

Majalah Obat Tradisional, 16(2), 88 – 94, 2011

SKRINING DAN ANALISIS KLT-BIOAUTOGRAFI SENYAWA ANTIMIKROBA BEBERAPA EKSTRAK SPONS ASAL PERAIRAN LAUT PULAU BARRANG LOMPO, SULAWESI SELATAN

SCREENING AND TLC-BIOAUTOGRAPHY ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM SOME SPONGE EXTRACTS ORIGINATED FROM BARRANG LOMPO SEA ISLAND, SOUTH SULAWESI

Risfah Yulianty^{1*}, Herlina Rante¹, Gemini Alam¹ dan Akbar Tahir²

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin

² Fakultas Ilmu Kelautan, Universitas Hasanuddin

ABSTRAK

Spons merupakan salah satu invertebrata filum Porifera yang menghasilkan senyawa aktif dengan berbagai variasi struktur dan salah satu aktivitas biologinya adalah sebagai antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak spons yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan potensi senyawa aktif antimikroba dari spons asal perairan Pulau Barrang Lompo. Mikroba uji yang digunakan adalah Escherichia coli, Salmonella typhii, Staphylococcus aureus, dan Candida albicans. Bahan uji diperoleh dengan maserasi 14 buah sampel spons dengan metanol yang dilanjutkan dengan partisi berturut-turut menggunakan kloroform dan metanol, selanjutnya dilakukan uji KLT-bioautografi terhadap ekstrak yang aktif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari sampel spons dengan kode BRLP-009 dan BRLP-010 mempunyai aktivitas paling potensial sebagai antimikroba.

Kata Kunci: KLT-Bioautografi, Antimikroba, Spons

ABSTRACT

Sponges is one of the invertebrate Porifera phyla that produce active compounds with various structures and one of the biological activity as antimicrobial. The purpose of this research was to find out the sponge extracts that can inhibit microbial growth and potential of antimicrobial active compounds from sponge at Barrang Lompo Island. The microbes used were Escherichia coli, Salmonella typhii, Staphylococcus aureus, and Candida albicans. The sponge extracts were obtained by maceration 14 sponge samples with methanol, followed by partition using chloroform and methanol, then TLC-bioautography toward the active extract. The results showed that methanol extracts of sponge with code BRLP-009 and 010 have the most potential effect as antimicrobial agent.

Key words: TLC-Bioautography, antimicrobial, sponges

PENDAHULUAN

Sumber daya alam wilayah daratan sudah banyak diteliti oleh ilmuwan untuk diambil manfaatnya bagi kesejahteraan hidup manusia. Indonesia merupakan negara bahari yang kaya akan laut. Salah satu kekayaan alam laut Indonesia adalah spons yang merupakan salah satu hewan invertebrata yang mempunyai potensi aktifitas biologis yang berguna dalam pengobatan penyakit. Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa spons menghasilkan senyawa antimikroba. Senyawa bioaktif yang telah berhasil ditemukan dalam penelitian terhadap spons adalah Discodermis (HBOI, USA) merupakan peptida yang diisolasi

dari spons yang mempunyai aktifitas antimikroba dan immunosupressif (Kelly, 1994).

Berbagai substansi aktif telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari spons Indonesia antara lain barangamide, brianthein, aaptamin, demethyl aaptamin, lembehyne, dan bitungolides (Rachmaniar,2003). Senyawa-senyawa lain masih banyak diteliti dan dilaporkan mempunyai aktivitas antimikroba seperti caminoside A dan swinhoeiamide A (Astuti, 2003). Analisis yang dilakukan terhadap spons *Xestospongia aschmorica* menghasilkan empat senyawa manzamine baru dengan aktivitas antibakteri (Endrada *et al.*,1996). Manzamin A yang sebelumnya banyak diteliti karena potensinya sebagai senyawa antikanker mampu menghambat

parasit malaria baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Ang *et al.*,2000). Senyawa-senyawa lainnya juga dilaporkan mempunyai aktivitas antimikroba seperti caminoside A, suatu glikolipid yang diisolasi dari spesies *Caminuss phaeoconia*, 1,2-dioxane ring peroxide acid dari familia plakiniidae dan swinhoeiamide A, suatu derivative calyculin dari spons *Theonella swinhoei* yang juga dilaporkan aktif terhadap fungi patogen *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* dengan KHM masing-masing 1,2 dan 1,0 µg/mL (Linington *et al.*,2002; Chen *et al.*, 2002). *Callyspongia* sp (Kelas Demospongiae) menurut Nakao *et al.* (2003) *C. truncata* mengandung senyawa poliasetilen asam callysponginat yang mapu menghambat enzim α-glukosidase. Pada *Callyspongia* sp yang diperoleh dari Laut Merah dilaporkan terdapat 6 senyawa poliasetilen baru yaitu aikupikanynes A-F, namun belum diketahui aktivitas farmakologinya (Alam *et al.*,2003). Penelitian yang telah dilakukan oleh Astuti *et al.* (2003) terhadap 15 ekstrak spons yang dikoleksi dari Taman Laut Bunaken, Teluk Belita dan Pulau Barrang Lompo dan semua ekstrak dari Taman Laut Bunaken aktif terhadap bakteri *S. aureus*, *S. typhii*, dan *E. coli* serta jamur *C. albicans* pada konsentrasi pemberian 1000 µg/ml.

Antimikroba tersebar di alam dan memegang peranan penting dalam mengatur populasi mikroba dalam tanah, air, dan limbah. Antimikroba/antibiotika ini berbeda dalam susunan kimia dan cara kerjanya. Dari sekian banyak antibiotika yang telah berhasil ditemukan, hanya beberapa saja yang cukup tidak toksik untuk dapat dipakai dalam pengobatan. Resistensi dari populasi kuman terhadap berbagai jenis antibiotika menimbulkan banyak problem dalam pengobatan penyakit infeksi (Anonim, 1993). Antimikroba yang ideal menunjukkan toksisitas selektif, dimana obatnya lebih toksis terhadap mikroorganismenya dibandingkan pada sel hospes. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh obat yang selektif terhadap mikroorganisme atau karena obat pada reaksi-reaksi biokimia penting dalam sel parasit lebih unggul pengaruhnya terhadap sel hospes. Disamping itu juga struktur sel mikroorganisme berbeda dengan struktur sel manusia (hospes, inang) (Jawetz *et al.*,2001).

Perlu dilakukan penelusuran senyawa antimikroba baru yang diharapkan berpotensi lebih baik dengan toksisitas yang lebih rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak spons yang dapat menghambat pertumbuhan

mikroba dan potensi senyawa aktifnya yang dapat digunakan sebagai antimikroba.

METODOLOGI

Pembuatan Ekstrak dan Partisi Pelarut

Spons sebanyak 14 jenis yang diambil secara acak dari perairan Pulau Barrang Lompo dengan penyelaman SCUBA dengan kedalaman antara 4-20 m dari permukaan laut, dipotong-potong kecil dan diekstraksi secara maserasi dengan metanol selama 3 x 24 jam. Proses maserasi diulangi sebanyak 3 kali, filtrat dikumpulkan lalu diuapkan dengan evaporator hingga diperoleh ekstrak metanol kental. Selanjutnya dipartisi menggunakan dua macam pelarut yang tidak bercampur di dalam corong pisah yaitu kloroform dan air.

Penyiapan Mikroba Uji

Mikroba yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bakteri dan jamur. Bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhii*, sedangkan jamur yang digunakan adalah *Candida albicans*. Bakteri dan jamur diambil dari biakan agar miring yang ditumbuhkan pada nutrient broth (NB) dan diinkubasi ± 24 jam. Biakan dalam media cair tersebut diencerkan dengan air saline (NaCl 0,9%) sampai kekeruhannya menyamai standar Mc. Farland (10⁸ CFU).

Uji Antimikroba

Sebanyak 10 mg ekstrak kloroform dan metanol dari masing-masing sampel spons dilarutkan dalam 200 µl DMSO (200 µL = 0,2 ml) kemudian dicampurkan dengan nutrient agar (NA) yang telah dicairkan (volume akhir 10 ml). Campuran tersebut dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Setiap cawan petri dibagi menjadi empat zona untuk masing-masing mikroba uji yaitu *E. coli*, *S. aureus*, *S. thypii*, dan *C. albicans*. Mikroba uji yang kekeruhannya sudah menyamai standar Mc. Farland (10⁸ CFU) diambil sebanyak 5 µl dan diteteskan pada media yang sudah memadat. Setelah itu tetesan tadi disebarkan di atas media dengan menggunakan *drigalsky* (metode *surface plate*). Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif (+) bakteri dan ketokonazol sebagai kontrol positif (+) jamur, kontrol negatif (-) dibuat dengan menumbuhkan bakteri atau jamur dalam media yang mengandung DMSO.

Ekstrak spons yang memiliki aktifitas paling tinggi sebagai antimikroba yang didapat dari hasil skrining kemudian diuji dengan metode KLT-bioautografi langsung yaitu medium GNA (Glukosa

*Korespondensi : Risfah Yulianty

Alamat : Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin

Email : risfah@yahoo.com

Natrium Agar) steril sebanyak 10 ml dituang ke dalam cawan petri steril. Lempeng KLT yang telah dilusi dengan heksan : etil asetat : amonia (0,5 : 5 : 5 tetes) untuk sampel BRLPM-009 dan heksan : etil asetat (2 : 1) untuk sampel BRLPM-010 diletakkan di atas permukaan medium agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji dan dibiarkan selama 60 menit dan lempeng tersebut diangkat dan dikeluarkan. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 14 jenis spons yang telah dikumpulkan di Pulau Barrang Lompo dengan kode BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-07, BRLP-08, BRLP-09, BRLP-10, BRLP-12, BRLP-13, BRLP-14, BRLP-15, BRLP-16, BRLP-17, BRLP-18, diambil dengan menggunakan peralatan *SCUBA diving* pada kedalaman antara 4 sampai 20 meter. Pengambilan sampel dilakukan pada dasar laut berpasir, berbatu, dan dasar perairan yang rata. Bentuk sampel basah yang diambil antara lain mempunyai tonjolan kecil, permukaan tubuh kasar, bagian luar tubuh berlendir, dan beberapa sampel terdapat simbion berupa cacing, bintang laut, dan alga.

Metode penyarian sampel yang digunakan adalah metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dingin yang banyak digunakan dan paling sederhana di antara metode lain, yaitu hanya dengan merendam sampel dalam penyari yang sesuai. Setelah itu spons dipotong-potong kecil dan direndam dalam metanol. Maksud pemotongan di sini adalah untuk memperluas permukaan bidang sentuh antara metanol dan spons, dengan demikian penyarian dapat lebih efektif. Penggunaan pelarut metanol pada penelitian ini karena sifatnya yang semipolar sehingga dapat menyari komponen kimia yang bersifat polar dan non polar. Hal ini dilakukan karena zat aktif yang terkandung dalam spons belum diketahui. Pada saat perendaman spons dalam metanol, konsentrasi lingkungan luar sel lebih tinggi daripada dalam sel sehingga isi sel termasuk zat aktifnya akan keluar dan terlarut dalam metanol (Anonim, 1993). Maserasi dilakukan dalam tiga tahap (3 x 24 jam) agar zat aktif yang dikehendaki dapat diperoleh semuanya.

Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dipisahkan menggunakan rotavapor sampai diperoleh ekstrak metanol kental. Selanjutnya dipartisi dengan kloroform dan air dalam wadah corong pisah. Partisi bertujuan untuk memisahkan komponen kimia berdasarkan sifat kepolarannya. Prinsip partisi ini menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur

seperti kloroform dan air. Senyawa kimia yang sifatnya relatif non polar akan larut pada kloroform, sedangkan senyawa polar larut dalam air. Selain senyawa kimia yang sifatnya polar, dalam fase air juga terlarut garam-garam. Untuk menghilangkan garam tersebut, lapisan air diuapkan sampai kering kemudian ditambahkan metanol. Senyawa organik polar akan larut dalam metanol sedangkan garam anorganik tidak larut karena sifatnya yang sangat sukar larut dalam metanol (Anonim, 1993; Harborne, 1994). Selanjutnya garam dipisahkan dengan cara sentrifus pada kecepatan 1500 rpm.

Ekstrak kloroform mengandung senyawa yang relatif non polar dan metanol mengandung senyawa polar. Pemisahan ini dimaksudkan agar senyawa kimia dengan tingkat polaritas tertentu pada setiap sampel spons terkonsentrasi pada salah satu ekstrak, sehingga dapat memudahkan dalam penelusuran senyawa aktif tertentu dari ekstrak spons. Ekstrak kloroform dan metanol dari masing-masing spons ditimbang (tabel 1).

Skrining aktifitas ekstrak spons dilakukan dengan menggunakan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella typhosa* sedangkan untuk jamur digunakan *Candida albicans*.

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan biakan mikroba uji adalah *nutrient broth* (NB) atau disebut juga dengan kaldu nutrien, medium ini berisi ekstrak daging dan pepton yang diketahui dapat menunjang pertumbuhan sebagian besar bakteri atau disebut juga medium serbaguna. Untuk uji dilusi padat digunakan medium *nutrient agar* (NA) yaitu kaldu nutrien yang diberi pematat seperti agar.

Pada tahap skrining aktifitas antimikroba, digunakan metode dilusi padat karena metode ini menghemat waktu pengerjaan dan tidak mudah terkontaminasi selama pengerjaan. Ekstrak dikatakan aktif jika pada konsentrasi $\leq 1000 \mu\text{g/ml}$ mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan tidak adanya pertumbuhan mikroba pada media pertumbuhan (Hoffmann, 1993). Mikroba uji sejumlah 5 μL diratakan di atas media agar dengan menggunakan alat *drigalsky*. Pada metode dilusi padat ini, hasil pengamatan dinyatakan dalam potensi kemampuan ekstrak dalam menghambat/membunuh pertumbuhan mikroba. Hasil dari metode ini melalui pengamatan visual, maka ketelitian jumlah pengambilan ekstrak dan mikroba uji sangat diperlukan untuk dapat membandingkan potensi ekstrak dalam menghambat pertumbuhan mikroba.

Tabel I. Hasil ekstraksi sampel beberapa spons koleksi pulau Barrang Lompo

Kode Sampel	Bobot Sampel (g)	Bobot ekstrak	
		Kloroform (g)	Metanol (g)
BRLP-001	500	3,15	2,25
BRLP-002	700	3,32	2,34
BRLP-003	500	2,15	3,37
BRLP-007	550	2,72	2,25
BRLP-008	600	3,61	2,25
BRLP-009	600	0,20	5,32
BRLP-010	800	1,76	4,00
BRLP-012	1500	3,40	13,17
BRLP-013	250	0,52	0,23
BRLP-014	800	4,62	2,54
BRLP-015	500	4,92	2,50
BRLP-016	300	0,57	1,36
BRLP-017	500	2,19	0,75
BRLP-018	1000	2,21	4,06

Tabel II. Hasil uji potensi antimikroba dalam skrining pada ekstrak kloroform konsentrasi 1000 µg/mL

Sampel	Mikroba Uji			
	EC	ST	SA	CA
BRLP-001	-	-	-	-
BRLP-002	-	-	-	-
BRLP-003	-	-	-	-
BRLP-007	-	-	-	-
BRLP-008	+	-	+	+
BRLP-009	++	++	++	++
BRLP-010	+	+	++	+
BRLP-012	-	-	-	-
BRLP-013	-	-	-	-
BRLP-014	+	+	+	+
BRLP-015	+	-	-	+
BRLP-016	+	+	+	+
BRLP-017	+	-	-	+
BRLP-018	+	+	++	+
K+ (antibakteri)	++	++	++	-
K+ (antijamur)	-	-	-	++
K-	-	-	-	-

Keterangan :

EC: *Escherichia coli*, ST: *Salmonella typhii*, SA: *Staphylococcus aureus*, CA: *Candida albicans*,

K+ (antibakteri): kontrol positif antibakteri (kloramfenikol),

K+ (antijamur): kontrol positif antijamur (ketokonazol), ++: tidak ada pertumbuhan,

+: pertumbuhan yang dihambat, -: pertumbuhan mikroba

Kloramfenikol dipilih sebagai kontrol positif terhadap bakteri karena berspektrum luas sehingga efektif untuk bakteri gram positif dan gram negatif. Bersifat mudah larut dalam lemak sehingga menembus sel bakteri (Siswandono, 1995). Antibiotik ketokonazol digunakan sebagai

kontrol positif terhadap jamur. Ketokonazol merupakan senyawa turunan imidazol, aktifitas antijamurnya dengan cara menimbulkan ketidakaturan membran sitoplasma jamur dan mempengaruhi biosintesis ergosterol dalam sel jamur (Siswandono, 1995).

Tabel III. Hasil uji potensi antimikroba dalam skrining pada ekstrak metanol pada konsentrasi 1000 µg/mL

Sampel	Mikroba Uji			
	EC	ST	SA	CA
BRLP-001	-	-	-	-
BRLP-002	-	-	-	-
BRLP-003	-	-	+	-
BRLP-007	-	-	-	-
BRLP-008	-	-	-	-
BRLP-009	++	++	++	++
BRLP-010	++	++	++	++
BRLP-012	-	-	-	+
BRLP-013	-	-	-	-
BRLP-014	-	-	-	+
BRLP-015	-	-	-	-
BRLP-016	-	-	-	-
BRLP-017	-	-	-	-
BRLP-018	-	-	-	+
K+ (antibakteri)	++	++	++	-
K+ (antijamur)	-	-	-	++
K-	-	-	-	-

Berdasarkan hasil uji skrining, diantara keseluruhan sampel spons, hanya spons dengan kode BRLP-009 dan BRLP-010 dalam ekstrak metanol yang menunjukkan potensi antimikroba 100% pada konsentrasi 1000 µg/mL (tabel II dan III). Konsentrasi ekstrak kloroform yang masih dapat menghambat mikroba uji adalah 1000 µg/mL, sedangkan ekstrak metanol kurang dari 1000 µg/mL sehingga untuk penelitian selanjutnya hanya digunakan ekstrak metanol dari spons BRLP-009 dan BRLP-010.

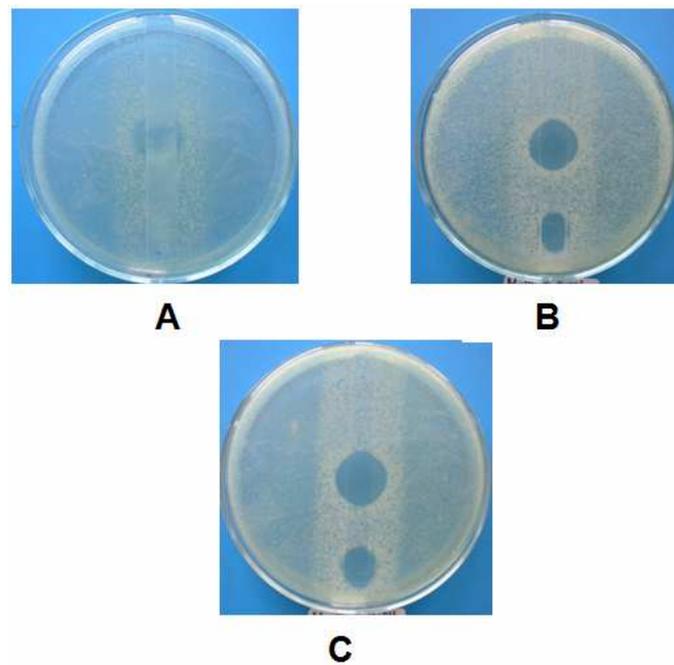
Spons BRLP-009 dan BRLP-010 yang telah diidentifikasi selanjutnya dianalisis KLT-bioautografi. Metode yang dipilih adalah metode bioautografi langsung karena dapat secara cepat mendeteksi bercak pada kromatogram yang memberi aktifitas antimikroba. Selain itu hanya memerlukan sedikit bahan uji dan pelaksanaannya relatif mudah.

Suspensi mikroba sebanyak 5 µL dicampur dengan 10 ml media *nutrient agar*. Setelah media agar memadat, lempeng KLT diletakkan pada lapisan permukaan media agar terjadi kontak senyawa dengan media dan mikroba uji. Pada pelaksanaan kadang-kadang ada beberapa gelembung udara yang terjebak antara lempeng KLT dengan permukaan media agar, keadaan ini dapat menghambat proses kontak dan menimbulkan kesulitan dalam pengamatan zona jernih yang terbentuk. Untuk mencegah hal ini lempeng KLT diletakkan perlahan-lahan dimulai

dari pangkal ke ujung lempeng KLT dan diusahakan tidak merusak media agar. Lempeng KLT kemudian ditekan perlahan agar benar-benar bersentuhan dengan media. Lempeng KLT dibiarkan 60 menit di atas media untuk memberi kesempatan komponen kimia berdifusi masuk ke dalam media, setelah itu lempeng KLT diangkat (Hamburger & Cordel, 1987).

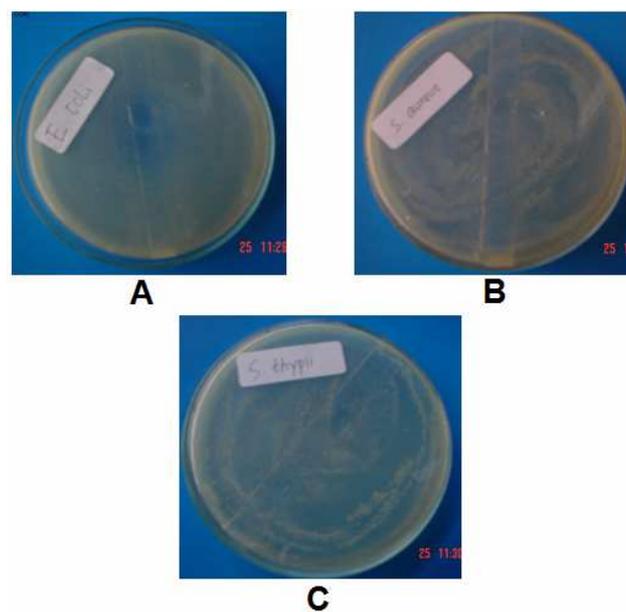
Adanya aktifitas antibakteri atau antijamur ditandai dengan terbentuknya zona hambatan yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tampak berupa daerah yang jernih tanpa terlihat pertumbuhan mikroba uji, sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan mikroba tetapi dihambat atau pertumbuhan itu lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh tetapi masih lebih jernih dibandingkan pertumbuhan disekitarnya.

Hasil bioautografi ekstrak BRLP-009 menunjukkan adanya satu bercak pada Rf 0,57 yang menunjukkan zona jernih (iradikal) terhadap bakteri *E.coli*, *S.aureus*, dan *S.typhii* (gambar 2). Sedangkan ekstrak BRLP-010 menunjukkan adanya dua bercak yang menunjukkan zona jernih terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Bercak pertama terletak pada tempat penotolan sampel dengan Rf 0,00 dan bercak kedua mengandung dua bercak senyawa yang memberikan satu zona jernih (radikal), kedua bercak tersebut memiliki nilai Rf 0,4 dan 0,53.



Gambar 1. KLT-bioautografi ekstrak metanol BRLP-010

Keterangan : A: *Salmonella typhii*, B: *Staphylococcus aureus*, C: *Escherichia coli*



Gambar 2. KLT-bioautografi ekstrak metanol BRLP-009.

Keterangan : A: *Escherichia coli*, B: *Staphylococcus aureus*, C: *Salmonella typhii*

Sedangkan ekstrak BRLP-010 terhadap bakteri *S.typhii* hanya menunjukkan satu bercak dengan zona jernih (iradikal) yang sama pada bercak kedua untuk bakteri *E.coli* dan *S.aureus* (gambar 1).

Hasil positif pada seluruh bakteri uji mengindikasikan bahwa senyawa aktif tersebut berspektrum luas untuk bakteri gram positif maupun gram negatif.

KESIMPULAN

Hasil partisi menggunakan metanol dari spons BRLP-009 memiliki potensi antibakteri yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, G., Adnan, A., Makhmud, A.I., Djide M.N., 2003, Analisis KLT-Bioautografi Senyawa Antibakteri Ekstrak Metanol Spons *Callyspongia* sp. *Majalah Obat Tradisional*
- Ang, K.K.H., Holmes, M.J., Higa, M.T., Kara, U.A.K. 2000. In Vivo Antimalarial Activity of The Beta-Carboline Alkaloid Manzamine A. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*. 1645-1649
- Astuti, P., Alam, G., Pratiwi,S.U.T., Hertiani, T., Wahyuono S. 2003. Skrining Senyawa Antiinfeksi dari Spons yang Dikoleksi dari Bunaken, Manado. *Majalah Obat Tradisional*. **8**(2): 36 - 38.
- Endrada, R.U., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Muller, W.E.G. Soest, R., van. R.W.M., 1996. Four New Bioactive Manzamine-Type Alkaloids from The Phillippine Marine Sponge *Xestospongia ashmorica*. *J. of Natural Product*. 59. 1056-1060.
- Hamburger, M.O., dan Cordell, G.A. 1987. Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possesing Antibacterial Activity. *Natural Product*. **50**(1):19-22.
- Harborne, J.B. 1984. *Metode Fitokimia*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1996. ITB. Bandung. 6-10,19-20.
- Jawetz, Melnick, dan Adelbergs's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Salemba Medika. Jakarta. 224-228.
- Kelly, M. 2001. *A Course Guide to The Sponge Taxonomy Workshop*. Departement of Pharmacognosy. Biological Field Station. University of Mississippi and NIWA, New Zealand.
- Kozloff, E.N. 1990. *Invertebrates*, 74. Saunders College Publishing. Philadelphia. 86-89
- Linington, R.G., Robertson, M., Gauthier, A., Finlay, B.B., Soest, R. van., Andersen, R.J. 2002. Caminoside A, An Antimicrobial Glycolipid Isolated from The Marine Sponge *Caminus sphaeroconia*. *Org Lett*. Nov 14; 4(23). 4089-4092.
- Nakao, Y., Uehara, T., Matsunaga, S., Fusetani, N., van Soest, R.W., Matunaga, S. 2003. Callysponginic Acid, A Polyacetylenic Acid which Inhibits Alpha Glucosidase, from The Marine Sponge *Callyspongia truncata*. *Journal of Natural Product*. 66(1). 156.
- Rachmaniar, R. 2003. Antikanker Swinholide A dari Spons *Theonella swinhoei*. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. **2**(4):122.