C)+(B-C)}{2} \quad (1)$$

Keterangan:

A : Diameter vertikal zona bening

B : Diameter horizontal zona bening

C : Diameter kertas cakram

Aktivitas antioksidan dianalisis secara kuantitatif dan dikategorikan berdasarkan nilai IC_{50} . Aktivitas antioksidan dianggap sangat kuat jika nilai IC_{50} di bawah 50 µg/mL; kuat IC_{50} = 50–100 µg/mL, sedang IC_{50} = 101–250 µg/mL, lemah IC_{50} = 250–500 µg/mL, dan tidak aktif jika IC_{50} di atas 500 µg/mL. IC_{50} dihitung dari regresi linier konsentrasi sampel terhadap persentase penghambatan. Persentase penghambatan ekstrak terhadap radikal bebas dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (2)$$

Keterangan:

A : Absorbansi blanko

B : Absorbansi sampel

(Wulandari *et al.*, 2025)

Parameter uji toksisitas ditentukan dengan mengamati jumlah kematian larva udang *A. salina* selama periode inkubasi 24 jam pada berbagai konsentrasi perlakuan. Analisis uji toksisitas dilakukan dengan menghitung persentase kematian menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva total}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

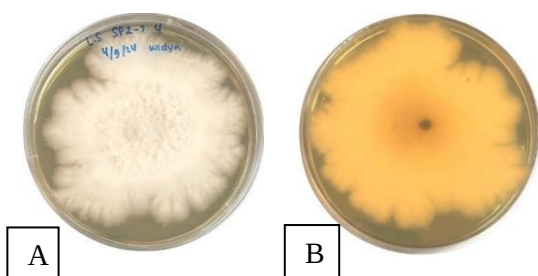
Isolasi dan Purifikasi

Isolasi jamur dari spons laut *S. massa* (Gambar 1) yang diperoleh dari Pantai Amed, Karangasem, Bali menghasilkan satu isolat jamur yang selanjutnya diberi kode SP2-2-4 (Gambar 2). Proses isolasi dan purifikasi dilakukan hingga didapatkan isolat jamur murni yang selanjutnya ditumbuhkan pada media yang mengandung Bacto agar, *malt extract*, *yeast extract* dan gliserol sebagai media pemeliharaan jamur. Kultur jamur yang diperoleh kemudian dikultivasi pada media beras dengan dua

perlakuan berbeda yaitu media dengan dan tanpa penambahan garam laut buatan. Perlakuan media dengan penambahan garam bertujuan untuk menciptakan tekanan osmotik yang sesuai, dan meniru kondisi salinitas laut.



Gambar 1. Penampakan makroskopis spons laut *S. massa*.



Gambar 2. Penampakan isolat SP2-2-4 pada media yang mengandung Bacto agar, *malt extract*, *yeast extract* dan gliserol: (A) Isolat SP2-2-4 tampak atas; (B) Isolat SP2-2-4 tampak bawah.

Berdasarkan Gambar 1, spons laut *S. massa* menunjukkan penampakan makroskopis dengan morfologi berbentuk masif atau globular dengan permukaan yang tidak rata dan bertekstur kasar. Warna cokelat kekuningan hingga cokelat keemasan mencirikan karakteristik khas dari spesies ini dengan permukaan yang tampak bergelombang dan memiliki beberapa tonjolan tidak beraturan yang memberikan tekstur seperti berongga atau berpori. Struktur permukaan menunjukkan adanya pori-pori kecil yang tersebar di seluruh permukaan spons yang berfungsi sebagai jalur masuknya air untuk sistem filtrasi makanan (Kandio *et al.*, 2021).

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis tersebut, identifikasi spons pada penelitian ini dilakukan dengan mengacu pada karakter penampakan morfologi secara makroskopis yang kemudian dibandingkan dengan data pembandingan pada GenBank. Meskipun demikian, pendekatan ini memiliki keterbatasan karena karakter morfologi spons laut sering kali menunjukkan variasi yang tinggi dan tidak selalu mencerminkan perbedaan spesies secara pasti. Oleh karena itu, pendekatan lanjutan berbasis genomik disarankan untuk meningkatkan ketepatan identifikasi.

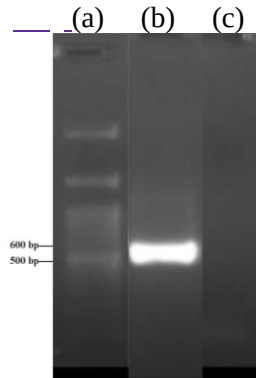
Penampakan makroskopis isolat jamur SP2-2-4 (Gambar 2) menunjukkan koloni jamur dengan pertumbuhan miselium yang padat dan tekstur seperti kapas, berwarna putih hingga abu-abu keputihan. Miselium menyebar secara radial dari titik inokulasi di tengah cawan Petri membentuk pola pertumbuhan yang relatif merata di seluruh permukaan media. Pinggiran koloni tampak lebih tipis dengan miselium yang lebih halus sementara bagian tengah memiliki kepadatan miselium yang lebih tinggi. Pertumbuhan koloni menutupi hampir seluruh permukaan cawan Petri yang menunjukkan laju pertumbuhan yang relatif cepat.

Pada penampakan makroskopis bagian bawah isolat jamur SP2-2-4 menunjukkan pigmentasi berwarna kuning cerah hingga kuning kecokelatan dengan warna yang lebih gelap di bagian tengah. Pola pigmen ini tersebar ke dalam media agar yang menunjukkan produksi pigmen ekstraseluler oleh jamur. Pusat koloni berwarna lebih gelap yang kemungkinan terkait dengan zona produksi spora yang lebih intensif, sementara tepi yang lebih terang menunjukkan zona pertumbuhan miselium yang aktif.

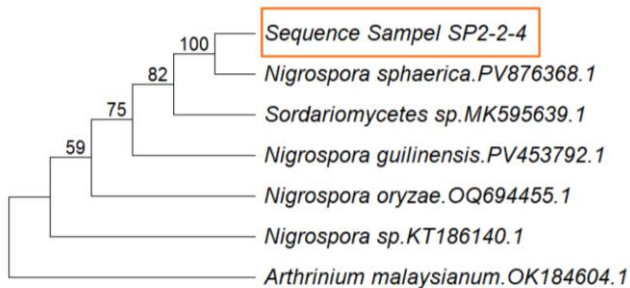
Identifikasi Molekuler

Identifikasi spesies secara molekuler menggunakan primer ITS1 dan 4 didasarkan pada perbandingan urutan basa DNA pada daerah tersebut yang menunjukkan variabilitas genetik yang lebih tinggi antar spesies, sehingga wilayah ini sering digunakan untuk identifikasi tingkat spesies (Wulandari *et al.*, 2025). Hasil penelitian ini menunjukkan amplifikasi DNA isolat jamur SP2-2-4 menghasilkan fragmen DNA berukuran 500-700 pasangan basa (*base pair*, bp) seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Berdasarkan analisis dengan BLASTN dari *database* GenBank, isolat jamur SP2-2-4 diidentifikasi sebagai *Nigrospora sphaerica* dengan persentase kemiripan yang tinggi yaitu 99,41% terhadap referensi GenBank dengan *accession number* PV876368.1, *maximum score* 924, *query coverage* 100%, dan *E value* 0. Selain itu, sekuens DNA isolat SP2-2-4 pada penelitian ini telah didaftarkan ke dalam *database* GenBank dan memperoleh *accession number* PZ344543 sebagai identitas resmi data sekuens tersebut. Hasil analisis filogenetik (Gambar 4) juga menunjukkan bahwa isolat SP-2-2-4 (PZ344543) membentuk klaster dengan *N. sphaerica* (PV876368.1) yang didukung oleh nilai *bootstrap* 100 yang mengindikasikan hubungan kekerabatan yang sangat kuat. Dalam analisis pohon filogenetik, isolat ini juga menunjukkan kedekatan dengan *Sordariomycetes* sp. (MK595639.1), *N. guilensis* (PV453792.1), *N. oryzae* (OQ694455.1), serta *Nigrospora* sp.

(KT186140.1) namun dengan nilai *bootstrap* yang lebih rendah yang mengindikasikan hubungan kekerabatan yang kurang kuat. *Arthrinium malaysianum* (OK184604.1) digunakan sebagai *outgroup* yaitu berada di luar kelompok *ingroup* yang sesuai dengan fungsinya sebagai titik akar (*root*) untuk menentukan arah evolusi pohon filogenetik.



Gambar 3. Visualisasi produk PCR dari amplifikasi wilayah ITS dengan gel elektroforesis dibawah UV Transiluminator ; (a): DNA ladder, (b): DNA isolat SP2-2-4, dan (c): kontrol negatif.



Gambar 4. Analisis pohon filogenetik isolat SP2-2-4 berdasarkan perbandingan wilayah ITS menggunakan algoritma *neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1.000x.

Beberapa studi melaporkan genus *Nigrospora* khususnya *N. sphaerica*, merupakan jamur yang menyebabkan pembusukan pada pisang dan juga ditemukan menyebabkan bercak pada daun, ranting, dan tunas pada tanaman *blueberry* (Irsadi, 2023). Studi lain tentang jamur *Nigrospora* yang dilakukan oleh Elkhateeb and Daba, (2022) melaporkan bahwa jamur *Nigrospora* mampu menghasilkan metabolit sekunder terutama dari kelompok poliketida seperti furanon dan kuinon serta senyawa fenazin yang menunjukkan berbagai aktivitas biologis termasuk aktivitas sitotoksik, antifungal, antibakteri, dan antioksidan. Selain itu, metabolit lain seperti azafilon dan hidroantrakuinon yang diisolasi dari *Nigrospora* sp. YE3033 juga menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap virus influenza.

Fermentasi dan Ekstraksi

Fermentasi jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 pada media beras dilakukan dalam dua kondisi berbeda, yaitu dengan dan tanpa penambahan garam laut buatan untuk mengoptimalkan produksi metabolit sekunder. Penambahan garam laut buatan bertujuan untuk meniru kondisi lingkungan alami jamur endofit yang berasal dari spons laut, di mana kadar garam merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi jalur biosintesis metabolit sekunder (Conkling *et al.*, 2019). Hasil fermentasi menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam jumlah ekstrak yang diperoleh antara kedua kondisi media fermentasi.

Ekstraksi dilakukan secara bertahap terhadap satu hasil fermentasi dari dua kondisi yang berbeda dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut untuk memperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kasar yang dihasilkan kemudian dipartisi lebih lanjut melalui ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut metanol (mengandung 10% air) dan n-heksana, sehingga didapatkan ekstrak metanol dan ekstrak n-heksana. Pada fermentasi jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 dengan media yang diperkaya dengan garam laut diperoleh ekstrak kasar etil asetat sebesar 1,8386 g dan setelah pemisahan lanjutan diperoleh ekstrak metanol sebesar 1,1094 g dan ekstrak n-heksana sebesar 0,7292 g. Sebaliknya, pada fermentasi jamur dalam media tanpa penambahan garam, hasil ekstraksi menurun drastis di mana ekstrak etil asetat yang diperoleh sebesar 0,4304 g, ekstrak n-heksana sebesar 0,2994 g, dan ekstrak metanol sebesar 0,131 g. Perbedaan signifikan pada hasil ini mengindikasikan bahwa kondisi salin diduga dapat merangsang produksi metabolit sekunder oleh jamur melalui aktivasi gen biosintesis yang responsif terhadap tekanan osmotik (Tsipinana *et al.*, 2023). Peningkatan hasil ekstrak dalam kondisi salin juga kemungkinan disebabkan oleh induksi jalur biosintesis metabolit sekunder sebagai mekanisme adaptasi jamur terhadap stres osmotik yang pada akhirnya meningkatkan akumulasi senyawa bioaktif dalam biomassa jamur.

Analisis Kandungan Kimia

Analisis kandungan kimia ekstrak metanol jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 menunjukkan profil metabolit sekunder yang dipengaruhi secara signifikan oleh kondisi fermentasi terutama dengan penambahan garam laut buatan dalam media kultur. Hasil skrining fitokimia pada beberapa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, steroid, dan triterpenoid menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam komposisi metabolit antara dua kondisi kultivasi. Ekstrak yang

diperoleh dari fermentasi dengan penambahan garam laut buatan menunjukkan adanya alkaloid dan polifenol, sementara ekstrak dari media tanpa garam menunjukkan hasil positif untuk alkaloid dan triterpenoid. Perbedaan komposisi metabolit sekunder ini menunjukkan bahwa tekanan osmotik yang disebabkan oleh salinitas media kemungkinan dapat mengaktifkan jalur biosintesis spesifik yang menghasilkan senyawa polifenolik yang kemungkinan berkontribusi sebagai mekanisme adaptasi jamur terhadap kondisi stres lingkungan (Isah, 2019).

Deteksi alkaloid dalam kedua kondisi fermentasi mengindikasikan sintesis senyawa nitrogen heterosiklik yang merupakan jalur metabolik konstitutif pada jamur *N. sphaerica* SP2-2-4. Alkaloid umumnya memiliki aktivitas biologis yang beragam termasuk sifat antimikroba, antikanker, dan neuroprotektif sehingga keberadaan golongan metabolit tersebut dalam ekstrak jamur ini mengindikasikan kemungkinan potensi farmakologis (Salwa, 2025). Sebaliknya, produksi polifenol yang hanya terjadi dalam media fermentasi mengandung garam menunjukkan bahwa sintesis senyawa fenolik kompleks bersifat adaptif dan diinduksi oleh kondisi lingkungan spesifik.

Senyawa triterpenoid yang hanya terdeteksi dalam ekstrak dari media tanpa garam menunjukkan regulasi metabolik yang kompleks dalam respons jamur terhadap perubahan kondisi lingkungan. Triterpenoid adalah kelompok senyawa dengan kerangka karbon C_{30} yang memiliki berbagai aktivitas biologis termasuk sifat antiinflamasi, hepatoprotektif, dan sitotoksik. Inhibisi produksi triterpenoid di bawah kondisi garam kemungkinan disebabkan oleh alokasi sumber daya metabolik yang dialihkan ke sintesis senyawa adaptif lainnya seperti alkaloid (Herdhiansyah *et al.*, 2015). Sebaliknya, flavonoid, saponin, terpenoid, dan steroid tidak terdeteksi dalam kedua kondisi fermentasi yang menunjukkan bahwa jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 memiliki profil metabolit yang relatif spesifik dan terbatas pada kelas senyawa tertentu. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh karakteristik genetik jamur yang tidak memiliki klaster gen untuk biosintesis senyawa-senyawa tersebut atau kondisi fermentasi yang belum optimal untuk menginduksi jalur biosintesis ini.

Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba pada ekstrak jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 menunjukkan ekstrak yang diperoleh dari fermentasi dengan penambahan garam laut buatan tidak menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap semua mikroorganisme uji termasuk bakteri Gram-positif, bakteri Gram-

negatif, dan jamur patogen. Sebaliknya, ekstrak yang diperoleh dari fermentasi tanpa penambahan garam menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dengan zona hambat $2,57 \pm 0,24$ mm pada konsentrasi ekstrak uji 5%, dan tidak menunjukkan aktivitas terhadap mikroorganisme uji yang lain. Aktivitas antimikroba ini dapat dikaitkan dengan profil fitokimia ekstrak yang menunjukkan adanya triterpenoid dalam ekstrak hasil fermentasi pada media tanpa garam. Golongan senyawa ini secara umum diketahui memiliki mekanisme antimikroba melalui gangguan pada membran sel bakteri dan interferensi dengan protein membran jamur (Tumiwa *et al.*, 2019). Zona hambat yang relatif kecil menunjukkan aktivitas antimikroba ekstrak yang tergolong lemah menurut kriteria standar tetapi selektivitasnya terhadap *S. aureus* menunjukkan adanya senyawa bioaktif spesifik dengan potensi untuk pengembangan lebih lanjut. Selain itu, tidak aktifnya ekstrak yang mengandung alkaloid dan polifenol juga menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa aktif kemungkinan belum mencapai konsentrasi penghambatan minimum yang diperlukan atau senyawa-senyawa tersebut memiliki target aktivitas biologis yang berbeda.

Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas

Evaluasi ekstrak jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 melalui uji antioksidan dan toksisitas menunjukkan profil bioaktivitas yang secara signifikan dipengaruhi oleh kondisi media kultur. Berdasarkan Tabel 1, ekstrak yang diperoleh dari fermentasi dengan penambahan garam laut buatan menunjukkan nilai $IC_{50} > 500$ $\mu\text{g/mL}$ pada uji antioksidan dan dikategorikan sebagai tidak aktif, tetapi memiliki aktivitas toksik yang tinggi dengan nilai $LC_{50} 59,45 \pm 1,54$ $\mu\text{g/mL}$. Sebaliknya, ekstrak dari fermentasi tanpa penambahan garam menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dengan nilai $IC_{50} 224,42 \pm 12,14$ $\mu\text{g/mL}$ yang dikategorikan sebagai moderat dan menunjukkan aktivitas toksisitas yang lebih rendah dengan nilai $LC_{50} 103,31 \pm 21,71$ $\mu\text{g/mL}$ yang diklasifikasikan sebagai toksik moderat. Perbedaan profil bioaktivitas ini menunjukkan bahwa kadar garam pada media kultur tidak hanya mempengaruhi komposisi metabolit sekunder yang dihasilkan tetapi juga secara fundamental mengubah karakteristik aktivitas biologis ekstrak.

Fenomena menarik adalah korelasi terbalik antara aktivitas antioksidan dan toksisitas di mana ekstrak dengan aktivitas antioksidan rendah menunjukkan toksisitas tinggi dan sebaliknya. Hal ini menunjukkan bahwa stres osmotik yang diinduksi oleh penambahan garam dapat memicu

produksi metabolit sekunder melalui mekanisme yang berbeda yang kemungkinan disebabkan melalui aktivasi jalur biosintesis senyawa toksik yang tidak memiliki aktivitas penangkap radikal bebas tetapi efektif dalam memicu kematian larva *A. salina*. Meskipun aktivitas antioksidan ekstrak dari fermentasi tanpa garam masih moderat dengan IC_{50} yang relatif tinggi dibandingkan dengan kontrol positif asam askorbat, potensi pengembangan lebih lanjut dapat dieksplorasi melalui optimasi media kultivasi, pemilihan metode ekstraksi yang lebih selektif, atau fraksinasi untuk mengisolasi senyawa bioaktif spesifik yang bertanggung jawab atas aktivitas biologis tertentu.

Tabel 1. Aktivitas antioksidan[#] dan nilai toksisitas ekstrak jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 yang diperoleh dari spons laut *S. massa*^{##}

Ekstrak metanol	Garam dalam media	Aktivitas antioksidan $IC_{50} \pm SD^*$ ($\mu g/mL$)	Nilai toksisitas $LC_{50} \pm SD^{**}$ ($\mu g/mL$)
<i>Nigrospora sphaerica</i> SP2-2-4	Dengan	>500	59,45 $\pm$ 1,54
	Tanpa	224,42 $\pm$ 12,14	103,31 $\pm$ 21,71

*Kategori antioksidan berdasarkan IC_{50} : sangat kuat (<50 $\mu g/mL$), kuat (50-100 $\mu g/mL$), sedang (101-250 $\mu g/mL$), lemah (250-500 $\mu g/mL$), tidak aktif (>500 $\mu g/mL$) (Endra *et al.*, 2021).

**Klasifikasi toksisitas sebagai berikut: LC_{50} >1000 $\mu g/mL$: tidak toksik, LC_{50} 500-1000 $\mu g/mL$: toksisitas rendah, LC_{50} 100-500 $\mu g/mL$: toksisitas sedang, LC_{50} 0-100 $\mu g/mL$: toksisitas tinggi (Hamidi *et al.*, 2014).

[#]Asam askorbat (IC_{50} = 6,79 $\pm$ 0,10 $\mu g/mL$) digunakan sebagai senyawa acuan dalam pengujian antioksidan.

^{##}Setiap uji dilakukan dengan tiga replikasi.

Berdasarkan hasil uji antimikroba dan toksisitas ditemukan fenomena menarik di mana ekstrak jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 yang difermentasi dengan penambahan garam laut tidak menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap semua mikroorganisme uji tetapi memiliki toksisitas kuat dengan LC_{50} sebesar 59,45 $\pm$ 1,54 $\mu g/mL$. Fenomena ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan profil metabolit sekunder yang dihasilkan dalam kondisi salinitas yang berbeda. Kondisi salinitas tinggi dalam media fermentasi memicu produksi alkaloid dan polifenol seperti yang ditunjukkan oleh hasil skrining fitokimia. Meskipun kedua kelompok senyawa tersebut diketahui memiliki potensi antimikroba, aktivitas antimikroba yang tidak terdeteksi dalam ekstrak ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti konsentrasi senyawa bioaktif yang dihasilkan tidak cukup untuk mencapai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang

diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji atau senyawa yang diproduksi dalam kondisi salinitas tinggi memiliki spesifisitas target yang berbeda di mana mekanisme aksinya lebih diarahkan pada aktivitas toksik umum daripada aktivitas antimikroba spesifik terhadap bakteri atau jamur patogen (Fernando *et al.*, 2023).

Aktivitas toksik tinggi yang ditunjukkan oleh ekstrak yang diperoleh dari fermentasi dengan penambahan garam menunjukkan bahwa stres osmotik mampu mengaktifkan jalur biosintesis metabolit sekunder melalui mekanisme toksik non selektif (Zhang *et al.*, 2024). Alkaloid dan polifenol yang diproduksi dalam kondisi salinitas tinggi kemungkinan memiliki struktur molekul yang lebih kompleks dan bersifat toksik, serta kemungkinan memiliki potensi sitotoksitas pada sel eukariotik. Uji lanjutan perlu dilakukan untuk mengevaluasi potensi sitotoksik ekstrak jamur tersebut terhadap sel kanker. Mekanisme toksisitas ini berbeda dengan mekanisme antimikroba yang umumnya melibatkan interaksi spesifik dengan komponen dinding sel bakteri dan membran sel jamur patogen (Bafadal *et al.*, 2021). Korelasi terbalik antara aktivitas antimikroba dan toksisitas dalam kedua kondisi fermentasi kemungkinan menunjukkan adanya perbedaan produksi senyawa metabolit sekunder dalam respons jamur terhadap stres lingkungan. Dalam kondisi salinitas tinggi, alokasi sumber daya metabolit beralih ke produksi senyawa pertahanan dengan toksisitas tinggi sebagai strategi pertahanan hidup, sementara dalam kondisi normal jamur memproduksi metabolit seperti triterpenoid yang memiliki aktivitas antimikroba lebih spesifik tetapi toksisitas lebih rendah.

SIMPULAN

Isolat jamur *N. sphaerica* SP2-2-4 yang diisolasi dari spons laut *S. massa* diidentifikasi secara molekuler dengan tingkat kemiripan 99,41% terhadap referensi GenBank. Analisis fitokimia ekstrak jamur ini menunjukkan bahwa kadar garam media kultur secara signifikan mempengaruhi profil metabolit sekunder dari ekstrak metanol yang dihasilkan. Ekstrak hasil fermentasi pada media dengan penambahan garam menghasilkan alkaloid dan polifenol, sementara fermentasi pada media tanpa garam menghasilkan alkaloid dan triterpenoid. Uji antimikroba menunjukkan bahwa hanya ekstrak metanol dari fermentasi tanpa garam yang memiliki aktivitas antimikroba lemah terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dengan zona hambat 2,57 $\pm$ 0,24 mm. Uji aktivitas antioksidan dan toksisitas menunjukkan fenomena menarik, di mana ekstrak

dari fermentasi jamur pada media dengan penambahan garam tidak aktif pada uji aktivitas antioksidan ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), tetapi memiliki nilai toksisitas yang tinggi ($LC_{50} = 59,45 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$). Sementara itu, ekstrak dari fermentasi jamur pada media tanpa garam menunjukkan aktivitas antioksidan sedang ($IC_{50} = 22,42 \pm 12,14 \mu\text{g/mL}$) dengan toksisitas sedang ($LC_{50} = 103,31 \pm 21,17 \mu\text{g/mL}$). Temuan dalam studi ini mengenai pengaruh salinitas terhadap biosintesis metabolit sekunder dan profil aktivitas biologis diharapkan menjadi titik awal untuk pengembangan lebih lanjut terutama dalam isolasi senyawa spesifik yang bertanggung jawab atas aktivitas antimikroba, antioksidan, dan toksisitas dari ekstrak metanol jamur *N. sphaerica* SP2-2-4.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Udayana, atas dana penelitian yang diberikan melalui Hibah Penelitian “Kampus Merdeka” (no. B/266.46/UN14.4.A/PT.01.03/2024 dan B/230.58/UN14.4.A/PT.01.03/2025), serta kepada pemerintah daerah Kabupaten Karangasem, Bali, Indonesia atas izin yang diberikan untuk pengumpulan sampel spons laut.

DAFTAR PUSTAKA

- Elkhateeb, A. W., and Daba, M. G. 2022. Chemical and Bioactive Metabolites of *Mumicola* and *Nigrospora* Secondary Metabolites. *Pharmaceutics and Pharmacology Research*, 5(1): 1–4.
- Ariantari, N. P., Putra, I. P. Y. A., Leliqia, N. P. E., Yustiantara, P. S., Proborini, M. W., Nugraheni, N., Zulfin, U. M., Jenie, R. I., and Meiyanto, E. 2023. Antibacterial and Cytotoxic Secondary Metabolites from Endophytic Fungi Associated with *Antidesma Bunius* Leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 13(7): 132–143.
- Bafadal, M., Ode Mutiara, W., Hajrul Malaka, M., Fristiohady, A., M Yodha, A. W., Sadarun, B., Sahidin, I., dan Anduonohu, K. 2021. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol *Petrosia* sp. Secara *In Vitro* Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, 7(3): 2579–4558.
- Conkling, M., Hesp, K., Munroe, S., Sandoval, K., Martens, D. E., Sipkema, D., Wijffels, R. H., and Pomponi, S. A. 2019. Breakthrough in Marine Invertebrate Cell Culture: sponge cells Divide Rapidly in Improved Nutrient Medium. *Scientific Reports*, 9(1): 1–10.
- Dangeubun, E. J., dan Katja, D. 2022. Sifat Toksisitas dan Kemampuan Penghambatan Enzim A-Amilase Dari Ekstrak Biji Buah Matoa (*Pometia Pinnata* J. R dan G. Forst). *Chemistry Progress*, 15(1): 1–8.
- Fernando, L. D., Pérez-Llano, Y., Dickwella Widanage, M. C., Jacob, A., Martínez-Ávila, L., Lipton, A. S., Gunde-Cimerman, N., Latgé, J. P., Batista-García, R. A., and Wang, T. 2023. Structural Adaptation of Fungal Cell Wall in Hypersaline Environment. *Nature Communications*, 14(1): 1–13.
- Herdhiansyah, R., Zetra, Y., dan Nugraheni, Z. V. 2015. Senyawa Lipid Spons *Haliclona cymaeformis* sebagai Biomarka dan Aktivitasnya terhadap Mikroba. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 4(2): 8–13.
- Isah, T. 2019. Stress and Defense Responses in Plant Secondary Metabolites Production. *Biological Research*, 52(1): 39.
- Kandio, E. F., Yudistira, A., dan Runtuwene, J. M. R. 2021. Isolasi Bakteri Endofit Simbion dari Spons *Stylissa* sp. dan Uji Aktivitas Antibakteri serta Identifikasi secara Molekuler Menggunakan Gen 16S rRNA. *Pharmacon*, 10 (1): 649-654.
- Presson, J., Swasono, R. T., Matsjeh, S., Putri, M. P., Az Zahra, Z., and Pardosi, L. 2021. Antimalarial Activity of Sea Sponge Extract of *Stylissa massa* Originating from Waters of Rote Island. *Journal of Scientific and Applied Chemistry*, 24(4): 136–145.
- Putra, I. P. Y. A., Ariantari, N. P., Wibowo, J. T., Leliqia, N. P. E., Dwija, I. B. N. P., Wulandari, N. M. W., Dwijayanti, N. K., Putri, N. P. A. E., and Dewi, K. T. N. 2025. *Phyllospongia foliascens*-Derived Fungi: Molecular Identification, Antimicrobial Activity and Secondary Metabolite Profile of Their Methanolic Extracts. *Bio Web of Conferences*, 176(1): 1-12.
- Putra, I. P. Y. A., Utami, K. S., Hardini, J., Wirasuta, I. M. A. G., Ujam, N. T., and Ariantari, N. P. 2023. Fermentation, Bioactivity and Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Mangrove *Ceriops tagal*. *Biodiversitas*, 24(5): 3091–3098.
- Hamidi, R. M., Jovanova, B., and Panovska, T. K. 2014. Toxicological Evaluation of the Plant Products Using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(1): 9–18.
- Reo, M. E. E. N., Dewi, K. T. N., Leliqia, N. P. E.,

- dan Ariantari, N. P. 2025. Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Jamur yang Diisolasi dari Spons *Phyllospongia foliascens* Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Farmasi Udayana*, 14(1): 41-50.
- Salwa. 2025. Original Article Antibacterial Activity Test of Fractionated Alkaloid Extract from Raru Bark (*Cotylelobium melanoxydon* pierre) Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 8(3): 1425–1441.
- Setiawan, F., Yunita, O., dan Kurniawan, A. 2018. Antioxidant Activity Test of Secang Wood Ethanol Extract and FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2(2): 82–89.
- Tsipinana, S., Husseiny, S., Alayande, K. A., Raslan, M., Amoo, S., and Adeleke, R. 2023. Contribution of Endophytes Towards Improving Plant Bioactive Metabolites: a Rescue Option Against Red-Taping of Medicinal Plants. *Frontiers in Plant Science*, 14(9): 1–20.
- Tumiwa, P. I., Yudistira, A., dan Wewengkang, D. S. 2019. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Jamur Laut yang Diisolasi dari Organisme Laut Spons *Phyllospongia lamellosa* yang Diambil dari Perairan Desa Tumbak, Kecamatan Pusomaen, Kabupaten Minahasa Tenggara Terhadap Mikroba *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*. *Pharmakon*, 8(4): 851-859.
- Trifani, R., Noverita., Hadi, T. A., and Sinaga, E. 2021. Antibacterial Activity of Endosymbiotic Fungi Isolated From Marine Sponges Collected From Kotok Kecil Island, Seribu Islands, Jakarta. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 948(1): 1-13.
- Varijakzhan, D., Loh, J. Y., Yap, W. S., Yusoff, K., Seboussi, R., Lim, S. H. E., Lai, K. S., and Chong, C. M. 2021. Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine Drugs*, 19(5): 1-38.
- Wigati, D., Setyowati, E. P., Pratiwi, S. U. T., and Nugraha, A. S. 2024. Promising Sponge Derived Marine Fungi as Antibacterial and Biofilm Inhibitors. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(4): 14–34.
- Wulandari, N. M. W., Dwijayanti, N. K., Putri, N. P. A. E., Putra, I. P. Y. A., Leliqia, N. P. E., Wibowo, J. T., Dwija, I. B. N. P., and Ariantari, N. P. 2025. Bioactivities and Molecular Identification from Marine Sediment-Derived Fungi Isolated from Amed and Tulamben Beaches. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 11(1): 74–85.
- Zhang, J., Lu, J., Zhu, Y., Shen, X., Zhu, B., and Qin, L. 2024. Roles of Endophytic Fungi in Medicinal Plant Abiotic Stress Response and TCM Quality Development. *Chinese Herbal Medicines*, 16(2): 204–213.