

Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Isolated from Parang Romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill) Leaves Against Gastrointestinal Pathogens

Rusli^{1*}, Ayyub Harly Nurung¹, Muh Ivan Sandyna¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

Article info

Received: 04/08/2024

Available online: 04/11/2024

Corresponding Author:

Rusli
Department of Microbiology,
Faculty of Pharmacy, Universitas
Muslim Indonesia, Makassar,
South Sulawesi, Indonesia
email: rusli@umi.ac.id

ABSTRACT

Parang romang (Boehmeria virgata (G.Forst) Guill) is a plant traditionally used for treating various digestive tract infections. However, obtaining bioactive compounds directly from the plant requires significant biomass. Therefore, endophytic fungi, sourced from specific plant parts, are explored for their ability to produce similar bioactive compounds. The research examined the potential antibacterial activity of endophytic fungi isolated from parang romang leaves against common gastrointestinal pathogens. The methods used in was, characterization of endophytic fungal isolates, and antagonistic activity was evaluated using the agar diffusion method. The results showed that the endophytic fungal strains, namely isolates IFBV 6, IFBV 7, and IFBV 10 could inhibit the bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, and *Vibrio cholera*. With an average zone of inhibition for each strains isolate against *Esherichia coli* respectively 11.53 mm, 10.49 mm, and 14.85 mm; *Salmonella typhi* 14.47 mm, 8.66 mm, and 15.51 mm; *Shigella dysenteriae* 22.28 mm, 13.76 mm, and 15.33 mm; and *Vibrio cholera* 16.91mm, 11.94mm, 15.16mm. In conclusion, isolated endophytic fungal strains hold promise as potential as antibacterialn agents.

Keyword:

Antibacterial, *Boehmeria virgata* (G.Fosrt) Guill, Endophytic fungi Parang romang



Copyright ©2024 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](#).

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang diakibatkan penginvasian bakteri terhadap inangnya yang muncul secara klinis atau tanpa gejala bergantung pada keadaan pasiennya¹. Infeksi saluran cerna merupakan suatu invasi bakteri yang terjadi ketika pertahanan lokal dielakkan oleh patogen, atau ketika mereka sangat lemah sehingga bahkan flora normalpun dapat menyebabkan penyakit, kebanyakan patogen gastrointestinal ditularkan melalui

makanan dan minuman yang terkontaminasi bahan feses. Infeksi ini sering terjadi pada lambung, usus halus, dan usus besar. Infeksi ini terjadi karena jumlah bakteri yang menguntungkan atau flora normal pada saluran cerna meningkat dan masuknya bakteri penyebab penyakit dari luar tubuh². Mikroorganisme penyebab infeksi saluran cerna dapat berupa virus, protozoa, bakteri, fungi atau parasit. Penyebab tersering adalah bakteri *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, dan

*Escherichia coli*³. Kasus penyakit infeksi di Indonesia dinilai masih cukup tinggi, berdasarkan data profil kesehatan Indonesia diketahui penyakit infeksi bakteri menjadi penyebab kematian tertinggi pada kelompok anak balita (12 - 59 bulan) dengan total 19,7%. Dengan diare sebagai penyumbang angka terbanyak pertama yaitu sebanyak 239 kasus. Serta menempati posisi kedua sebagai penyebab kematian pada kelompok anak usia 29 hari – 11 bulan yaitu sebanyak 715 kasus⁴.

Salah satu cara mengatasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri yaitu dengan menggunakan zat antibakteri. Antibakteri merupakan suatu zat hasil pengembangan antimikroba yang berfungsi melindungi tubuh dari serangan bakteri patogen dengan menargetkan titik-titik kerentanan dari bakteri penginvasi⁵. Antibakteri atau antibiotik terbagi atas dua berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu bakterisidal (membunuh bakteri) dan bakteriostatik (menghentikan perkembang biakan bakteri)⁶. Antibakteri dapat berupa senyawa kimia sintesis, alami atau metabolit sekunder yang dihasilkan oleh berbagai organisme⁷. Tumbuhan memiliki kandungan senyawa aktif yang merupakan hasil biosintesis metabolit sekunder yang juga bermanfaat sebagai kandidat antibakteri.⁸ Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri adalah tumbuhan Parang romang (*Boehmeria virgata* (G. Forst) Guill).

Parang romang merupakan semak yang dinaturalisasi dan dibudidayakan hingga setinggi 5 meter, dan biasanya ditemukan di hutan sekunder pada ketinggian antara 50 sampai 1200 m⁹. Parang romang merupakan tanaman yang secara empiris digunakan oleh masyarakat Sulawesi Selatan sebagai pengobatan antikanker¹⁰. Daun Parang romang juga terkenal memiliki banyak manfaat sebagai obat seperti obat patah tulang, obat bisul, jika dikombinasikan dengan daun pakis dapat digunakan untuk pengobatan disentri tahap awal, dan jika dikombinasikan dengan minyak dapat digunakan untuk minyak pijat, serta hasil perasan dari daunnya dapat digunakan untuk pengobatan diare⁹.

Akar parang romang mengandung saponin, terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan fenolik¹¹. Daun Parang romang memiliki aktivitas antikanker, hipoglikemik, dan antibakteri terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*¹²⁻¹⁴. Fraksi ekstrak metanol larut n-heksan daun Parang romang menunjukkan aktivitas terhadap bakteri uji *Eshcerichia coli*, *Vibrio cholera* dan *Salmonella thyposa*. Sedangkan fraksi ekstrak methanol tidak larut n-heksan memperlihatkan aktivitas terhadap bakteri *Vibrio cholera* dan *Staphylococcus aureus*. Ekstrak daun parang romang tidak memperlihatkan efek toksik berupa perubahan pada kulit dan bulu, kejang, tremor, koma dan tidak menyebabkan kematian terhadap hewan coba¹⁵. Sehingga

secara *in vivo* daun parang romang aman digunakan sebagai bahan baku obat.

Selain kandungan dari tanaman Parang romang, fungi endofit juga menjadi salah satu perhatian pada penelitian ini. Fungi endofit adalah fungi yang hidup didalam jaringan tumbuhan sehat dan tidak menunjukkan gejala penyakit¹⁶. Fungi endofit menghasilkan senyawa bioaktif berupa senyawa antioksidan, antikanker, antivirus, antifungi dan sebagainya. Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar untuk mendapatkan hasil isolasi produksi metabolit sekunder dari tumbuhan inangnya¹⁷.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai potensi aktivitas antibakteri fungi endofit daun Parang romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill) terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf (Smic® model YX-280 B), batang pengaduk, cawan petri (Normax), corong, gelas Erlenmeyer (Iwaki Pyrex), gelas kimia (Iwaki Pyrex), gelas ukur, inkubator (Memmert®), jarum preparate, Laminar Air Flow (LAF), lampu spiritus, lumping dan alu, oven (Memmert®), spektrofotometer, spoit, tabung reaksi,

timbangan analitik (Chyco®), dan wadah tahan panas (Klir).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest, daun Parang romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill), bakteri uji (*Escherichia coli* (ATCC 25923), *Salmonella typhi* (NCTC 789), *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholera*), etanol 70%, medium Nutrien Agar (NA), medium Potato Dextrosa Agar (PDA), medium Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC), dan NaCl 0,9%,

Pengambilan sampel

Sampel Penelitian yang digunakan adalah daun parang romang yang diperoleh di daerah Tinggimoncong Kab. Gowa, Provinsi Sulawesi Selatan.

Sterilisasi permukaan sampel

Sterilisasi permukaan dilakukan dengan mengikuti metode Rori *et al* (2020) yang telah dimodifikasi. Daun Parang romang dicuci bersih dengan air mengalir dan disterilisasi dengan merendam sampel secara berturut-turut menggunakan alcohol 70% selama 2 menit, aquadest steril selama 2 menit, alcohol 70% selama 1 menit, dan aquadest steril selama 3 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya dikeringkan dengan tisu steril dalam wadah steril¹⁸.

Isolasi fungi endofit

Isolasi fungi endofit dilakukan dengan 2 metode. Metode pertama, daun yang telah disterilisasi permukaan kemudian dipotong dengan ukuran ±1x1 cm. Masing-masing potongan sampel diletakkan

pada medium YGC yang setengah memadat dengan posisi daun menempel pada medium, dalam 1 cawan petri berisi 5 potongan sampel. Metode kedua, daun yang telah disterilisasi dimasukkan kedalam plastik steril kemudian digerus dan diencerkan dengan aquadest steril hingga pengenceran 10^{-3} . Masing-masing dari pengenceran selanjutnya diambil 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri yang kemudian dituangkan medium YGC sebanyak 9 ml lalu dihomogenkan. Tiap-tiap cawan petri diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 25°C¹⁹.

Pemurnian fungi endofit

Fungi endofit hasil isolasi murnikan ke medium PDA menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang. Jika pemurnian yang tumbuh masih terkontaminasi dengan mikroorganisme lain maka harus dilakukan pemurnian ulang²⁰.

Pemeriksaan makroskopik

Isolat jamur endofit murni diamati secara makroskopis dengan pengamatan morfologi koloni, dapat dilihat dari warna permukaan koloni, selain itu dilihat ada tidaknya garis-garis radial dari pusat koloni dan juga ada tidaknya lingkaran -lingkaran konsentris²¹.

Uji antagonis

Isolat murni fungi endofit yang didapatkan kemudian dilakukan uji antagonis dengan bakteri uji pada media NA. Isolat fungi dipotong kecil ± 6 mm lalu dikontakkan langsung dengan bakteri uji

pada media, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Ukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong²².

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan mengisolasi daun Parang romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill) dengan metode yang digunakan yaitu menanam daun Parang romang yang telah disterilisasi permukaan. Hal ini berutujuan untuk menghilangkan mikroba yang berada di permukaan daun Parang romang agar yang tumbuh adalah fungi yang berasal dari jaringan daun Parang romang. Adapun medium yang digunakan untuk mengisolasi fungi endofit adalah medium YGC. Penambahan kloramfenikol pada medium bertujuan untuk menekan pertumbuhan bakteri yang berkemungkinan ikut tumbuh saat isolasi¹⁹.

Hasil isolasi fungi endofit pada daun Parang romang yang telah diinkubasi selama 7 hari, diperoleh 10 koloni fungi yang dilanjutkan ke tahap pemurnian isolasi dengan menginokulasikan isolat pada medium PDA. Pemurnian isolat fungi ini bertujuan untuk memisahkan hasil inokulasi yang terdiri dari banyak koloni yang berlainan jenis sehingga didapatkan koloni murni dari isolat daun Parang romang. Pada setiap biakan koloni yang diambil untuk dimurnikan yaitu koloni yang dominan. Dengan kata lain pemurnian ini dilakukan untuk memperoleh ini dilakukan untuk

memporoleh isolat tunggal pada tiap isolat yang berbeda²³.

Hasil pemurnian dilanjutkan ke tahap karakterisasi dengan melakukan pengamatan ciri-ciri makroskopik. Pemeriksaan makroskopik bertujuan untuk

mengetahui bentuk koloni, tepi, elevasi, warna permukaan dan sebalik koloni, serta ada atau tidaknya garis radial dan lingkaran konsentris dari koloni. Hasil uji makroskopik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan makroskopik isolat fungi endofit pada daun Parang romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill)

Kode sampel	Bentuk koloni	Bentuk Tepi	Bentuk elevasi	Warna permukaan koloni	Warna sebalik koloni	Gambar
IFBV 1	<i>Fillform</i>	<i>Wolly</i>	<i>Hilly</i>	Putih kehijauan	Putih kehijauan	
IFBV 2	<i>Round with raised margin</i>	<i>Cilliate</i>	<i>Raised</i>	Hijau	Putih hijau	
IFBV 3	<i>Round</i>	<i>Hair-lock like</i>	<i>Convex</i>	Putih hitam	Putih hitam kekuningan	
IFBV 4	<i>Concentric</i>	<i>Ciliate</i>	<i>Hilly</i>	Putih coklat	Kuning kecoklatan	
IFBV 5	<i>Irreguler and spreading</i>	<i>Lowbate</i>	<i>Flat</i>	Putih kekuningan	Kuning pucat	
IFBV 6	<i>Concentric</i>	<i>Wolly</i>	<i>Raised</i>	Abu-abu	Hitam putih	
IFBV 7	<i>Concentric</i>	<i>Ciliate</i>	<i>Raised</i>	Hitam putih	Putih kekuningan	
IFBV 8	<i>Fillamentous</i>	<i>Branching</i>	<i>Flat</i>	Putih	Putih kekuningan	

IFBV 9	<i>Irregular and spreading</i>	<i>Branching</i>	<i>Flat</i>	Putih	Putih kekuningan	
IFBV 10	<i>Filiform</i>	<i>Ciliate</i>	<i>Flat</i>	Hijau putih	Coklat kemerahan	

Keterangan:

+ = Ada

- = Tidak ada

Berdasarkan uji makroskopik didapatkan hasil yaitu isolat fungi endofit dari daun Parang romang paling banyak memiliki bentuk concentric, bentuk tepi ciliate, bentuk elevasi flat, warna koloni putih, mayoritas tidak memiliki garis radial dan lingkaran konsentris. Setelah melakukan karakterisasi dilakukan pengujian antagonis untuk memperoleh isolat yang memiliki potensi sebagai antibiotika. Pengujian antagonis isolat fungi daun parang romang dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar, terhadap 4 bakteri uji yaitu *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*. Metode ini digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri dengan mengamati zona bening yang terdapat disekitar isolat yang mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan bakteri oleh antibakteri pada permukaan media agar. Hasil pengujian antagonis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Hasil pengujian antagonis isolat fungi endofit daun Parang romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill)

Bakteri uji	Diameter Zona Hambatan (mm)			
	EC	ST	SD	VC
IFBV 1	0	0	0	0
IFBV 2	0	0	0	0
IFBV 3	0	0	0	0
IFBV 4	0	0	0	12.58
IFBV 5	0	0	0	13.64
IFBV 6	11.53	14.47	22.28	16.91
IFBV 7	10.49	8.66	13.76	11.94
IFBV 8	0	0	0	0
IFBV 9	0	0	0	23.77
IFBV 10	14.85	15.51	15.33	15.16

Keterangan :

EC = *Escherichia coli***ST** = *Salmonella typhi***SD** = *Shigella dysenteriae***VC** = *Vibrio cholerae*

Dari hasil uji antagonis didapatkan 3 isolat dengan daya hambat yang mampu menghambat 4 bakteri uji dengan hambatan yang tinggi yaitu isolat IFBV 6, IFBV 7, dan IFBV 10 berdasarkan pengelompokan kekuatan antibakteri oleh Morales et al

(2003), aktivitas zona hambat antimikroba dikelompokkan menjadi empat kategori, yaitu: aktivitas lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), sangat kuat (>20 mm)²⁴.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian potensi aktivitas antibakteri fungi endofit daun Parang romang (*Boehmeria virgata* (G.Forst) Guill) maka dapat disimpulkan bahwa fungi endofit daun Parang romang memiliki potensi aktivitas antibakteri terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan. Isolat IFBV 6 memiliki aktivitas yang kuat dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Vibrio cholerae*. Dan aktivitas sangat kuat dalam menghambat *Shigella dysenteriae*. Isolat IFBV 7 memiliki aktivitas yang kuat dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *Vibrio cholerae*. Serta aktivitas sedang dalam menghambat bakteri *Salmonella typhi*. Isolat 10 memiliki aktivitas yang kuat dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*.

Hasil penelitian sejalan dengan pernyataan bahwa fungi endofit mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya¹⁷ Penelitian Arsyid Ibrahim (2011) yang menunjukkan bahwa adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak fraksi tidak larut n-heksan daun *Boehmeria virgata* terhadap

bakteri *Vibrio cholerae* namun tidak mampu menghambat *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Serta ekstrak fraksi larut n-heksan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Sedangkan pada penelitian ini terdapat 3 isolat dari daun parang romang yang memiliki aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Astuti AT et al. *Penyakit Infeksi Dalam Kehamilan Dan Nifas*. Padang: Get Press. 2023
2. Ulfah Cahyameta Siswoyo, Sri Peni Fitrianingsih, Siti Hazar. Studi Literatur Potensi Antibakteri Tanaman Sawo (Manilkara Zapota (L.) P. Royen) Terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan. *Bandung Conf Ser Pharm.*; 2(2). DOI: 10.29313/bcsp.v2i2.4111
3. Darmadi. *Infeksi Nosokomial: Problematika Dan Pengendaliannya*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika. 2008
4. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. *Profil Kesehatan Indonesia 2021*. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2022
5. Hauser AR. *Antibiotic Basics For Clinicians: The ABCs of Choosing The Right Antibacterial Agent*. 2nd ed. Philladephia: Lippincot Williams & Wilkins. 2013
6. Perdana AT et al. *Penyakit Infeksi*. Padang: Global Eksekutif Teknologi. 2023
7. Suprayitno E et al. *Biokimia Produk*

- Prikanan. Malang: UB Press. 2021
8. Tarigan IL, Latief M. *Antibakteri: Potensi Tanaman Jambi.* Tasikmalaya: Edupublisher. 2021
 9. Cambie R., Ash J. *Fijian Medicinal Plants.* Australia: CSIRO Publishing. 1994
 10. Muslimin L et al. Anti-Proliferation Activity of Nanoencapsulated Bioadhesive Vaginal Gel of Isolated Active Compound (BVI03) From *Boehmeria Virgata* (Forst) Guill Leaves Against Human Cancer Cervix Hela Cells. *Int J Pharma Sci Res.* 2015; 6(5):836–839
 11. Rusdi M. Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Akar Parang Romang (*Boehmeria Virgata* (Forst) Guill) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach. *FARBAL.* 2014
 12. Manggau M et al. In Vitro Study of the Alkaloid Anticancer Compound From Makassar Medicinal Plants *Boehmeria virgata* Linn. *Int J Pharmaceutical Sci Rev Res.* 2018; 49(1):77–81
 13. Rusdi M, Hasrina, Noer SF, Bariun H. Uji Efek Hipoglikemik Ekstrak Etanol Akar Parang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) Terhadap Mencit Jantan. *FARBAL.* 2016; 4(1):33–36
 14. Rusdi M, Ikhlas M, Kartikasari NP. Antituberculosis Activity of Parang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst.) Guill) Stem Extract. *ad-Dawaa' J Pharm Sci.*; 4(1). DOI: 10.24252/djps.v4i1.21359
 15. Lukman M, Christin V. Analisis Profil Bobot Badan Tikus Dan Gejala Toksis Pada Pemberian Ekstrak Etanol Daun Parang Romang (*Boehmeria virgata*) Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *J Farm Galen (Galenika J Pharmacy).* 2020; 6(1):1–6
 16. Faulina Putri M, Fifendy M, Hilda Putri D. Diversitas Bakteri Endofit Pada Daun Muda Dan Tua Tumbuhan Andaleh (*Morus macroura* Miq.). *EKSAKTA.* 2018; 19(1):126–130
 17. Rollando. *Senyawa Antibakteri Dari Fungi Endofit.* Malang. 2019
 18. Rori CA, Kandou F.E F, Tangapo AM. Aktivitas Enzim Ekstraseluler Dari Bakteri Endofit Tumbuhan Mangrove *Avicennia marina*. *J Bios Logos.* 2020; 10(2):48–55
 19. Cahaya N, Ibrahim A, Ramadhan AM, Rusli. Isolasi Jamur Endofit Daun Jahe Merah (*Zingiber officinale*). *Pros Semin Nas Kefarmasian.* 2016; 4:227–231
 20. Tylova VN, Bahri S, Juanda BR, Kusdiana APJ. Eksplorasi Bakteri Endofit Terhadap Cendawan Pestalotiopsis Microspora Penyebab Penyakit Gugur Daun Pada Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *J Ilmu-Ilmu Pertan Indones.* 2023; 25(1):51–58
 21. Shofiana RH, Sulistyowati L, Muhibuddin A. Eksplorasi Jamur Endofit Dan Khamir Pada Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Serta Uji Potensi Antagonismenya Terhadap Jamur Akar Putih (*Rigidoporus microporus*). *Hpt.* 2015; 3(1):75–83
 22. Rosyadi A, Triatmoko B, Nugraha AS. Isolation of Estuary Soil Fungi and Screening Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus*. *Indones J Pharm Sci Technol.* 2022; 9(1):17–25
 23. Rofika E, Fitriana F, Herwin H. Identification Of Endophytic Fungi Compound On White Weed Leaves (*Ageratum conyzoides* L.) Containing The Potential To Produce Antibiotics By TLC-Bioautography. *J Microbiol Sci.* 2023; 3(1):13–23
 24. Datta FU et al. Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Cairan Rumen Terhadap Pertumbuhan *Salmonella*

enteritidis, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*
Menggunakan Metode Difusi Sumur Agar. *e-Journal Undana*. 2019; 66–85