

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK METANOL BAKTERI
BERASOSIASI SPONS DARI PULAU LEMUKUTAN, KALIMANTAN BARAT**

***ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF METHANOL EXTRACT FROM
UNIDENTIFIED SPONGE ASSOCIATED BACTERIA IN LEMUKUTAN ISLAND,
KALIMANTAN BARAT***

Risa Nofiani¹, Siti Nurbetty¹, dan Ajuk Sapar¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Tanjungpura, Jl. A. Yani, Pontianak
E-mail: rnofiani@yahoo.com

ABSTRACT

*The increase of issues on the antibiotics resistant pathogenic bacteria has triggered high exploration for new antimicrobial compounds. One of the potential sources is sponge-associated bacteria. The aim of this study was to get sponge-associated bacteria extract containing antimicrobial activities. On the basis screening of antimicrobial activity using by streaking on agar medium, there were two potential isolates with antimicrobial activities namely LCS1 and LCS2. The two isolates were cultivated, then secondary metabolite product were extracted using methanol as a solvent. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of extract LCS 1 were 1,000 µg/well for *S. aureus*, 950 µg/well for *Salmonella* sp. and 800 µg/well for *Bacillus subtilis*. Minimum inhibitory concentrations of extract LCS 2 were 500 µg/well for *S. aureus*, 1,050 µg/well for *Salmonella* sp., 750 µg/well for *Bacillus subtilis*, 350 µg/well for *P. aeruginosa*, 750 µg/sumur terhadap *B. subtilis*. Based on the MIC values, the two assay extracts have a relatively low antimicrobial activity.*

Keywords : *Antimicrobial, Sponges associated bacteria, MICs*

ABSTRAK

Peningkatan jumlah kasus resistansi bakteri patogen terhadap antibiotik akhir-akhir ini memicu peningkatan pencarian sumber senyawa antimikroba yang baru. Salah satu sumber potensial penghasil senyawa antimikroba adalah bakteri yang berasosiasi dengan spons. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh ekstrak bakteri yang berasosiasi dengan spons yang memiliki aktivitas antimikroba. Berdasarkan skrining aktivitas antimikroba dengan metode goresan pada agar diperoleh 2 isolat yang berpotensi menghasilkan senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba yaitu: LCS 1 dan LCS 2. Selanjutnya kedua isolat bakteri di perbanyak dan metabolit sekunder yang dihasilkan di panen dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut metanol. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak LCS 1 terhadap *S. aureus*, *Salmonella* sp. dan *Bacillus subtilis* berturut-turut adalah 1.000 µg/sumur, 950 µg/sumur dan 800 µg/sumur. Nilai KHM ekstrak LCS 2 adalah 500 µg/sumur terhadap *S. aureus*, 1.050 µg/sumur terhadap *Salmonella* sp., 350 µg/sumur terhadap *P. aeruginosa* dan 750 µg/sumur terhadap *B. subtilis*. Berdasarkan nilai KHM tersebut, ekstrak senyawa dari bakteri LCS1 dan LCS 2 menunjukkan aktivitas antimikroba yang lemah

Kata kunci : *Antimikroba, bakteri berasosiasi spons, KHM*

I. PENDAHULUAN

Spons laut merupakan inang untuk bermacam-macam mikroba seperti bakteri. Hal ini disebabkan spons dapat melindungi mikroba dari predator dengan cara menghasilkan senyawa kimia. Senyawa kimia yang dihasilkan spons akan menginduksi mikroba yang hidup di dalam spons untuk menghasilkan metabolit sekunder spesifik. Metabolit sekunder spesifik terekspresi sebagai bentuk respon mikroba terhadap kondisi lingkungan. Metabolit sekunder spesifik memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antimikroba. Beberapa kasus jika mikroba ditumbuhkan pada kondisi berbeda metabolit sekunder spesifik tersebut tidak terekspresi, misalnya *Fusarium solani* menghasilkan warna ketika dilakukan kulturisasi sebanyak 4 kali tetapi pada kulturisasi kelima *F. solani* tidak menghasilkan warna (data tidak dipublikasikan). Hal ini diduga disebabkan karena metabolit sekunder terekspresi karena adanya inducer yang berasal dari spons. Beberapa bakteri berasosiasi spons yang menghasilkan metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba adalah bakteri berasosiasi spons *Himeniacidon parleve*, yaitu NJ6-3-1 menghasilkan senyawa beta karbolin alkaloid bersifat antimikroba terhadap *S. aureus* (Zheng *et al.*, 2005). Genus *Bacillus* dan *Virgibacillus* yang diisolasi dari spons *Pseudoceratina purpurea* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio fischeri* (Kanagasabhaphaty *et al.*, 2005). *Micrococcus* spp. berasosiasi spons *Tedania ignis* menghasilkan senyawa diketopiperazin bersifat antibakteri (Schmitz, 1994).

Studi tentang bakteri patogen resistan antibiotik telah banyak dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan

bahwa terjadi peningkatan jumlah kasus bakteri patogen resistan antibiotik. Tahun 2005 lebih 19.000 kasus kematian di Amerika dan Inggris disebabkan *Staphylococcus aureus* resistan methicillin (SARM) (Kennedy *et al.*, 2009). Kasus kematian yang disebabkan SARM meningkat tajam dari 51 kasus pada tahun 1993 sampai 1.652 tahun 2006 di Inggris. Strain *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas veronii* yang diisolasi dari air minum, pasien rumah sakit dan daging menunjukkan resisten terhadap ampisilin, amoksisilin, sefasetril, kloksasilin, linkomisin, spiramisin dan penisilin G (Orozova *et al.*, 2008). Kondisi tersebut memacu pencarian sumber antimikroba baru. Pencarian mulai diarahkan kepada mikroba yang berada di laut. Salah satu mikroba yang dapat dijadikan sumber bagi senyawa antimikroba adalah bakteri berasosiasi dengan spons. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak bakteri berasosiasi spons yang memiliki aktivitas antimikroba dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat.

II. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel spons, agar, air laut, akuades, *bacto yeast extract* (Oxoid), glukosa (Merck), kertas saring Whatman No. 41, metanol teknis, dimetil sulfooksida (DMSO), natrium klorida (NaCl) (Merck) dan pepton (Oxoid). Mikroba uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *V. harveyi* dan *V. vara*.

2.2. Pengambilan Sampel

Sampel spons diperoleh dari Perairan Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat. Sampel spons dimasukkan ke dalam kantong plastik steril yang berisi air laut. Selanjutnya sampel spons dimasukkan ke dalam kotak es untuk dibawa ke laboratorium.

2.3. Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Sebanyak 10 g sampel spons dipotong-potong kemudian dibilas dua kali dengan air laut steril sebanyak 25 mL. Potongan spons ditambah 90 mL air laut steril dan dihaluskan dengan menggunakan blender. Suspensi bakteri yang diperoleh dilakukan inokulasi ke media padat M13 dengan metode tuang. Media padat M13 terdiri dari 0,25 g pepton, 0,25 g ekstrak ragi, 0,25 g glukosa, 18 g agar dan diencerkan hingga 1 L (750 mL akuades + 250 mL air laut) (Elardo *et al.*, 2003). Masing-masing cawan petri ini diinkubasi pada suhu kamar selama 4 hari. Bakteri diisolasi berdasarkan perbedaan diameter, warna, bentuk, elevasi, dan tepian koloni yang tumbuh.

2.4. Penapisan Aktivitas Antimikroba Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Penapisan aktivitas antimikroba isolat bakteri dilakukan pada media padat M13 menggunakan metode Johnson *et al.* (1960) dengan modifikasi. Isolat bakteri digores berbentuk lingkaran dengan diameter 5-6 mm pada media padat M13 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Cawan petri tersebut di sebar dengan suspensi mikroba uji (500 µL kultur mikroba uji umur 24 jam disuspensikan dalam 50 mL larutan NaCl 0,9% steril) dengan menggunakan alat semprot.

Cawan petri diinkubasi kembali pada suhu kamar selama 24 jam dan diamati zona hambat di sekitar koloni isolat bakteri. Zona hambat (zona bening) di sekitar koloni isolat bakteri menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki aktivitas antimikroba.

2.5. Produksi Dan Ekstraksi Metabolit Bakteri

Produksi dan ekstraksi metabolit bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba dilakukan berdasarkan metode Isnansetyo and Kamei (2003). Bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba digoreskan pada media padat M13 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh pada media padat diinokulasikan ke media cair M13 (pepton 0,25 g/L, ekstrak ragi 0,25 g/L, glukosa 0,25 g/L, akuades 750 mL dan air laut 250 mL) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam sehingga diperoleh kultur starter. Sebanyak 200 µL kultur starter disebarkan pada media padat M13 kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari. Media padat selanjutnya dipotong kecil-kecil dan direndam dengan metanol selama 48 jam. Ekstrak metanol diperoleh dengan melakukan penyaringan dan sentrifugasi pada kecepatan 1.000 x g selama 15 menit. Supernatan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.

2.6. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba adalah metode difusi agar (Valgas *et al.*, 2005). Uji aktivitas antimikroba diawali dengan pembuatan sumur (diameter 5 mm) pada media NA. Selanjutnya, pada media tersebut disebarkan kultur bakteri uji. Akhirnya ekstrak bakteri dengan konsentrasi

tertentu dimasukkan ke sumur tersebut dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak bakteri terhadap jamur uji sama seperti dilakukan pada bakteri kecuali media yang digunakan adalah *potato dextrose agar* (PDA).

2.7. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan KHM ekstrak bakteri dilakukan berdasarkan metode Valgas *et al.* (2007). Pengujian dilakukan dengan metode yang sama dengan uji aktivitas antimikroba ekstrak bakteri hanya konsentrasi ekstrak yang digunakan bervariasi yaitu: 1.000 μ g, 950 μ g, 900 μ g, 850 μ g, 800 μ g, 750 μ g, dan 700 μ g.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Pengambilan Sampel Spons

Bakteri yang diisolasi pada penelitian ini adalah bakteri yang berasosiasi dengan spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat (Gambar 1). Pengambilan sampel dilakukan pada hari Sabtu tanggal 31 Mei 2008 pukul 14.00 WIB. Spons diambil pada kedalaman sekitar 6,5 meter dari permukaan air laut. Kondisi pH, kadar garam serta temperatur air laut berturut-turut adalah 7,94; 36 ‰ dan 30 °C.

Bentuk spons yang diambil dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat

memiliki ciri-ciri fisik sebagai berikut: berwarna merah dan memiliki bentuk seperti vas bunga (Gambar 1).



(a)



(b)

Gambar 1 Sampel spons: (a). Tampak atas; (b). Tampak samping

3.1. Isolasi Bakteri Berasosiasi dengan Spons

Empat dari 135 isolat bakteri hasil pengenceran 10⁻² telah berhasil diisolasi, yaitu: LCS 1, LCS 2, LCS 3 dan LCS 4 (Tabel 1). Pemilihan hasil pengenceran 10⁻² untuk isolasi bakteri disebabkan jumlah koloni representatif untuk dilakukan isolasi.

Tabel 1. Morfologi Isolat Bakteri Berasosiasi Spons

Kode Bakteri	Diameter (mm)	Warna	Bentuk	Elevasi	Tepian Koloni Yang Tumbuh
LCS 1	4	Putih susu	berbenang-benang	datar	bercabang-cabang
LCS 2	2	kuning	Bundar	cembung	licin
LCS 3	1	Putih susu	Bundar	datar	licin
LCS 4	2	Putih susu	Bundar	cembung	licin

Tabel 2. Aktivitas Antimikroba Isolat Bakteri Berasosiasi dengan Spons

Bakteri uji	LCS 1	LCS 2	LCS 3	LCS 4
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	+	+	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	-	-

3.2. Penapisan Aktivitas Antimikroba

Penapisan aktivitas antimikroba bertujuan untuk menyeleksi isolat-isolat bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri dan jamur yang bersifat patogen, seperti: *P. aeruginosa*, *S. aureus* dan *C. tropicalis*. Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar isolat bakteri. Hasil penapisan aktivitas antimikroba menunjukkan adanya 2 isolat bakteri (LCS 1 dan LCS 2) yang membentuk zona hambat terhadap *P. aeruginosa* dan *S. aureus* (Tabel 2).

Senyawa antimikroba merupakan salah satu produk metabolit sekunder. Pembentukan senyawa metabolit sekunder dikode oleh sejumlah gen yang terdapat pada DNA kromosom atau DNA plasmid. Ada beberapa kondisi yang mempengaruhi metabolit sekunder yaitu: keterbatasan nutrisi yang tersedia di lingkungan tumbuh suatu bakteri, penambahan senyawa penginduksi dan penurunan kecepatan pertumbuhan (Demain, 1998). Umumnya metabolit sekunder tidak terbentuk jika lingkungan tumbuh mengandung cukup nutrisi untuk pertumbuhan bakteri karena senyawa tersebut bukan unsur esensial bagi pertumbuhan dan reproduksi sel (Barry and Wainwright, 1997).

Aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh 2 isolat yaitu LCS 1 dan LCS 2 mengikuti pola penurunan kecepatan pertumbuhan. Ketika isolat bakteri tersebut berada pada fase pertumbuhan (fase logaritma), bakteri melakukan aktivitas pembelahan sel

dengan mengonsumsi nutrisi yang tersedia pada media tumbuh. Ketika nutrisi mulai berkurang bakteri akan memasuki fase stasioner dan pada fase ini diduga terjadi pembentukan senyawa metabolit sekunder yang bersifat antimikroba. Aktivitas antimikroba yang terbentuk setelah memasuki fase stasioner dimungkinkan mengikuti mekanisme *quorum sensing*.

Quorum sensing merupakan sistem komunikasi antar sel untuk merespon perubahan lingkungan. Komunikasi antar sel bakteri tersebut berperan penting dalam proses adaptasi terhadap kondisi lingkungan sekitar. Salah satu bentuk respon yang ditunjukkan bakteri adalah pembentukan senyawa metabolit sebagai bentuk pertahanan melawan mikroba lain dan menghindari senyawa toksik yang memiliki potensi bahaya terhadap bakteri tersebut. Salah satu contoh pemanfaatan *quorum sensing* adalah pembentukan antibiotik phenazine oleh *Pseudomonas aureofaciens* (Tinaz, 2003). Antibiotik phenazine merupakan sistem pertahanan diri bagi *Pseudomonas aureofaciens* dalam berkompetisi dengan organisme lain untuk tumbuh disekitar rizosfer gandum. Selain itu, phenazine juga dapat mencegah tumbuhnya jamur penyebab penyakit pada gandum. Bakteri tersebut mengandung protein PhzI dan PhzR dan sistem respon berupa HHL (N-hexanoyl-L-homoserine lactone) yang bertanggung jawab pada pembentukan phenazine. HHL yang terikat dengan PhzR akan mengaktifasi gen PhzI sehingga terjadi pembentukan phenazine.

3.3. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Bakteri Berasosiasi Spons

Produksi dan ekstraksi bakteri berasosiasi spons dilakukan untuk semua isolat meskipun hanya dua isolat yang menunjukkan aktivitas antimikroba pada saat penapisan. Hal ini disebabkan ada kemungkinan bakteri menghasilkan senyawa antimikroba intraseluler sehingga sel bakteri perlu dipecah untuk memperoleh senyawa antimikroba. Pemecahan sel dapat dilakukan pada saat maserasi bakteri dengan media tumbuh. Penambahan metanol pada saat maserasi akan menyebabkan pH ekstrasel menjadi asam dan berakibat pada peningkatan konsentrasi proton di dalam sel (Purwoko, 2007). Konsekuensi dari keadaan tersebut adalah sel akan menggunakan energi berupa ATP untuk memompa proton keluar sel. Jumlah ATP yang digunakan berbanding lurus dengan jumlah proton yang dipompa keluar sel. Kondisi ini menyebabkan terjadinya hambatan pertumbuhan karena sel kekurangan energi. Ketika sel tidak cukup memiliki ATP untuk memompa proton keluar sel maka terjadi akumulasi proton di dalam sel dan dapat menyebabkan lisis sel dan senyawa metabolit berdifusi ke pelarut metanol.

Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak bakteri berasosiasi spons terhadap 12 mikroba uji menunjukkan bahwa ekstrak yang aktif sama dengan hasil uji aktivitas antimikroba saat penapisan yaitu: ekstrak LCS 1 dan LCS 2 (Tabel 3). Ekstrak LCS 1 dan LCS 2 menunjukkan aktivitas antibakteri spektrum luas karena menunjukkan aktivitas terhadap bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif. Ekstrak LCS 1 memiliki daya antibakteri yang paling kuat terhadap *B*

subtilis dibandingkan dengan aktivitasnya terhadap 2 bakteri uji yang lain yaitu: *Salmonella* sp. dan *S. aureus*. Hal ini dapat dilihat bahwa ekstrak LCS 1 dapat memberikan zona hambat sebesar 4,7 mm setiap 1.000 µg/sumur.

Ada beberapa dugaan mengapa LCS 3 dan LCS 4 tidak menghasilkan senyawa antimikroba. Pertama, kedua isolat tersebut memiliki gen yang mengode pembentukan senyawa metabolit sekunder namun tidak terekspresi pada kondisi normal. Gen tersebut baru akan terekspresi ketika diinduksi terlebih dahulu. Proses induksi dapat berupa penambahan suatu senyawa prekursor ataupun penambahan sejumlah tertentu inokulum bakteri uji pada saat proses fermentasi isolat bakteri. Senyawa prekursor yang berperan sebagai induser antara lain: fenilalanin yang menginduksi produksi alkaloid benzodiazapene, penambahan etanol yang menginduksi *Streptomyces venezuela* untuk menghasilkan jadomycin B serta penambahan glisin, fenilalanin, tirosin dan arginin untuk menghasilkan vancomycin (Demain, 1998). Penambahan sel hidup *S. aureus* pada media tumbuh dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dari strain Mbbc1121. Pada proses produksi *S. aureus* dan strain Mbbc1121 melalui membran dialisis semi-permeabel sehingga senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba terekskresi ke media tumbuh (Mearn-Spragg *et al.*, 1998). Kedua, bakteri tersebut menghasilkan senyawa antimikroba namun tidak bersifat aktif terhadap bakteri uji. Ketiga, bakteri menghasilkan senyawa antimikroba secara intraseluler sehingga senyawa yang dihasilkan tidak terekskresi dan terakumulasi di media tumbuh.

Tabel 3. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Isolat Bakteri

Mikroba uji	Zona hambat pertumbuhan (mm)			
	Ekstrak LCS 1	Ekstrak LCS 2	Ekstrak LCS 3	Ekstrak LCS 4
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	4,7	11,2	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	15,3	-	-
<i>Salmonella</i> sp	1,2	1,6 *	-	-
<i>S. aureus</i>	1,3	14,7	-	-
<i>V. cholerae</i>	-	-	-	-
<i>V. harvei</i>	-	-	-	-
<i>V. vara</i>	-	-	-	-

Keterangan: * konsentrasi ekstrak LCS 2 = 1.050 µg/sumur, - = tidak aktif

Tabel 4. Nilai KHM Ekstrak Isolat Bakteri LCS 1 dan LCS 2 terhadap Bakteri Uji

Isolat bakteri	Nilai KHM ekstrak isolat terhadap bakteri uji (µg/sumur)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>
LCS 1	800	- *	950	1.000
LCS 2	750	350	1.050	500

Keterangan: * = tidak diuji

3.4. Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM)

Nilai KHM adalah konsentrasi minimum dari suatu ekstrak yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Penentuan nilai KHM hanya dilakukan terhadap ekstrak LCS 1 dan LCS 2 yang menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap 4 bakteri uji. Aktivitas antimikroba ekstrak LCS 1 terhadap *B. subtilis* merupakan nilai KHM terbaik dibandingkan dengan 3 mikroba uji yang lain, yaitu 800 µg/sumur (Tabel 4). Meskipun demikian, berdasarkan dari nilai KHM tersebut ekstrak bakteri LCS 1 menunjukkan lemahnya aktivitas antimikroba.

Aktivitas antimikroba ekstrak LCS2 terhadap *P. aeruginosa* menunjukkan nilai KHM terbaik

dibandingkan dengan nilai KHM dari 3 mikroba uji, yaitu 350 µg/sumur. Berdasarkan nilai KHM, aktivitas antimikroba ekstrak LCS 2 adalah lemah tetapi ekstrak ini menarik untuk diisolasi senyawa aktifnya karena *P. aeruginosa* merupakan mikroba yang resistan terhadap semua antibiotik yang ada dipasaran. Selain itu, ada kemungkinan kandungan senyawa antimikroba tersebut memiliki aktivitas antimikroba yang kuat tetapi produksi senyawa antimikroba oleh bakteri sangat kecil.

IV. KESIMPULAN

Ekstrak bakteri LCS 1 dan LCS 2 menunjukkan aktivitas antimikroba lemah terhadap *B. subtilis*, *Salmonella* sp., *P. aeruginosa* dan *S. aureus*. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM)

untuk ekstrak isolat LCS 1 adalah 800 µg/sumur untuk *B.subtilis*, 950 µg/sumur untuk *Salmonella* sp. dan 1.000 µg/sumur untuk *S.aureus*. Nilai KHM ekstrak isolat LCS 2 terhadap *B.subtilis*, *P.aeruginosa*, *Salmonella* sp. dan *S.aureus* berturut-turut adalah 750 µg/sumur, 350 µg/sumur, 1.050 µg/sumur dan 500 µg/sumur.

DAFTAR PUSTAKA

- Barry, K.J. and N. R. Wainwright. 1997. Biosynthetic Induction of a Secondary Metabolite by a Marine Bacterium under Nutritional Stress: Potential Role of the Incomplete Oxidation of an Organic Acid, *Biol. Bull.*, 193: 274-275.
- Demain, A.L. 1998. Induction of Microbial Secondary Metabolism, *Internationall Microbio.*, 1:259-264.
- Elardo, S.P., M. Wehrl, A.B. Friedrich, P.R. Jensen, and U. Hentschel. 2003. Isolation of Planctomycetes from *Aplysina* Sponges. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33:239-245.
- Isnansetyo, A. and Y. Kamei. 2003. MC21-A, A Bacterial Antibiotic Produced by a New Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30^T, against Metchicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agen. Chemother.*, 47:480-488.
- Johnson, L. F., E.A. Curl, J.H. Bond, and H.A. Fribourg. 1960. Methods and Studying: soil microflora-plants disease relationships, Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA.
- Kanagasabhpathy, M., H. Sasaki, K. Nakajima, K. Nagata, and S. Nagata. 2005. Inhibitory Activities of Surface Associated Bacteria Isolated from the Marine Spongs *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Environmets*, 20:178-185.
- Kennedy, J., P. Baker, C. Piper, P. D. Cotter, M. Walsh, M. J. Mooij, M. B. Bourke, M. C. Rea, M. P. O'Connor, P. Ross, C. Hill, F. O'Gara, J. R. Marchesi, and A. D. W. Dobson. 2009, Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.* 11:384-396.
- Mearns-Spragg, A., M. Bregu, K. G. Boyd, and J. G. Burgess. 1998. Cross-species Induction and Enhancement of Antimicrobial Activity Produced by Epibiotic Bacteria from Marine Algae and Invertebrates, after Exposure to Terrestrial Bacteria, *Letter. Appl. Microbiol.*, 27:142-146.
- Orozova, P., V. Chikova, R. Nenova, M. Konovska, and H. Najdenski. 2008. Antibiotic Resistance of Potentially Pathogenic *Aeromonas* Strains. *Trakia Journal of Sciences*, 6:71-77.
- Purwoko, T. 2007. Fisiologi Mikroba (1st Ed.). Bumi Aksara, Jakarta.
- Schmitz, F.J. 1994. Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. In: Van Soest, R.W.M., T.M.G. Van Kempen, J.C. Braekman (Eds.). Sponges in Time and Space. Biology Chemistry Paleontology. Proceedings of the 4th International Porifera Congress. Amsterdam, 19-23 Apr 1993, A.A Balkema, Rotterdam.
- Tinaz, G.B. 2003. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turk. J. Biol.*, 27:85-93.

- Valgas, C. S.M. Souza, E.F.A. Smania, and A. Smania. 2007. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Braz. J. Microbiol.*, 38:369-380.
- Woo, J.H., E. Kitamura, H. Myouga, and Y. Kamei. 2002. An Antifungal Protein from the Marine Bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is Specific for *Pythium porphyrae*, a Causative Agent of Red Rot Disease in *Porphyra* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2666-2675.
- Zheng, L., H. Chen, X. Han, W. Lin, and X. Yan. 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine Bacterium NJ6-3-1 Associated with the Sponge *Hymeniacidon parleve*. *J. Microbiol. Biotech.*, 21:201-206.