

Potensi Senyawa Bioaktif Ekstrak Kasar Bakteri Simbion Spons sebagai Anthelmintika : Sebuah Uji Pendahuluan

Muhammad Reza Faisal¹⁾, Mujizat Kawaroe¹⁾, Fadjar Satria²⁾

¹⁾Pascasarjana Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan–Institut Pertanian Bogor

²⁾Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet' Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jalan Agathis Dramaga, Bogor
E-mail : mreza faisal@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to observe the bacterial symbionts of sponge and determine chemical compounds profile in the crude extract of bacterial isolates then to determine the lethal toxicity values (LC₅₀-24 hours) as a preliminary anthelmintic test. The method consisted of the identification of gram staining, organic solvent extraction, phytochemical screening and toxicity assay by the *Artemia salina* LC50-24 hours. The concentration used consisted of 10 µg / ml; 100 µg / ml; 250 µg / ml; 500 µg / ml. Results showed isolate SC12 (2) C and S1-2 (1) belonging to the gram-positive where the bioactive compounds *i.e.* flavonoids and triterpenoids obtained from the crude extract were predominant. The minimum concentrations from toxicity tests were 35.11 µg/ml for isolate SC12(2)C and 41.2 µg/ml for S1-2 (1). The crude extract of both isolates showed potential as a anthelmintic compound with concentration LC50-24 hours <1000 mg/ml.

Keywords : Bacterial symbionts sponge, S12(2) C, S1-2 (1), Phytochemicals, toxicity, Anthelmintic.

PENDAHULUAN

Eksplorasi pemanfaatan sumberdaya laut beberapa dekade ini semakin berkembang signifikan (Taylor et al., 2007). Tahapan perkembangan yang telah dilakukan yaitu mensintesis senyawa bioaktif yang dimiliki dari sifat biologis dan ekologisnya dan dimanfaatkan dalam bidang farmakologi (Faulkner 1998). Hal ini memberikan manfaat sebagai solusi terhadap dampak negatif yang dihasilkan ketika mengkonsumsi obat sintesis komersial. Dampak yang ditimbulkan antara lain resistensi penyakit dan penurunan efektifitas yang timbul akibat pemakaian dosis yang kurang tepat dalam mengantisipasi obat (Albonico et al., 2004; Haryuningtyas et al., 2001). Salah satu dampak yang terjadi yaitu infeksi dan resistensi *Haemonchus contortus* pada hewan ruminansia kecil di Indonesia (Haryuningtyas et al., 2001). *H. contortus* dapat menyebabkan Hamonchosis dengan menyerap darah dan menyebabkan penurunan bobot badan, diare hingga kematian ternak. Kerugian ekonomi akibat infeksi nematoda termasuk *H. contortus* pada kambing sangat signifikan serta diperkirakan terus meningkat bila tidak dikendalikan dengan baik. Salah satu eksplorasi senyawa alternatif bioaktif sumberdaya laut yang sudah dilakukan berasal dari spons.

Spons adalah hewan yang termasuk Filum Porifera. Filum Porifera terdiri dari tiga kelas, yaitu: Calcarea, Demospongiae, dan Hexactinellida (Romihmohtarto dan Juwana 1999). Indonesia memiliki keanekaragaman spons yang kaya dan sebagian besar didominasi Kelas Demospongiae (Rachmaniar 1994). Penelitian terhadap senyawa bioaktif spons menjadi suatu perhatian dan sudah dilaporkan sebanyak 200 senyawa metabolit baru pada tiap tahunnya (Taylor et al., 2007). Senyawa flavonoid, saponin dan alkaloid telah teridentifikasi dalam ekstrak spons (Chairman et al., 2012). Telah dilakukan penelitian mengenai kandungan bioaktif spons yang memiliki potensi sebagai anthelmintika (McDougal et al., 1986; Rungprom et al., 2004; Capon et al., 2005). Adanya pembuktian potensi senyawa bioaktif maka dapat dijadikan sebagai senyawa alternatif yang alami. Total dari keseluruhan penemuan senyawa bioaktif yang dimiliki oleh spons hanya beberapa yang telah dikomersialkan. Hal ini dikarenakan konsentrasi bioaktif spons umumnya rendah (Unson et al., 1994) dengan kandungan bioaktif spons (invertebrata) relatif sangat kecil sekitar 10-6 %/bobot basah (Rachmat 2008). Dengan demikian kebutuhan biomassa dalam jumlah besar harus dilakukan dan menjadi kendala dikarenakan ketersediaan biomassa spons yang terbatas di alam (Proksch et al., 2002).

Spons memiliki interaksi ekologi dengan mikroorganisme seperti bakteri (Ribes et al., 2003). Beberapa penelitian menjelaskan bahwa mikroorganisme simbiosis spons diketahui memiliki kemampuan yang hampir sama dengan inangnya (Burgess et al., 2003). Senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya sangat penting diketahui dengan skrining fitokimia untuk identifikasi golongan senyawa yang ada. Uji toksisitas *Brine Shrimp Test* (BST) menggunakan *Artemia salina* merupakan metoda yang dilakukan dalam mencari senyawa alami suatu biota (Meyer et al., 1982). Hal ini dilakukan untuk mengetahui adanya efek toksik serta sebagai uji pendahuluan menentukan batas minimal dalam penggunaan suatu senyawa (Meyer et al., 1982; Putri et al., 2012). Pemanfaatan bakteri simbiosis diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi senyawa bioaktif bakteri simbiosis spons dalam menghasilkan senyawa alternatif yang alami. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi bakteri simbiosis spons dan mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak kasar isolat bakteri kemudian menentukan nilai toksisitas lethal (LC_{50} -24 jam) sebagai uji pendahuluan dalam penggunaan senyawa antelmintika.

MATERI DAN METODE

Isolat bakteri simbiosis spons yaitu S12 (2) C dan S1-2(1) diperoleh dari stok bakteri murni koleksi Laboratorium Mikrobiologi Laut Departemen ITK, FPIK Institut Pertanian Bogor.

1. Identifikasi pewarnaan gram bakteri

Peremajaan isolat dilakukan dengan menggunakan media padat Zobell 2216E ($\frac{1}{2}$ strength) yang terdiri dari peptone 2,5 g; yeast 0,5g. Bakteri selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan. Identifikasi gram bakteri dilakukan dengan menggunakan metode uji pewarnaan gram (Fardiaz, 1989). Sebanyak 2 oles bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose kemudian diletakkan ke gelas objek steril beberapa menit dan dilakukan fiksasi pada udara terbuka. Zat warna kristal violet diteteskan pada gelas objek dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air akuades. Sisa air yang tertinggal pada gelas objek ditiriskan dan diberikan lugol serta dibiarkan selama 1 menit. Gelas objek dibilas kembali kemudian hilangkan warna yang tersisa dengan menggunakan alkohol 96% yang mengalir dan dibilas dengan akuades. Pewarnaan safranin dilakukan pada

gelas dan dibiarkan selama 30 detik. Selanjutnya objek gelas dibilas dengan air dan dikeringkan dengan kertas serap (*tissue*). Preparat ini diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif yang telah diberikan minyak immersi. Bakteri Gram positif akan menampilkan warna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan ditandai dengan warna merah atau merah muda. Pengamatan makroskopis morfologi koloni pun dilakukan meliputi bentuk, tepian, warna dan elevasi.

2. Ekstraksi isolat bakteri

Isolat bakteri simbiosis dibiakkan pada 100 ml media cair Zobell 2216E kemudian inkubasi selama 24 jam dengan kecepatan 100 rpm dan suhu 30°C (Lippert, 2003). Sebanyak 10 ml isolat yang telah diinkubasi dipindahkan pada media cair 1,5 L kemudian inkubasi selama 48 jam dengan kecepatan 100 rpm dan suhu 30°C untuk mendapatkan fase stasioner. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi pelarut etanol (Anand et al., 2006). Isolat kemudian dipisahkan sel-sel bakteri dengan menggunakan metode sentrifugasi (40°C/7000 rpm/20 menit). Volume supernatan yang didapatkan selanjutnya diukur dengan menggunakan gelas ukur kemudian dicampurkan etanol dengan perbandingan volume 1:1. Penggojogan dilakukan selama 30 menit sehingga menghasilkan dua lapisan organik. Lapisan yang berada di atas diambil dengan menggunakan pipet kapiler dan diletakkan pada cawan ekstrak. Ekstrak yang didapatkan kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dihilangkan dari fase air menggunakan *freeze dryer*.

3. Skrining fitokimia ekstrak kasar isolat

Skrining fitokimia dari ekstrak kasar senyawa bioaktif dari isolat bakteri dilakukan secara kualitatif. Skrining fitokimia dilakukan meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, tanin, antrakuinon dan steroid/triterpenoid (Harbone, 1987).

a. Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak kasar isolat bakteri dicampurkan dengan asam klorida 2N dan 9 ml akuades. Larutan kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit kemudian didiamkan hingga dingin dan disaring. Hasil saring diuji dengan beberapa indikator antara lain

larutan pereaksi Meyer, larutan Bouchardat dan Dragendorff

b. Pemeriksaan Flavonoid.

Sebanyak 0,5 g ekstrak kasar isolat bakteri dicampurkan dengan 10 ml air panas dan dipanaskan selama 10 menit dan langsung disaring. Hasil penyaringan ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol kemudian dikocok sehingga membentuk dua larutan terpisah. Flavonoid positif akan terjadi apabila jika warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

c. Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak isolat bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampurkan 10 ml air panas. Larutan didinginkan dan ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N kemudian dikocok selama 10 detik. Kandungan saponin akan terlihat apabila busa yang dihasilkan stabil selama beberapa detik.

d. Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak isolat bakteri dicampurkan dengan 10 ml akuades dan disaring. Larutan diencerkan hingga tidak berwarna kemudian diambil 2 ml dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna hijau, biru atau kehitaman akan mengindikasikan adanya tanin.

e. Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 1 g ekstrak isolat bakteri dicampurkan dengan 20 ml eter selama 2 jam dan disaring. Larutan saring diuapkan dengan penganas air dan sisanya ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Burchard). Apabila terbentuk warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru hijau menunjukkan adanya steroid/triterpenoid.

f. Antrakuinon

Larutan ekstrak sebanyak 2 ml dipanaskan dengan 5 ml H₂SO₄ selama 1 menit. Setelah dingin dikocok dengan 10 ml bensen. Warna kuning pada lapisan bensen menunjukkan adanya senyawa antrakuinon. Identifikasi dapat diperjelas dengan menambahkan larutan natrium hidroksida 2N, akan terjadi warna merah pada lapisan air.

4. Uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* L.

Uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* L. dilakukan dengan metode Meyer et al. (1982) yang dimodifikasi sebagai uji pendahuluan terhadap uji anthelmintik. Media untuk larva dibuat dengan menyaring air laut secukupnya. Air laut dimasukkan dalam wadah sebanyak 500 ml kemudian dilanjutkan dengan memasukkan telur *Artemia salina* L. secukupnya. Telur akan menetas menjadi larva pada umur 24 jam dan siap uji pada umur 48 jam. Larutan ekstrak bakteri dengan konsentrasi yang berbeda (10 µg/ml; 100 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml) dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi dimasukkan sebanyak 20 ekor larva uji kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya 5 ml. Konsentrasi 0 µg/ml dibuat sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak. Masing-masing tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil yang berlubang kecil-kecil. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan terhadap kematian larva. Jumlah larva yang mati dicatat, kemudian dilakukan analisis data untuk mencari konsentrasi yang jumlah kematiannya setengah dari populasi larva (LC₅₀). Nilai LC₅₀ dianalisis dengan menggunakan analisis Probit (Finney 1948).

5. Analisis hasil

Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan persentase kematian.

$$\% \text{ larva} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Dengan mengetahui kematian larva *Artemia salina* kemudian dicari angka probit melalui tabel (Finney 1948) dan dibuat persamaan garis $Y = Bx + A$, dimana Y adalah log konsentrasi dan X adalah angka probit. Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC₅₀ dengan memasukkan nilai probit (50% kematian).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Bakteri

Hasil uji pewarnaan gram bakteri menghasilkan isolat S 12(2) C dan S1-2(1) termasuk ke dalam gram positif. Hal ini dilihat warna dari larutan kristal violet isolat bakteri yang tidak hilang ketika dibilas alkohol dan safranin (Fardiaz 1989).

Tabel 1. Morfologi Koloni, Pewarnaan Gram dan Uji Motilitas Isolat Bakteri Symbion

No	Ciri-ciri Koloni	S12(2) C	S1-2(1)
1	Diameter	2 mm	2 mm
2	Warna	Putih gelap	Putih Susu
3	Tepian	Licin	Licin
4	Bentuk	Bundar	Bundar
5	Konsistensi	Sedikit Cair	Padat
6	Elevasi	Timbul	Timbul

Tabel 2. Skrining fitokimia ekstrak isolat bakteri S 12 (2) C dan S 1-2 (1)

No	Golongan Senyawa	S 12 (2) C	S 1-2 (1)
1	Alkaloid	-	-
2	Flavonoid	+	-
3	Saponin	-	-
4	Tanin	-	-
5	Steroid/Triterpenoid	+	+

Gram positif memiliki dinding sel yang tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan dimana mampu mengikat zat warna dan tidak rusak saat dicuci dengan alkohol. Kemudian pengamatan morfologi koloni secara makroskopis dilakukan dimana dapat dilihat pada tabel 1.

Skrining fitokimia ekstrak kasar isolat

Hasil skrining fitokimia ekstrak kasar S12(2)C dan S1-2(1) dapat dilihat pada **Tabel 2**. Hasil skrining memperlihatkan golongan senyawa triterpenoid dimiliki oleh setiap isolat. Golongan senyawa flavonoid hanya dimiliki oleh isolat S 12 (2) C.

Ada dan tidaknya komposisi golongan senyawa yang dihasilkan dalam masing-masing ekstrak mengindikasikan perbedaan aktivitas biologis yang dimiliki dari setiap isolat. Kehadiran golongan senyawa flavonoid dalam lingkungan sel, menyebabkan gugus OH⁻ pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan terbungunya transpor aktif Na⁺-K⁺. Transpor aktif yang berhenti mengakibatkan transfer ion Na⁺ yang tidak terkendali masuk ke dalam sel sehingga dapat

menyebabkan membran sel yang pecah (Scheuer, 1994). Membran sel yang pecah akan menyebabkan kematian sel. Selain itu golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil sehingga dapat terbentuk ikatan hidrogen. Senyawa triterpenoid berstruktur siklik yang berupa alkohol, aldehid atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Senyawa triterpenoid memiliki gugus -OH menyebabkan sifatnya menjadi polar, sehingga dapat terekstrak dalam pelarut etanol (polar). Adanya kandungan senyawa bioaktif triterpenoid pada setiap ekstrak isolat diduga sebagai hasil interaksi simbiosis dengan organisme inangnya yaitu spons (Suryati et al., 2000). Kandungan senyawa triterpenoid dan flavonoid telah teridentifikasi memiliki potensi bioaktif (Simmons, 2005; Ebada, 2010; Utami, 2014).

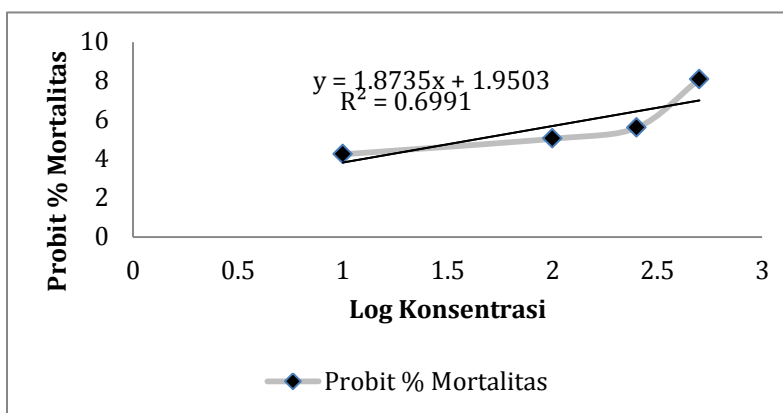
Uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* L.

Hasil pengamatan uji toksisitas ekstrak kasar isolat bakteri pada pelarut etanol memiliki variasi kematian larva artemia yang berbeda dalam masing-masing konsentrasinya dilihat pada **Tabel 3**.

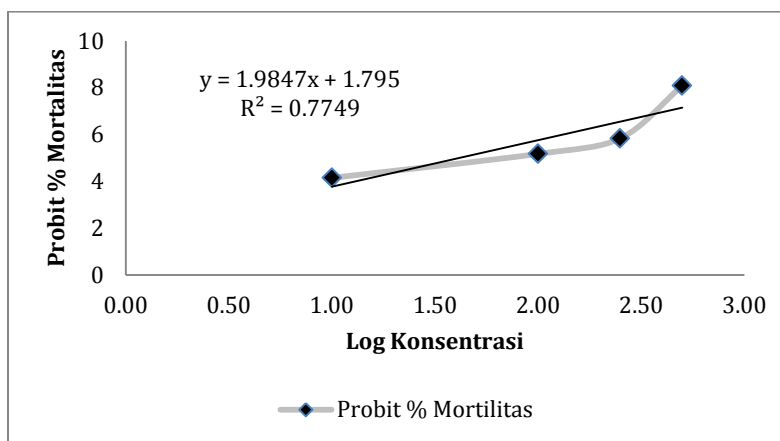
Tabel 3. Prosentase Mortalitas larva *Artemia salina* pada Uji Toksisitas Ekstrak Kasar S 12 (2) C dan S 1-2 (1)

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Mortalitas			Rata-rata	% Mortalitas
		U1	U2	U3		
Kontrol	0	0	0	0	0	0
S 12 (2) C	10	3	4	7	0,23	23,33
	100	10	12	9	0,52	51,67

S 1-2 (1)	250	17	14	12	0,72	71,67
	500	20	20	20	1	100
	10	4	3	5	0,20	20,00
	100	9	11	14	0,57	56,67
	250	16	18	13	0,78	78,33
	500	20	20	20	1	100



Gambar 2. Analisis Regresi Log Konsentrasi dengan Probit % Mortalitas Ekstrak Kasar S12(2)C



Gambar 3. Analisis Regresi Log Konsentrasi dengan Probit % Mortalitas Ekstrak Kasar S1-2(1)

Berdasarkan hasil uji toksisitas memperlihatkan bahwa nilai prosentase mortilitas yang mendekati nilai 50% kematian larva terletak pada konsentrasi 100 µg/ml. Namun hal ini perlu dilakukan analisis probit untuk dapat memperlihatkan konsentrasi yang tepat dalam menghentikan kematian 50% larva. Selain itu dengan mengetahui nilai probit dalam setiap konsentrasi maka akan diketahui grafik hubungan log konsentrasi terhadap nilai probit yang dihasilkan pada ekstrak kasar seperti pada **Gambar 2** dan **Gambar 3**.

Hasil uji toksisitas ekstrak kasar S12(2)C memperlihatkan bahwa nilai probit berbanding lurus dengan log konsentrasi uji pada grafik regresi. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin besar pula prosentase mortalitas yang terjadi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka sifat toksiknya akan semakin tinggi (Nurhayati, 2006). Hal ini dapat dilihat pada nilai prosentase tertinggi yang dimiliki oleh konsentrasi 500 µg/ml sebesar 100%. Tidak ada kematian larva yang terjadi pada perlakuan kontrol. Hasil analisa

probit ekstrak kasar S12(2)C mendapatkan nilai LC_{50} -2 jam (35,11 $\mu\text{g/ml}$) dari mortalitas larva *Artemia salina* yang terjadi. Hasil grafik regresi serupa didapatkan pada ekstrak kasar S1-2(1) yang dapat dilihat pada **Gambar 3**.

Hasil uji toksisitas ekstrak kasar S12(2)C memperlihatkan variasi peningkatan nilai probit prosentase kematian pada setiap konsentrasi yang diberikan. Nilai tertinggi didapatkan pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 100%. Grafik regresi yang dihasilkan dari ekstrak kasar S1-2(1) memiliki pola yang hampir sama dengan ekstrak kasar S12(2)C. Hal ini dapat dilihat adanya peningkatan nilai yang didapatkan bersama dengan peningkatan nilai konsentrasi yang diberikan. Hasil analisa probit ekstrak kasar S1-2(1) mendapatkan nilai LC_{50} -24 jam (41,2 $\mu\text{g/ml}$) dari mortalitas larva *Artemia salina* yang terjadi.

Hasil uji toksisitas menunjukkan perbedaan nilai LC_{50} -24 jam yang didapatkan dari kedua ekstrak kasar isolat yaitu 35,11 $\mu\text{g/ml}$ pada S12(2)C dan 41,2 $\mu\text{g/ml}$ pada S1-2(1). Hal ini memperlihatkan bahwa SC12(2)C memiliki nilai toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan S1-2(1). Konsentrasi ekstrak kedua isolat yang dihasilkan memiliki efek toksisitas dengan nilai LC_{50} dibawah 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer et al., 1982). Ekstrak kasar kedua isolat telah menunjukkan dapat memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* dimana hal ini dapat digunakan sebagai indikasi awal dari efek farmakologi yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Artemia salina* memiliki korelasi positif terhadap ekstrak yang bersifat bioaktif (Meyer et al., 1982). Senyawa alkaloid, steroid, dan flavonoid dapat bersifat toksik, yang dapat menyebabkan kematian terhadap hewan uji larva *Artemia salina* (Rita et al., 2008). Kemudian telah diketahui bahwa adanya efek toksisitas ekstrak kasar pada *A. Salina* telah mengindikasikan potensi senyawa bioaktif sebagai antikanker dan antibiotik lainnya (Utami 2014). Senyawa diterpenoid dari Spons telah diketahui berpotensi terhadap *H. contortus* (Rungprom et al., 2004). Kematian hewan uji *Artemia salina* diperkirakan adanya senyawa alkaloid dan steroid yang masuk ke dalam tubuh hewan uji melalui difusi dan transport aktif. Mekanisme kematian larva *Artemia salina* berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid, steroid, dan flavonoid dalam isolat bakteri yang dapat menghambat daya makan larva (*antifedant*). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut,

oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya, dan akibatnya larva mati kelaparan (Rita et al., 2008).

KESIMPULAN

Isolat bakteri S12(2)C dan S1-2(1) berbentuk basil dan memiliki sifat gram positif. Ekstrak kasar isolat bakteri SC12(2)C memiliki kandungan senyawa triterponoid dan flavonoid sedangkan S1-2(1) hanya memiliki kandungan senyawa triterponoid. Ekstrak kasar kedua isolat menghasilkan toksisitas mampu membunuh 50% larva *Artemia salina* dengan konsentrasi 35,11 $\mu\text{g/ml}$ pada S12(2)C dan 41,2 $\mu\text{g/ml}$ pada S1-2(1). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak kasar isolat bakteri berpotensi sebagai antibiotik seperti anthelmintika.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dr. Mujizat Kawaroe M.Si dan Dr. Fadjar Satria Ph.D sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dalam menyelesaikan penelitian ini. Penulis pun mengucapkan terima kasih kepada DIKTI melalui Dana Penelitian BOPTN dan Laboratorium Mikrobiologi Kelautan IPB yang memfasilitasi proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand, T.P., Bhat, A.W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J., Sarma S.P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research* 61, 252—26.
- Albonico, M., Engels, D., Savioli, L. 2004. Monitoring drug efficacy and early detection of drug resistance in human-soil-transmitted nematodes: a pressing public agenda for helminth control. *International Journal of Parasitology* 34, 1205-10.
- Burgess, J.G., Boyd, K.G, Amstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A., Adams, D.R. 2003. Development of a marine natural

- product-based antifouling paint. *Biofouling* 19, 197-205.
- Capon, R.J., Vuong, D., Lacey, E., Gill, J.H. 2005. (-)-Echinobetaine A: Isolation, structure elucidation, synthesis, and studies on a new nematocide from a southern australian marine sponge, *Echinodictyum* sp. *Journal of Natural Product* 68, 179-182.
- Chairman, K., Singh, A.J.A.R., Ramesh, M. 2012. Screening twelve species of sponges for biomedical activity in gulf of mannar tuticorin coast. *International Journal Of Marine Science* 2(6),43-50.
- Ebada, S.S., Lin, W.H., Proksch, P. 2010. Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: Occurrence and pharmacological significance. *Marine Drugs* 8, 313-346.
- Faulkner, D.J. 1998. Marine natural products. *Journal of Natural Product Rep.* 15, 113-158.
- Finney, D.J., Stevens, W.L. 1948. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika* 35, 191-201.
- Harbone, J.B. 1987. Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. terjemahan kosasih padmawinata dan iwang soediro. Bandung: Penerbit ITB Hal 103, 152.
- Haryuningtyas, D. 2005. Deteksi mutasi pada gen tubulin b isotipe-1 cacing *Haemonchus contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole dengan *single strand conformation polymorphism*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 10(3), 200-207.
- Holt, R.D., Grover, J., Tilman, D. 1994. The ecological consequences of shared natural enemies. *annual review of ecology and systematics* 25, 495-520.
- Lippert, H., Brinkmeyer, R., Mulhaupt, T., Iken, K. 2003. Antimicrobial activity in sub-arctic marine invertebrates. *Polar Biology*. 26, 591-600.
- McDougal, P.G., Rico, J.G., Van Derveer, D. 1986. Bengamides, heterocyclic anthelmintics from a jaspidae marine sponge. *The Journal of Organic Chemistry* 51, 4494-4497.
- Meyer, B.N., Ferigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E. 1982. Brine Shrimp : a convenient general bioassay for active plant constituent. *Journal of Medical Plant Research* 45, 31-34.
- Nurhayati, A.P.D. 2006. Uji toksisitas ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai studi pendahuluan potensi antikanker. FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya. *Akta Kimindo* 2 (1), 41- 46
- Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R., 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 125-134.
- Putri, M.K.D., Pringgenies, D., Radjasa O.K. 2012. Uji fitokimia dan toksisitas ekstrak kasar gastropoda (*Telescopium telescopium*) terhadap larva *Artemia salina*. *Journal of Marine Research*. 1(2), 587-66.
- Rachmaniar, R. 1994. Penelitian produk alam laut skreening substansi bioaktif. laporan penelitian tahun anggaran 1993/1994. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Puslitbang Oseanologi.
- Rachmat, R. 2008. Penelitian pengembangan obat dari produk alami laut. orasi pengukuhan profesor riset bidang produk alami laut. LIPI. hlm 16- 24.
- Ribes, M, Coma, R., Atkinson, M.J., Kinzie, R.A. 2003. Particle removal by coral reef communities: picoplankton is a major source of nitrogen. *Marine Ecology Progress Series* 212, 3643-3650.
- Rita, W.S., Suirta, I.W., Sabikin, A. 2008. Isolasi dan identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antitumor pada daging buah pare (*Momordica charantia* L.). Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. *Jurnal Kimia* 2, 1907-985.
- Romihmohtarto, K, Juwana, S. 1999. Biologi Laut. Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi LIPI. hlm 115 -128
- Rungprom, W., Chavasiri, W., Kokpol, U., Kotze, A. Garson, M.J. 2004. Bioactive chromodorolide diterpenes from an

- Aplysillid* Sponge. Marine Drugs 2, 101-107.
- Scheuer, J. S. 1994. Produk Alami Lautan. Cetakan pertama. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Setzer, W.N. 2008. Non-intercalative triterpenoid inhibitors of topoisomerase II: a molecular docking study. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 1, 13-17.
- Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flat, P., Gerwick, W.H. 2005. Marine natural product as anticancer drugs, Molecular Cancer Therapeutics 4, 333-342.
- Suryati, E, Parenrengi, A., dan Rosmiati. 2000. Penapisan serta analisis kandungan bioaktif sponge *Clathria* sp. yang efektif sebagai antibiofouling pada teritif (*Balanus amphitrit*). Marina Chimica Acta 1, 16-11.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. Microbiology and Molecular Biology Rev 71, 295-347.
- Unson, M.D., Holland, N.D., Faulkner, D.J. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. Marine Biology 119, 1-11.
- Utami, A.W.A., Wahyudi, A.T., Batubara, I. 2014. Toxicity, Anticancer and antioxidant activity of extracts from marine bacteria associated with sponge *Jaspis* sp. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences 5(4), 917-923.