

PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER MENGGUNAKAN GEN 16S RRNA BAKTERI SIMBION ENDOFIT YANG DIISOLASI DARI ALGA MERAH (*Galaxaura rugosa*)

Muhammad Zulkifli Hamzah¹⁾, Herny E. I. Simbala¹⁾, Adithya Yudistira¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Endophytic bacteria are defined as bacteria that colonize healthy plant tissue without causing significant damage to the host. Several studies have shown that certain endophytic bacteria can produce chemical compounds that have health effects, especially antibacterial-producing compounds. The aim of this study was to obtain endophytic bacteria from red algae Galaxaura rugosa, to test the antibacterial activity of isolated endophytic bacterial against pathogenic bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus, and to identify the species of endophytic bacteria that have the highest antibacterial activity based on molecular analysis using encoding gene of 16S rRNA. Bacterial isolation was performed by dilution method. Three isolates were inoculated based on morphological differences. Testing of antibacterial activity was tested by agar diffusion method. Endophytic bacterial isolate that have the highest antibacterial activity is K2 isolate which categorized as intermediate against Staphylococcus aureus and categorized as strong against Escherichia coli. The result of molecular identification shows that K2 isolate has 99% similarity with Bacillus thuringiensis, Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus mycoides. After multiple sequence alignment and phylogenetic analysis, K2 isolate can be identified as Bacillus mycoides.

Keywords: Endophytic Bacteria, Galaxaura rugosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, 16S rRNA Gene.

ABSTRAK

Bakteri endofit didefinisikan sebagai bakteri yang menjajah jaringan tanaman yang sehat tanpa menimbulkan luka yang nyata pada inang. Beberapa studi menunjukkan bahwa bakteri endofit tertentu dapat memproduksi senyawa kimia yang memiliki efek bagi kesehatan, terutama senyawa penghasil antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri endofit dari alga merah *Galaxaura rugosa*, menguji aktivitas antibakteri dari isolat bakteri endofit tersebut terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta mengetahui spesies bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar berdasarkan analisis secara molekuler dengan menggunakan gen penyandi 16S rRNA. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran. Tiga (3) isolat diinokulasi berdasarkan perbedaan morfologi. Pengujian aktivitas antibakteri diuji dengan metode difusi agar. Isolat bakteri endofit yang memiliki daya antibakteri terbesar yaitu isolat K2 yang dikategorikan sedang terhadap *Staphylococcus aureus* dan kuat terhadap *Escherichia coli*. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat K2 memiliki kesamaan 99% dengan *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus mycoides*. Setelah dilakukan *multiple sequence alignment* dan *phylogenetic analysis*, isolat K2 dapat diidentifikasi sebagai *Bacillus mycoides*.

Kata kunci: Bakteri endofit, *Galaxaura rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Aktivitas antibakteri, Gen 16S rRNA

PENDAHULUAN

Makroalga di perairan Indonesia mencapai 782 spesies yakni sekitar 8,6% dari total biota di laut (Anggadireja *et al.* 2009; Dahuri, 1998). Rumpun laut dari kelas alga merah (Rhodophyceae) adalah yang terbanyak yang tumbuh di perairan laut Indonesia yaitu sekitar 452 jenis (Winarno, 1996). Makroalga memiliki potensi diantaranya mampu memproduksi sekunder berupa senyawa bioaktif yang beragam dengan aktivitas yang sangat luas sebagai antibakteri (Zainuddin dan Malina, 2009). Potensi yang dimiliki oleh rumput laut memungkinkan untuk dimanfaatkan dalam berbagai bidang, terutama di bidang nutrasetika dan pengembangan senyawa obat (Rahaweman, 2016).

Mikroba yang melekat pada bagian tubuh tanaman disebut sebagai mikroba endofit. Mikroba ini meliputi bakteri dan jamur, hidup pada akar, batang maupun daun dari suatu tanaman. Mampu melindungi inangnya dengan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif yang dapat membunuh bakteri patogen (Prihatiningtyas, 2006). Senyawa yang dihasilkan oleh mikroba ini mirip dengan inangnya dan diduga sebagai hasil koevolusi atau transfer genetik dari inang (Tan dan Zou, 2001).

Identifikasi berdasarkan sekuens gen 16S rRNA adalah akurat, yang dapat mengidentifikasi sampai tingkat spesies, dan dapat secara rutin digunakan untuk identifikasi mikrobakteri serta dapat mengarah pada analisis non kultur bakteri patogen (Jill, 2004). Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme (Stackebrandt dan Goebel, 1995).

Pentingnya peran alga dan bakteri yang berasosiasi dalam menghasilkan metabolit sekunder memungkinkan untuk mendapatkan senyawa alternatif sebagai antibakteri.

Berdasarkan hal-hal yang dipaparkan di atas, maka dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi secara molekuler bakteri yang berasosiasi dengan alga merah *Galaxaura rugosa* dan menguji potensi antibakteri dari isolat bakteri hasil isolasi tersebut.

METODE PENELITIAN

Alat

Masker, sarung tangan, snorkel, fins, *cooling box*, *zipper bag*, saringan air, alat-alat gelas, rak tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik (ADAM), lumpang dan alu, *magnetic stirrer* (Nesco Lab), jarum ose, pinset, *rotary shaker incubator* (Infors HT), bunsen, lemari pendingin, cetakan sumur diameter 7 mm, *laminar air flow* (Biotek), termometer, *autoklaf* (ALP), mikropipet (Ecopipette), L-Glass, mistar berskala, kertas label, plastik wrap, *aluminium foil*, jangka sorong, *bacteri coloni counter* (Health), seperangkat alat PCR (*Biometra T-Personal*) dan elektroforesis (*Biometra T-Personal*), alat fotografi.

Bahan

Alga merah *Galaxaura rugosa*., bakteri uji *Escherichia coli* (ATCC 25922) dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), aquades, etanol 70%, etanol 95%, NaCl 0.9%, Natrium Hipoklorit (NaOCl) 5,25%, media Nutrient Agar, media Nutrient Broth, antibiotik amoksisilin 0,1 mg/mL, kristal violet, lugol, larutan safranin, kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), primer set (untuk bakteri), Master Mix untuk amplifikasi DNA

(Bioline), ddH₂O, gel agarosa, TBE buffer 0.5x, dan etidium bromida.

Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel alga *Galaxaura rugosa* diambil dari perairan pantai Malalayang menggunakan alat bantu (masker, snorkel, dan fins). Sampel difoto kemudian diambil, selanjutnya dimasukkan ke dalam *zipper bag* dan disimpan dalam *cooling box* berisi es batu untuk dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi. Sampel diidentifikasi (secara morfologi) kemudian dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan dilakukan sterilisasi permukaan untuk menghilangkan pengotor maupun mikroorganisme epifit lain yang dapat mengkontaminasi.

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit

Penanaman bakteri endofit yang bersimbiosis dengan alga dilakukan dengan metode sebaran menurut Madigan (2012). Satu (1) g sampel alga yang telah disterilisasi permukaannya dihancurkan dengan cara digerus dengan lumpang dan alu sampai halus. Selanjutnya, 1 g sampel yang telah halus tersebut dimasukkan ke dalam 9 mL akuades sehingga diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Pengenceran bertingkat selanjutnya dilakukan untuk seri 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} . Dari masing-masing seri kemudian diambil 100 μ L dan disebarkan ke dalam cawan petri steril yang berisi media NA dan diinkubasi dalam inkubator (27-29°C) selama 2 x 24 jam. Koloni bakteri endofit yang tumbuh diamati bentuk, warna, elevasi, tepian dan ukurannya. Koloni-koloni bakteri (3 koloni) dipisahkan dengan jarum ose berdasarkan perbedaan

karakteristik morfologinya pada media NA baru dalam cawan petri dan diisolasi selama 24 jam. Isolat yang telah murni kemudian dipindahkan dan disimpan pada media NA.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Bakteri simbiosis endofit disiapkan dengan cara satu ose isolat bakteri endofit diinokulasikan ke dalam 5 mL media cair NB dan diinkubasi selama 24 jam dalam *rotary shaker* dengan suhu 27-29°C. Masing-masing koloni bakteri simbiosis endofit dalam media cair NB kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran, yaitu lapisan dasar dibuat dengan menuangkan masing-masing 10 mL NA dari media dasar ke dalam 6 cawan petri, lalu dibiarkan sampai memadat. Setelah memadat, pada permukaan lapisan dasar diletakkan 5 pencadang baja yang diatur sedemikian rupa jaraknya agar daerah pengamatan tidak saling bertumpuh. Kemudian suspensi bakteri dicampurkan ke dalam media pembenihan NA. Setelah itu, dituangkan 20 mL ke dalam tiap cawan petri yang diletakkan pencadang sebagai lapisan kedua, lalu dibiarkan sampai memadat. Selanjutnya setelah memadat, pencadang diangkat secara aseptik dari cawan petri, sehingga akhirnya terbentuklah sumur-sumur yang digunakan dalam uji antibakteri. Kemudian kultur isolat bakteri endofit diinokulasi pada sumur dan diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap zona bening yang terbentuk disekitar sumur dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm (Ortez, 2005).

Identifikasi Bakteri Endofit Secara Molekuler

Isolasi DNA Genomik

Isolasi DNA Genomik dari kultur bakteri akan dilakukan dengan metode *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid).

Amplifikasi gen 16S rRNA dengan Teknik PCR

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *combi block* (*whatman biometra Germany*). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan primer universal bact BKXF (*forward*) dan uni BKXR (*reverse*). Cetakan yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA yaitu DNA genomik bakteri yang telah diisolasi. Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR yang telah dimodifikasi.

Elektroforesis dan Visualisasi

DNA yang telah diamplifikasi kemudian diseparasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Gel direndam dalam campuran larutan TBE *buffer* dan etidium bromida. Visualisasi dilakukan dengan sinar UV pada *UV-transiluminator*. Hasil deteksi didokumentasikan.

Sekuensing gen 16S rRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin *autosequencing*. Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim sampel ke First Base Pte. Malaysia.

Pengolahan Data Sekuens DNA

Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan perangkat lunak Geneious. Bagian awal dan akhir kromatogram DNA dihapus kira-kira 30 bp dan untuk pembacaan nukleotida yang kurang baik diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan yang terbaca. Hasil sekuensing DNA kemudian dianalisis menggunakan program BLAST melalui media online NCBI untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies isolat bakteri endofit dari alga *Galaxaura rugosa* yang memiliki daya antibakteri terbesar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Endofit

Sampel alga yang diperoleh dilakukan sterilisasi permukaan dengan tujuan agar bakteri yang diperoleh nanti bebas dari kontaminasi yang tertempel pada permukaan sampel sehingga bakteri endofit yang ada di dalam sel *Galaxaura rugosa* didapatkan. Kemudian ditimbang lalu digerus sampai halus yang kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-7} , setiap pengenceran diinokulasikan sebanyak 100 μ L pada media NA.

Hasil isolasi dari sampel *Galaxaura rugosa* memperlihatkan banyaknya koloni bakteri yang tumbuh dan 3 koloni diantaranya yang diinokulasi ke media NA yang baru berdasarkan perbedaan karakteristik morfologi. Tiga (3) koloni yang terpilih kemudian dimurnikan dengan menggunakan media yang sama.

Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan dengan memperhatikan perbedaan morfologi dari ketiga isolat bakteri

simbion endofit seperti ukuran, bentuk, elevasi, tepian, dan warna koloni.

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa bakteri endofit *Galaxaura rugosa* memiliki ukuran dan tepian yang sama yaitu ukuran yang kecil dan tepian yang utuh. Sedangkan bentuk koloni *Circular* dan *Irregular*, Elevasi juga ada yang timbul dan rata. Dan warna juga berbeda-

beda yaitu putih susu, kuning, dan putih bening.

Dikatakan bakteri endofit jika warna pada permukaan koloni yaitu putih kekuningan, atau putih kental seperti susu. Selain itu bakteri endofit dicirikan dengan bentuk sel individu yang batang, serta bentuk koloni yang bulat, oval atau tidak beraturan (Pelczar, 1986).

Tabel 1. Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Koloni Bakteri Endofit Dari *Galaxaura rugosa*

Ciri Morfologi/Makroskopik Koloni Bakteri Endofit <i>Galaxaura rugosa</i>						
No.	Kode Isolat	Ukuran	Bentuk	Elevasi	Tepian	Warna
1	K1	Kecil	<i>Circular</i>	Timbul	Utuh	Putih Susu
2	K2	Kecil	<i>Irregular</i>	Timbul	Utuh	Kuning
3	K3	Kecil	<i>Circular</i>	Rata	Utuh	Putih Bening

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram isolat bakteri endofit K1, K2, dan K3 dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang diperoleh agar dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif atau Gram negatif.

Hasil pewarnaan Gram dari 3 isolat bakteri endofit pada Tabel 2 memiliki bentuk yang berbeda yaitu Kokus dan Basil, dan terdapat 1 isolat Gram-negatif yaitu pada isolat dengan kode K1 dan 2 isolat Gram-positif yaitu K2 dan K3.

Bakteri Gram positif mampu mempertahankan zat warna utama dalam pewarnaan Gram, yaitu Gentian Violet. Sehingga nampak warna ungu saat pengamatan dikarenakan dinding sel kelompok bakteri ini tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan yang mampu mengikat zat warna dan tidak rusak saat dicuci dengan alkohol.

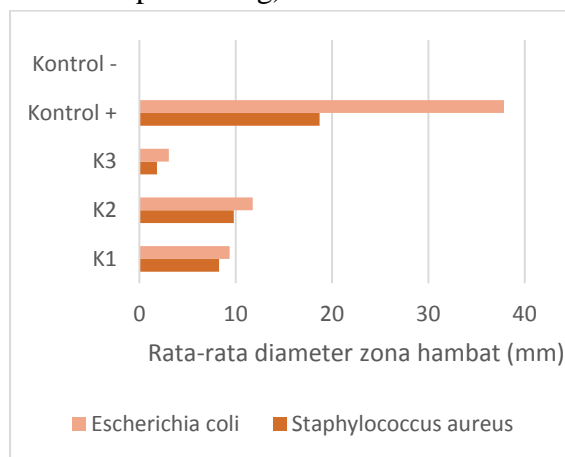
Bakteri Gram negatif memiliki komponen dinding sel yang sebagian besar tersusun lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna utama terutama pada saat dicuci dengan alkohol (lipid rusak pada saat dicuci dengan alkohol) akibatnya kelompok bakteri ini terlihat berwarna merah pada hasil pewarnaan Gram.

Tabel 2 Pengamatan Mikroskopik Sel Isolat Bakteri Endofit dari *Galaxaura rugosa*.

No.	Kode Isolat	Bentuk sel	Gram
1	K1	Kokus	-
2	K2	Basil	+
3	K3	Basil	+

Uji Daya Antibakteri Bakteri Endofit dari *Galaxaura rugosa*

Hasil uji aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Galaxaura rugosa* melalui pengamatan 1 x 24 jam masa inkubasi dengan tujuan pada waktu 24 jam bakteri sudah masuk fase *log* dan sudah menghasilkan metabolit sekunder dengan 3 kali pengulangan untuk masing-masing bakteri uji, kepekaan bakteri terhadap antibiotik dapat diamati berdasarkan terbentuknya zona hambat (daerah bening di sekitar pencadangan).



Gambar 1. Diagram Perbandingan Rata-rata Diameter Zona Hambat Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri

Berdasarkan penggolongan zona hambat oleh Davis dan Stoud (1971), maka rata-rata diameter zona hambat hasil pengujian aktivitas antibakteri yang dihasilkan isolat bakteri endofit dari alga *Galaxaura rugosa* terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu: K1 (8,275 mm) dalam kategori sedang, K2 (9,8 mm) dalam kategori sedang, dan K3 (1,833 mm) dalam kategori lemah. Sedangkan rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan isolate bakteri dari alga *Galaxaura rugosa* terhadap *Escherichia coli* yaitu: K1 (9,367 mm) dalam kategori sedang, K2 (11,75 mm) dalam kategori kuat, dan K3 (3,058) dalam kategori lemah.

Mekanisme kerja antibakteri dari senyawa yang dihasilkan isolat bakteri

endofit K1, K2, dan K3 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* belum diketahui dengan baik,, namun diduga terlibat dalam penghambatan sintesis dinding sel bakteri.

Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit *Galaxaura rugosa*

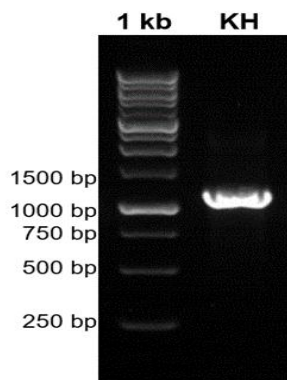
Identifikasi molekuler dilakukan pada isolat bakteri endofit *Galaxaura rugosa* yang memiliki daya antibakteri terbesar pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yaitu isolat bakteri endofit K2.

Dalam proses identifikasi molekuler bakteri, ada 3 proses utama yang paling dasar yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi dengan PCR dan elektroforesis.

Tahap pertama dalam ekstraksi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel yang dilakukan menggunakan buffer GP1. Pemecahan sel merupakan tahapan awal dari ekstraksi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Suhu pemanasan yaitu 60°C selama 15 menit dengan tujuan untuk meningkatkan permeabilitas dinding sel yang berakibatkan pada masuknya cairan dan materi lain di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel. Buffer-buffer yang digunakan pada tahap ini yaitu buffer GP2 yang bertujuan untuk menetralkan, buffer GP3 untuk mengikat DNA. Kemudian pencucian pada proses ekstraksi menggunakan buffer W1 untuk mencuci protein, buffer Wash Buffer untuk mencuci buffer-buffer sebelumnya dan garam-garam yang masih menempel pada DNA, dan *elution buffer* untuk melepaskan DNA dari membran serta untuk penyimpanan. Setelah itu didapati hasil dari ekstraksi yaitu, DNA murni.

Hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), pemanjangan nukleotida dilakukan oleh DNA polimerase berdasarkan cetakan DNA yang diperoleh dari proses ekstraksi DNA (Bardacki, 1994). Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR ada lima yaitu Taq DNA polimerase, MgCl₂, dNTPs, primer BKXF & BKXR (Kolondam, *in press*), dan DNA template. Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan, karena primer merupakan menentukan awal dan akhir daerah yang hendak disalin atau diperbanyak (Becker et al., 1996).

PCR yang telah dilakukan, akan dilihat hasilnya pada elektroforesis. Dari hasil elektroforesis ini maka akan diketahui maksimal atau tidak proses amplifikasi tersebut. Dilihat dari hasil elektroforesis, tampak adanya perpindahan DNA dari kutub negatif ke kutub positif. Dan hasil elektroforesis dari isolat K2 tersebut diketahui terdapat pita yang tesseparasi dan sejajar dengan marker sekitar 1.200 bp (Lampiran 11). Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang terimplikasi dengan ukuran ± 1.200 bp, sehingga dapat disimpulkan proses amplifikasi isolat K2 berhasil dilakukan.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Kemudian produk PCR DNA isolat K2 dideterminasi dengan menggunakan

sekuen 16S rRNA dianalisis secara lengkap di First Base Malaysia. Hasil sekuensing yang diperoleh dari Malaysia dibuka dan disunting dengan menggunakan perangkat lunak *Geneious*, kemudian dianalisis pada Gen Bank menggunakan BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotida*). Analisis tersebut dilakukan dengan tujuan membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia dari hasil yang didepositkan pada database Gen Bank sekuen publik. Analisis BLAST-N dilakukan secara online pada website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Hasil analisis BLAST-N dari isolat bakteri endofit K2 menunjukkan kemiripan DNA sekuens dengan *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus mycooides* dengan *maximum identity* sebesar 99%. Oleh karena itu dilakukan penyetaraan (*alignment*) kembali menggunakan *tools* situs ExPASy *Bioinformatics Resource Portal* (<https://www.expasy.org/tools/#translate>) dengan cara menerjemahkan (*translate*) FATSAs sekuens DNA dari *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus thuringiensis* dan isolat K2 menjadi sekuens protein, lalu dilakukan proses *alignment analysis* dan *phylogenetic analysis* supaya bisa diketahui secara jelas jenis spesies *Bacillus* dari isolat bakteri endofit K2. Setelah dilakukan kedua analisis tersebut, didapati hasil identifikasi isolat bakteri endofit K2 yaitu *Bacillus mycooides*

KESIMPULAN

1. Tiga isolat bakteri endofit yang diisolasi dari *Galaxaura rugosa* mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan

kategori rendah-sedang dan *Escherichia coli* dengan kategori rendah-kuat.

2. Isolat bakteri yang memiliki indeks penghambatan tertinggi setelah diidentifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA, *alignment analysis*, dan *phylogenetic analysis* memiliki kesamaan dengan *Bacillus mycoides*.

SARAN

Sebaiknya dilakukan karakterisasi senyawa antibakteri dari isolat bakteri yang diisolasi sehingga dapat diprediksikan mekanisme penghambatan dari senyawa antibakteri yang dihasilkan bakteri endofit tersebut terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggadireja, J.T., Zatinika A., Purwoto H., Istini. 2009. *Rumput Laut*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Becker, J. M., Caldwell, G. A., Zuchgo, E. A. 1996. *Biotechnology A Laboratory Course*. Academic Press, San Diego.
- Dahuri, R. 1998. Coastal zone management in Indonesia: issues and approaches. *Journal of Coastal Development*. **1(2)**:97-112.
- Jill, E. C. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. **17(4)** 840-862.
- Madigan, J., David, A. S., David, P. C. 2012. *Biology of Microorganisms 13th Edition*. Benjamin Cummings, USA.
- Ortez, J. H. 2005. *Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society For Microbiology, USA.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. S. C. 1984. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Edisi I*. UI-Press, Jakarta.
- Prihatiningtyas, W. 2006. *Mikroba Endofit, Sumber Penghasil Antibiotik yang Potensial*. Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Rahaweman, A.C. 2016. *Aktivitas Antibakteri dan Isolasi Fraksi Aktif Kapang Endofit Makroalga Chlorophyta dan Phaeophyta* [Tesis]. Program Studi Teknologi Hasil Perairan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Stackebrandt, E. dan Goebel, B. 1995. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**: 846-849.
- Tan, R. X. dan Zou, W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Product Reports*. **18**: 448-459.
- Winarno, F. G. 1996. *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*. Pustaka Sinar Harapan, Jakarta.
- Zainuddin dan Malina. 2009. *Skrining rumput laut asal Sulawesi Selatan sebagai antibiotik melawan bakteri patogen pada ikan* [Laporan Penelitian].