

ANALISIS SENYAWA ANTIBIOTIK DARI JAMUR SIMBION YANG TERDAPAT DALAM ASCIDIANS *Didemnum molle* DI SEKITAR PERAIRAN BUNAKEN-SULAWESI UTARA

Robert A. Bara^{1*}, Grace D. Kandou², Antonius R. B. Ola³, Jimmy Posangi⁴

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, UNSRAT Manado

²Fakultas Kesehatan Masyarakat, UNSRAT Manado

³Fakultas MIPA, Universitas Nusa Cendana Kupang, Nusa Tenggara Timur

⁴Fakultas Kedokteran UNSRAT Manado

(*E-mail : Robert.bara@unsrat.ac.id; robertbara@yahoo.com)

ABSTRACT

Endosymbiont can be interpreted as microbes that live in colonies in the internal tissues of other higher organisms without causing adverse effects directly on the its host. Endosymbiont organisms have a huge potential to be exploited as a new natural products that are useful in medicine, agriculture, and industry. This research is focused on the antibacterial potential. Ascidians *Didemnum moll* specimens were collected from Manado waters. The fungal isolates were purified followed by screening their antibacterial activity towards *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. In this study we isolated 3 fungal specimens *Acremonium* sp. (ADMB-1, 2 and 3). Three isolates showed potential antibacterial activity. Together with the fungal isolates, we also isolated *Bacillus galacosidilyticus* from the same host. This bacterial isolate also show antibacterial potency.

Keywords: *Acremonium* sp., antibacterial test, *Bacillus galacosidilyticus*, *Didemnum molle*, *symbiont*

ABSTRAK

Endosimbion dapat diartikan sebagai mikroba yang hidup berkoloni dalam jaringan internal mahluk hidup tanpa menyebabkan efek yang merugikan secara langsung pada organisme tersebut. Organisme simbion memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksploitasi dan menghasilkan produk alami baru yang bermanfaat di bidang kedokteran, pertanian, dan industri. Penelitian ini bertujuan untuk mencari kandidat obat-obatan baru yang difokuskan pada kandidat bahan obat yang memiliki potensi antibakterinya. Spesies ascidians *Didemnum molle* diambil dari sekitaran Teluk Manado. Isolat jamur kemudian dimurnikan kemudian dilakukan skrining aktivitas antibakterinya melawan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Dalam penelitian ini diperoleh 3 isolat jamur *Acremonium* sp. ADMB-1, 2 dan 3. Ketiga isolat menunjukkan potensi senyawa antibakteri. Terdapat juga isolat bakteri *Bacillus galacosidilyticus* yang diisolasi dari ascidian yang sama yang juga memiliki potensi antibakteri.

Kata Kunci : *Acremonium* sp., *Bacillus galacosidilyticus*, *Didemnum molle*, sp., uji antibakteri

PENDAHULUAN

Organisme endosimbionik memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksploitasi dan menghasilkan produk alami baru yang bermanfaat di bidang kedokteran, pertanian, dan industri. Diketahui setiap organisme multiseluler di alam yang tersebar di bumi kita, masing-masing individu tersebut merupakan inang dari satu atau lebih mikroba endosimbion (Strobel *et al.*,

2004). Saat ini saja, beberapa produk bioaktif baru diisolasi dan diidentifikasi, senyawa-senyawa ini bukan hanya memiliki struktur dasar yang unik dan tetapi juga aktivitas biologis kuat (Debbab *et al.*, 2009; Aly, 2010; Ibrahim *et al.*, 2010; Aly *et al.*, 2011; Aly *et al.*, 2011; Debbab *et al.*, 2011; Debbab *et al.*, 2012; Ebrahim *et al.*, 2012)

Keanekaragaman hayati di dalam suatu biosfer menggambarkan keragaman kandungan bahan kimia di dalamnya. Endosimbion yang hidup dalam tumbuhan memiliki fungsi untuk mempertahankan eksistensi dari inang untuk dapat bertahan hidup dan mempertahankan diri dari organisme patogen dan predator utama mereka. Hal ini membuat organisme endosimbion berevolusi secara konstan untuk menghasilkan senyawa-senyawa kimia baru untuk melindungi inang mereka. Daerah tropis termasuk di dalamnya ekosistem pantai dan terumbu merupakan contoh luar biasa dari jenis lingkungan ini. Dalam ekosistem di daerah ini, perlawanan endosimbion melawan patogen dan predasi cukup tinggi, sumber daya yang terbatas dan tekanan seleksi alam sangat tinggi (Strobel *et al.*, 2004). Hal ini menimbulkan kemungkinan besar bahwa endosimbion di daerah tropis seperti di negara kita merupakan sumber struktur senyawa baru dengan aktivitas biologis yang menarik (Bara *et al.*, 2013; Bara *et al.*, 2013; Bara *et al.*, 2013; Bara *et al.*, 2013; Kartika *et al.*, 2014; Liwang *et al.*, 2014; Phoanda *et al.*, 2014; Posangi *et al.*, 2014; Dwilestari *et al.*, 2015; Faraknimella *et al.*, 2015; Kasi *et al.*, 2015; Menggelea *et al.*, 2015; Santoso *et al.*, 2015).

Lingkungan laut merupakan sumber yang besar dari produk alam yang memiliki struktur yang unik yang umumnya terkonsentrasi pada sponge, tunikata, bryozoa, dan moluska yang merupakan organisme yang hidup dalam kolom air. Sejumlah besar dari senyawa-senyawa ini menunjukkan aktivitas farmakologi yang kuat dan merupakan kandidat yang menarik untuk bahan obat-obatan baru terutama pada area penelitian antikanker dan antimikroba. Senyawa-senyawa lainnya telah dikembangkan sebagai kandidat obat analgesik (sebagai contoh ziconotid yang diperoleh dari moluska spesies *Conus magus*) atau untuk mengobati inflamasi. Sejumlah produk alami yang diperoleh dari organisme bahari ini menunjukkan kesamaan struktur kimia yang langsung dengan metabolit yang diproduksi oleh mikroba yang memungkinkan mikroorganisme ini (endosimbion berupa jamur, bakteri dan alga mikro) setidaknya terlibat dalam proses biosintesis senyawa-senyawa yang diproduksi oleh organisme laut ini atau merupakan sumber sebenarnya dari senyawa tersebut. Indonesia sebagai negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi memiliki peluang yang cukup besar untuk penemuan bahan kandidat obat. Dilain pihak, penelitian tentang fungi endosimbionik terutama yang berasal dari organisme laut sebagai penghasil senyawa bahan alami di Indonesia masih sangatlah terbatas.

Ascidian termasuk filum Chordata laut subfilum unochordata (Tunikata) yang unik seperti halnya sponge. Tunikata mempunyai tubuh lunak dan hidup secara sesil dengan

mekanisme pertahanan tubuh tidak terlihat. Unochordata kadang-kadang juga disebut tunikata atau *sea squirts*. Tunikata tumbuh pada dasar dan dam memiliki lapisan tubuh yang terbuat dari tunisin (*tunicin*), suatu bahan selulosa dimana organisme ini mendapatkan namanya.

Penelitian ini bertujuan untuk mencari kandidat obat-obatan baru yang difokuskan pada kandidat bahan obat yang memiliki potensi antibakterinya. Spesies ascidians *Didemnum molle* diambil dari sekitaran Teluk Manado.

METODE PENELITIAN

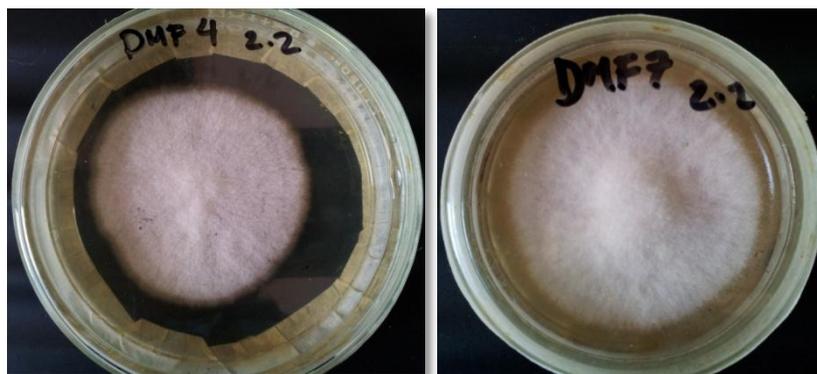
Ascidians *Didemnum molle*, di ambil dari perairan Bunaken pada koordinat 1°37'34.92"LU; 124°45'32.58"BT. Sampel segar selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan tahapan isolasi jamur maupun bakteri. Jamur endosimbion diisolasi dari dalam jaringan *D. molle* dengan cara sebagai berikut. Spesimen *D. molle* direndam dalam etanol 70% selama 30 detik dan di potong dengan metode septik-aseptik. Potongan ini selanjutnya diletakkan di atas permukaan malt agar di cawan petri. Kloramfenikol 0.2 g/L sebelumnya di tambahkan ke dalam media agar ekstrak malt untuk mencegah kontaminasi silang bakteri. Kontrol negatif dipakai untuk melihat pertumbuhan jamur epibion yang terdapat di permukaan tubuh. Jamur mulai tumbuh dari potongan setelah 3-7 hari. Selanjutnya dilakukan pemurnian simbion yang bertujuan untuk memisahkan koloni simbion dengan mengamati perbedaan morfologi. Purifikasi jamur dilakukan dengan cara menusuk miselia jamur yang tumbuh pada bagian terjauh dengan menggunakan kawat ose steril, selanjutnya bagian dari jamur tersebut dipindahkan kembali ke media PDA steril. Hal yang sama juga dilakukan pada miselia dengan morfologi yang berbeda. Uji antibakteri dari jamur simbion dilakukan dengan metode Kirby-Bauer (Boyd, 1995; Koneman *et al.*, 1992, Lay, 1994) yang dimodifikasi oleh (Nainggolan, 2000). Pengujian aktivitas ini dilakukan dengan menanam potongan agar dari miselium isolat jamur pada cawan petri yang berisi media kombinasi yang merupakan paduan antara media agar ekstrak malt dan NA dengan jarak yang sama. Sebelumnya bakteri uji digores pada permukaan media. Hal ini dilakukan dengan menumbuhkan bersama bakteri uji dan isolat jamur simbion dengan bakteri uji pada media kombinasi. Langkah ini dikenal dengan istilah ko-kultivasi. Ciprofloxacin sebagai kontrol positif dilarutkan sebanyak 2 mg/ml. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 X 24 jam. Pengukuran zona hambat dilakukan mengukur diameter daerah jernih yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Miselial jamur yang telah tumbuh pada media malt kemudian secara bertahap dimurnikan selanjutnya dipindahkan ke media tersebut di atas pada cawan petri lainnya. Pemurnian ini

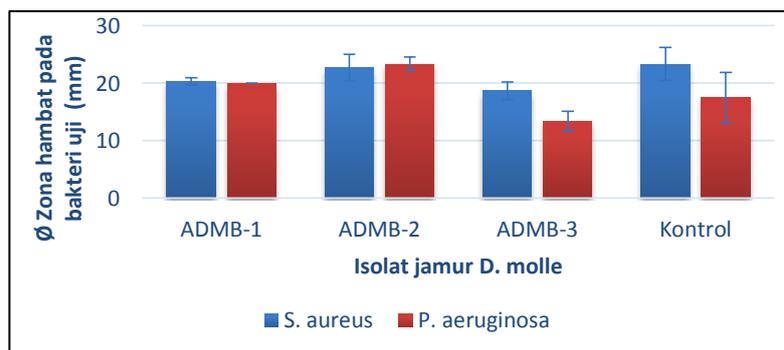
dilakukan dengan melihat perbedaan karakteristik morfologi miselia dari tiap jamur yang diisolasi. Dari tahapan pemurnian jamur simbion *D. molle* diperoleh tiga isolat jamur dengan karakteristik miselium berwarna putih, dengan miselia jamur yang berbeda satu dengan yang lainnya. Pada pengamatan lanjut dari jamur ini disimpulkan merupakan jenis jamur yang menyerupai-Acremonium (*Acremonium-like fungus*) yang selanjutnya disebut sebagai *Acremonium* sp. 1 sampai dengan 3 (ADMB 1-3), ketiga jamur kemudian dikultur kembali pada media ekstrak malt sehingga diperoleh isolat murni. Jamur simbion yang diisolasi dari ascidians *D. molle* dapat dilihat pada Gambar 1. Setelah diperoleh isolat yang murni, langkah selanjutnya yang dilakukan yaitu melakukan skrining ada tidaknya aktivitas antibakteri pada ketiga isolat jamur simbion yang diisolasi dari ascidian *D. molle*. Bakteri uji yang digunakan dalam skrining aktivitas ini adalah *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini dilakukan dengan menumbuhkan bersama bakteri uji dan isolat jamur simbion dengan bakteri uji pada media kombinasi. Langkah ini dikenal dengan istilah ko-kultivasi. Gambar 2 merupakan rata-rata zona hambat yang dihasilkan oleh ketiga isolat jamur terhadap bakteri uji tersebut di atas.

Pada pengukuran diameter zona hambat isolat jamur ADMB-1 (Gambar 2) didapatkan hasil hambat rata-rata yang relatif sama pada kedua bakteri uji *aureus* yang bersifat Gram positif dan *P. aeruginosa* yang bersifat Gram negatif. Hal yang serupa juga terlihat pada isolat jamur ADMB-2. Kemungkinan besar senyawa antibiotik yang dihasilkan kedua isolat tersebut memiliki aktivitas dengan spektrum yang luas. Sementara hasil pengukuran zona hambat pada isolat ADMB-3 menunjukkan hasil yang relatif kecil dibandingkan kedua isolat sebelumnya, hal ini diduga oleh beberapa hal antara lain konsentrasi tumbuh pada kedua jamur yang berbeda di mana pada pertumbuhan sel ADMB-1 dan 2 lebih signifikan dibandingkan dengan jamur ADMB-3. Perumbuhan sel yang lebih cepat berkorespondensi dengan jumlah senyawa yang dihasilkan oleh isolat. Dugaan lainnya konsentrasi senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh ketiga isolat uji yang berbeda, atau dapat pula diakibatkan oleh perbedaan jenis senyawa yang dihasilkan. Diperlukan uji lanjut isolat jamur ADMB-1 dan 2 yang menunjukkan spektrum aktivitas antibiotik yang luas.



Gambar 1. Isolat jamur simbion dari *Didemnum molle*

Sejauh ini pengendalian infeksi Gram negatif sering kali menjadi kendala dalam dunia kedokteran modern, hal ini diakibatkan oleh karakteristik bakteri kelompok Gram negatif yang memiliki dinding peptidoglikan yang cukup padat dan kompak sehingga menghambat proses internalisasi senyawa obat untuk mampu mempengaruhi mekanisme seluler dari bakteri. Di samping adanya “*efflux-pump mechanism*”, suatu mekanisme untuk mengeluarkan senyawa-senyawa yang tidak dibutuhkan dalam proses-proses biotransformasi seluler bakteri melalui sistem sekresi mereka (Poole, 2007; Posangi *et al.*, 2014). Adanya senyawa-senyawa antibakteri dari isolat jamur dari ascidians juga diperkuat dengan ditemukannya senyawa yang berfungsi sebagai antibiotik, anti inflamasi, anti alergi dan anti kanker. Senyawa Didemnaketol F dan G yang diisolasi dari ascidians *Didemnum* sp. dari perairan Laut Merah menunjukkan aktivitas moderat terhadap galur sel kanker HeLa, selain itu senyawa Didemnaketol F menunjukkan aktivitas antimikroba yang ampuh melawan bakteri patogen *E. coli* dan jamur *C. albicans* (Shaala *et al.*, 2014). Sedangkan Khoeri *et al.*, (2011) berhasil mengisolasi bakteri simbiosis *Virgibacillus* sp. dari *D. molle* yang berasal dari Pulau Karimun Jawa. Isolat bakteri ini menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus* sp. dan *E. coli*.



Gambar 2. Grafik rata-rata zona hambat yang dihasilkan oleh kedua jamur simbiosis terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 3. Isolat bakteri *Bacillus galacosidilyticus* (panah merah), simbiosis dari *D. molle*

Kontrol positif kloramfenikol memiliki mekanisme aksi menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme menghambat sintesis protein dengan jalan mencegah pemanjangan rantai protein dengan menghambat aktivitas enzim peptidil transferase pada ribosom bakteri. Senyawa ini secara spesifik terikat pada residu A2451 dan A2452 di 23S rRNA pada subunit ribosom 50S dan mencegah formasi ikatan peptide (Bara *et al.*, 2013).

Pada gambar 3 menunjukkan isolat bakteri simbiosis yang berhasil diisolasi dari ascidians *D. molle* (panah merah). Isolasi bakteri ini menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar pertumbuhan isolat yang dimaksud. Melalui sequencing dari 16s ribosomal DNA dari isolat bakteri target, kami berhasil mengetahui spesies bakteri berdasarkan perbandingan DNA genom dengan *database* di situs NCBI. Dari hasil yang diperoleh berdasarkan perbandingan DNA genom dari spesies yang diisolasi adalah *Bacillus galacosidilyticus*. *Bacillus* sp. biasanya memproduksi antibiotik contoh antibiotik yang dihasilkan antara lain ramicidin, tyrocidine, bacitracin, mycobacillin, surfactin, bacilysin, and subtilin. Sejauh ini belum ada laporan penelitian tentang antibiotik yang diproduksi dari isolat spesies *B. galacosidilyticus*. Walaupun memiliki rata-rata pertumbuhan yang lambat namun pertumbuhan ini dapat ditingkatkan dengan memanipulasi media pertumbuhan yang sesuai dengan kebutuhan dari isolat jamur yang dimaksud, sehingga diperoleh biomassa dari bakteri yang cukup untuk penelitian lanjut.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Diperoleh 3 isolat jamur simbiosis yang diisolasi dari *D. molle* yang memiliki aktivitas antibakteri.
2. Diperoleh isolat bakteri *Bacillus galacosidilyticus* dengan prospek yang menjanjikan untuk diteliti lebih lanjut kandungan senyawa aktifnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas bantuan dana Hibah Riset Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) tahun anggaran 2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Aly, A. H. 2010. Protein Kinase Inhibitors and Other Cytotoxic Metabolites from the Fungal Endophyte *Stemphylium Botryosum* Isolated from *Chenopodium album*." *Mycosphere* 1(2): 153.

- Aly, A. H., Debbab, A., Clements, C., Edrada-Ebel, R., Orlikova, B., Diederich, M., Wray, V., Lin, W., Proksch, P. 2011. NF Kappa B Inhibitors and Antitrypanosomal Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium* Sp. Isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**(1): 414-421.
- Aly, A. H., Debbab, A., Proksch, P. 2011. Fungal Endophytes: Unique Plant Inhabitants with Great Promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**(6): 1829-1845.
- Bara, R., Aly, A. H., Pretsch, A., Wray, V., Wang, B., Proksch, P., Debbab, A. 2013. Antibiotically Active Metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an Endophyte of *Aloe vera*. *J Antibiot* **66**(8): 491-493.
- Bara, R., Aly, A. H., Wray, V., Lin, W., Proksch, P., Debbab, A. 2013. Talaromins A and B, New Cyclic Peptides from the endophytic Fungus *Talaromyces wortmannii*." *Tetrahedron Letters* **54**(13): 1686-1689.
- Bara, R., Zerfass, I., Aly, A. H., Goldbach-Gecke, H., Raghavan, V., Sass, P., Mandi, A., Wray, V., Polavarapu, P. L., Pretsch, A., Lin, W., Kurtan, T., Debbab, A., Broetz-Oesterhelt, H., Proksch, P. 2013. Atropisomeric Dihydroanthracenones as Inhibitors of Multiresistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of Medicinal Chemistry* **56**(8): 3257-3272.
- Bara, R. A., Zerfaß, I., Lai, D., Lin, W., Debbab, A., Brötz-Oesterelt, H., Proksch, P. 2013. New Natural Product from *Botryosphaeria australis*, an Endophyte from Mangrove *Avicennia marina*." *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology* **8**(3): 139-145.
- Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E. G., Totzke, F., Zirrgiebel, U., Schälchtele, C., Kubbutat, M. H. G., Lin, W. H., Mosaddak, M., Hakiki, A., Proksch, P., Ebel, R. 2009. "Bioactive Metabolites from the Endophytic Fungus *Stemphylium globuliferum* Isolated from *Mentha pulegium*." *Journal of Natural Products* **72**(4): 626-631.
- Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Pretsch, A., Pescitelli, G., Kurtan, T., Proksch, P. 2012. New Anthracene Derivatives – Structure Elucidation and Antimicrobial Activity." *European Journal of Organic Chemistry*(7): 1351-1359.
- Debbab, A., Bara, R., Pretsch, A., Edrada Ebel, R., Wray, V., Pescitelli, G., Kurtan, T., Proksch, P. 2011. New rare atropisomers: structure elucidation, absolute configuration and antimicrobial activity. *Planta Med* **77**(12): SL55.
- Dwilestari, Awaloei, H., Posangi, J., Bara, R. 2015. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit pada Daun Mangrove *Sonneratia alba* terhadap Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*." *e-journal Biomedik Unsrat* **3**(1): 394-398.
- Ebrahim, W., Aly, A. H., Mándi, A., Totzke, F., Kubbutat, M. H. G., Wray, V., Lin, W.-H., Dai, H., Proksch, P., Kurtán, T., Debbab, A. 2012. "Decalactone derivatives from *Corynespora cassicola*, an endophytic fungus of the mangrove plant *Laguncularia racemosa*." *European Journal of Organic Chemistry* **2012**(18): 3476-3484.
- Faraknimella, T. L., Bara, R., Wowor, P. M., Posangi, J. 2015. "Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Akar Tumbuhan Bakau (*Sonneratia alba*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichiae coli*." *Jurnal e-Biomedik-Universitas Sam Ratulangi (eBm)* **3**(3): 785-88.

- Ibrahim, S. R. M., Min, C. C., Teuscher, F., Ebel, R., Kakoschke, C., Lin, W., Wray, V., Edrada-Ebel, R., Proksch, P. 2010. "Callyaerins A-F and H, new cytotoxic cyclic peptides from the Indonesian marine sponge *Callyspongia aerizusa*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**(14): 4947-4956.
- Kartika, R., Bodhi, W., Kepel, B., Bara, R. 2014. Uji Daya Hambat Jamur Endofit Akar Bakau *Rhizophora apiculata* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichiae coli*." *Jurnal e-biomedik* **2**(1).
- Kasi, Y. A., Posangi, J., Wowor, M., Bara, R. 2015. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Daun Mangrove *Avicennia marina* terhadap Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentriae*. *e-Journal Biomedik Unsrat* **3**(1): 112-117.
- Khoeri, M. M., Radjasa, O. K., Sabdono, A. 2011. Bioprospecting of bacterial symbiont of tunicate *Didemnum molle* from Sambangan, Karimunjawa islands. *Journal of Coastal Development* **14**(3).
- Liwang, F., Bara, R., Awaloei, H., Wuisan, J. 2014. Uji aktivitas antibakteri jamur endofit akar bakau *Avicennia marina* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *E-journal Biomedik Unsrat* **2**(1).
- Menggelea, F. P., Posangi, J., Wowor, P. M., Bara, R. 2015. Uji Efek Antibakteri Jamur Endosimbion Spons Laut *Callyspongia* sp. Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. *Jurnal e-Biomedik (eBm)* **3**(1): 376-80.
- Nainggolan, J. I. 2000. Metode dan Teknik Penelitian Antimikroba Antibakteri. *diperoleh dengan wawancara pribadi dengan narasumber*.
- Phoanda, T., Bara, R., Wowor, P. M., Posangi, J. 2014. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Akar Tumbuhan Bakau (*Bruguiera gymnorrhiza*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*." *Jurnal e-biomedik* **2**(1).
- Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine* **39**(3): 162-176.
- Posangi, J., Bara, R. 2014. Analisis Aktivitas dari Jamur Endofit yang terdapat dalam Tumbuhan Bakau *Avicennia marina* di Tasik Ria Minahasa." *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis* **1**(1): 30-38.
- Santoso, V. P., Posangi, J., Awaloei, H., Bara, R. 2015. Uji Efek Antibakteri Daun Mangrove *Rhizophora apiculata* terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Staphylococcus aureus*." *e-journal Biomedik Unsrat* **3**(1): 399-405.
- Shaala, L. A., Youssef, D. T. A., Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Badr, J. M., Risinger, A. L., Mooberry, S. L. 2014. Didemnaketals F and G, New Bioactive Spiroketals from a Red Sea Ascidian *Didemnum* Species. *Marine Drugs* **12**(9): 5021-5034.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms." *Journal of Natural Products* **67**(2): 257-268.