

ACTIVITY TEST OF MARINE ORGANISMS EXTRACT AND FRACTION OF *Aaptos Aaptos* SPONGE AGAINST *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus*

UJI AKTIVITAS EKSTRAK dan FRAKSI ORGANISME LAUT SPONS *Aaptos aaptos* TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Sitti Juliah Nurhamidin¹⁾, Defny S. Wewengkang¹⁾, Elly Juliana Suoth¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi, FMIPA, UNSRAT, Manado 95115

*sittijuliah@gmail.com

ABSTRACT

Aaptos aaptos Sponge is one of the marine biota that is very prospective as a source of natural compounds such as peptides, terpenoids, steroids, acetogenins, alkaloids, cyclic halides and nitrogen compounds. This study aims to determine whether there is antibacterial activity of the extract and fraction of *Sponge Aaptos aaptos* from Manado Bay waters against microbes *Staphylococcus aureus* and *Escherichia Coli*. *Aaptos aaptos* Sponge was extracted with 95% ethanol as solvent, fractionation using partition method with n-hexane, chloroform and methanol as solvent and antibacterial testing using agar diffusion method Kirby Baur. The best antibacterial activity was found in the methanol fraction with an inhibitory power of 18.12 mm against *Escherichia Coli* bacteria, and an inhibitory power of 14.71 mm on *Staphylococcus aureus*. The results of this study indicate that the methanol fraction of the *Aaptos aaptos* Sponge has the ability to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria which can be categorized as strong.

Keywords : *Aaptos aaptos* Sponge, Antibacterial, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

ABSTRAK

Spons Aaptos aaptos merupakan salah satu biota laut yang sangat prospektif sebagai sumber senyawa bahan-bahan alami antara lain peptida, terpenoid, steroid, asetogenin, alkaloid, halida siklik dan senyawa nitrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi *Spons Aaptos aaptos* dari perairan Teluk Manado terhadap mikroba *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Spons Aaptos aaptos* diekstraksi dengan pelarut etanol 95%, fraksinasi menggunakan metode partisi dengan pelarut n-heksan, kloroform dan metanol dan pengujian antibakteri menggunakan metode difusi agar Kirby Bauer. Aktivitas antibakteri paling baik terdapat pada fraksi metanol dengan daya hambat sebesar 18,12 mm menghambat bakteri *Escherichia coli*, dan daya hambat sebesar 14,71 mm pada *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi metanol *Spons Aaptos aaptos* memiliki kemampuan menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang dapat dikategorikan kuat.

Kata Kunci: *Spons Aaptos aaptos*, Antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Laut menutupi 71% dari permukaan bumi, oleh karena itu sangat banyak potensi yang bisa diambil dari laut seperti sumber makanan, zat warna, kosmetik bahkan obat-obatan. Pemanfaatan organisme laut banyak digunakan sebagai sumber senyawa obat baru. Hal ini disebabkan oleh kemampuan organisme laut seperti tumbuhan dan invertebrata laut dalam memproduksi senyawa kimia yang mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi dengan struktur kimia yang khas (Sayed *et al.*, 2001).

Spons adalah hewan metazoa multiseluler, yang tergolong ke dalam filum porifera, yang memiliki perbedaan struktur dengan metazoa lainnya. Hal ini disebabkan seluruh tubuh Spons terbentuk dari sistem pori saluran dan ruang-ruang sehingga air dapat dengan mudah mengalir keluar dan masuk secara terus menerus (Kozloff, 1990).

Spons *Aaptos aaptos* mempunyai nilai ekonomis karena Spons dari genus yang dapat menghasilkan senyawa khusus yaitu aaptamine yang dapat digunakan dalam bidang farmasi. Spons laut ini terbagi atas dua bagian yaitu secara eksternal berwarna ungu kemerahan dan secara internal kuning kecoklatan. Pada specimen intertidal, permukaannya berisi butiran butiran yang kecil, berkulit, atau halus sedangkan specimen sublitoral kelihatan seperti bongkahan-bongkahan tidak beraturan. Mempunyai tekstur tubuh yang kuat tetapi dapat ditekan. Dimensi tubuhnya mempunyai ukuran tinggi 1.0 – 9.0 cm, lebar 4.2 – 4.8 cm, ketebalan dapat mencapai 1.2 cm. Oskulanya kecil dan melimpah, yang terdapat dibagian tengah apical pada Spons dengan diameter 3.0 – 4.0 mm. Rangkanya tersusun secara radial dengan sistem spikula yang kuat (Bergquist, 1968). Spons *Aaptos aaptos* yang menghasilkan seperti metabolit sekunder seperti mengandung senyawa-senyawa bioaktif potensial, seperti antibakteri. Senyawa-senyawa tersebut telah dibuktikan memiliki aktivitas sebagai anti tumor, sehingga potensial sebagai sumber obat-obatan baru (Pelletier *et al.*, 1987).

Antibakteri merupakan zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu

metabolisme mikroba yang merugikan. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel, menghambat ketahanan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Dwidjoseputro, 1980).

Salah satu zat antibakteri yang banyak dipergunakan adalah antibiotik. Antibiotik adalah senyawa kimia khas yang dihasilkan atau diturunkan oleh organisme hidup termasuk struktur analognya yang dibuat secara sintetik, yang dalam kadar rendah mampu menghambat proses penting dalam kehidupan satu spesies atau lebih mikroorganisme (Siswando dan Soekardjo, 1995). Menurut penelitian Sitti (2019), hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak kasar dan fraksi dari Spons *Aaptos aaptos* memiliki aktivitas antimikroba karena mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji *Staphylococcus aureus* dengan zona hambat yang dapat dikategorikan kuat. Nilai rata-rata dari aktivitas antimikroba ekstrak kasar etanol adalah 20,32 mm dengan kategori kuat, untuk fraksi kloroform 13,28 mm dengan kategori sedang dan fraksi metanol 18,48 mm dengan kategori kuat.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2021 – Juni 2021 di laboratorium penelitian lanjut Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang menggunakan metode eksperimental laboratorium yang menguji aktivitas antimikroba dari ekstrak dan fraksinasi Spons *Aaptos aaptos*.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu masker, sarung tangan, pisau, gunting, telenan, Scuba Diving, kantong plastik, Erlenmeyer (*Pyrex*), corong pisah, gelas kimia (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), oven, timbangan analitik, cawan petri, autoklaf, pinset, *magnetic steerer*, pipet tetes, mikro tubes, batang

pengaduk, *Laminar Air Flow* (Clean Bench), lemari pendingin, incubator (*N-biotek*), mikropipet, digital caliper, kertas label dan kamera untuk keperluan dokumentasi.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu Spons *Aptos aptos*, bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etanol 95%, akuades, methanol, n-heksan, khloroform, pepton, natrium klorida, media agar B1 (*beef extract*), Kloramfenikol, kertas cakram, label, spidol permanen, tissue, aluminium foil, kertas saring, dan sarung tangan.

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari teluk Manado. Sampel diambil dengan menggunakan alat bantu (*Scuba diving*). Setelah sampel diambil kemudian dimasukkan dalam kantong plastik jepit yang sudah di siapkan dan di simpan dalam kotak pendingin lalu dibawah ke Laboratorium Farmasi Lanjut Program Studi Farmasi Universitas Sam Ratulangi Manado.

Preparasi Sampel

Spons *Aptos aptos* yang sudah diambil dibersihkan, lalu dipotong kecil-kecil dan langsung dimasukkan kedalam botol yang berisi pelarut etanol 95%. Selanjutnya sampel difoto dan diberi label serta nomor sampel, untuk selanjutnya sampel tersebut diekstraksi menggunakan metode maserasi selama 24 jam dan diulangi sebanyak 3x (3x24).

Ekstraksi

Sampel Spons *Aptos aptos* 380 g diekstraksi menggunakan metode maserasi. Sampel dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan kedalam botol dan digunakan pelarut yang digunakan yaitu etanol 95%. Metode ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel dengan larutan etanol 95% selama 3x24 jam. Hasil dari maserasi disaring agar mendapatkan hasil filtratnya yang baik, kemudian hasil dari filtrat yang didapatkan dari 3 kali pengulangan diupkan sehingga menghasilkan ekstrak kental dari sampel, lalu tuangkan ke cawan petri dan masukan ke dalam

oven untuk dikerjakan dan mendapatkan ekstrak kasar dari sampel Spons *Aptos aptos*. Selanjutnya ekstrak etanol kasar Spons *Aptos aptos* digunakan dalam fraksinasi dan pengujian antibakteri.

Fraksinasi

Ekstrak Spons *Aptos aptos* sebanyak 14 g yang diperoleh dimasukkan kedalam erlenmeyer, kemudian sebanyak 200 mL dilarutkan dengan metanol 80%. Setelah larut, ditambahkan pelarut n-heksana sebanyak 200 mL dan dimasukkan kedalam corong pisah. Setelah itu dikocok dalam corong pisah sampai homogen dan biarkan hingga terbentuk lapisan metanol dan lapisan n-heksan. Masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda dan diberi kertas label. Lapisan n-heksan selanjutnya dievaporasi menggunakan oven hingga kering, lalu ditimbang dan diperoleh ekstrak fraksi n-heksan sebanyak 1,49 g. Setelah itu tambahkan akuades 100 mL pada lapisan metanol, lalu dipartisi dengan pelarut kloroform dengan perbandingan 1:1 v/v dalam corong pisah dikocok sampai homogen lalu biarkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan metanol dan lapisan kloroform. Masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda. Lapisan kloroform selanjutnya dievaporasi menggunakan oven hingga kering lalu ditimbang dan diperoleh fraksi kloroform sebanyak 0,36 g. Lapisan metanol dievaporasi menggunakan oven hingga kering lalu ditimbang dan diperoleh fraksi metanol sebanyak 10,04 g. Ketiga fraksi yang diperoleh digunakan dalam pengujian antibakteri dan dihitung nilai rendemen dari masing-masing fraksi dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat hasil ekstrak}}{\text{Berat ekstrak awal}} \times 100\%$$

Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian aktivitas antimikroba ini disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama ± 15 menit pinset, L-glass, dan jarum ose di bakar di atas api langsung (Pembakar spiritus) (Waluyo, 2009)

Pembuatan Media Cair B1

Pepton 0,5g , ekstrak daging (*meat extract*) 0,3 g, Natrium klorida 0,3g , dan aquades sebanyak 100 mL aduk sampai rata, kemudian dibuat homogen menggunakan *magnetic stirrer* lalu diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dipipet 1 mL media cair B1, kemudian masukkan dalam tabung reaksi dan tutup dengan aluminium foil. Media cair B1 siap digunakan sebagai media kultur bakteri (Ortez, 2005).

Kultur B1 bakteri Uji

Bakteri yang akan digunakan yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Media cair B1 yang sudah disiapkan, ditambahkan dengan masing-masing bakteri yang sudah dikultur sebanyak 100 µL, media yang telah padat ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* agar bebas terkontaminasi dan diinkubasi dalam inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37°C (Ortez, 2005).

Pembuatan Kontrol Negatif dan Positif

Pengujian antimikroba ini dengan kontrol positif yang digunakan yaitu *kloramfenikol paper disc*. Kontrol negatif dalam penelitian yaitu menggunakan pelarut metanol yaitu dengan cara membuat larutan stok metanol sebanyak 200 µL metanol lalu ditotolkan pada kertas cakram.

Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dibuat dengan menggunakan cara melarutkan ekstraksi dan fraksinasi Spons *Aaptos aaptos* dengan konsentrasi 250 µg/50 µL yaitu dengan membuat larutan stok, dengan cara ekstrak kasar etanol ditimbang sebanyak 0,0250 g, kemudian dilarutkan dalam 5 mL metanol. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk fraksi n-heksana, fraksi metanol, dan fraksi kloroform.

Pembuatan Media Agar B1

Pepton 0,5 g, ekstrak daging (*meat extract*) 0,3 g, natrium klorida 0,3, agar 1,5 g dan aquades sebanyak 100 mL diaduk sampai rata kemudian dibuat homogen menggunakan *magnetic stirrer* lalu diautoklaf pada suhu 121°C

selama 15 menit. Media agar B1 siap digunakan untuk uji aktivitas antibakteri (Ortez, 2005).

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan yaitu Metode Difusi (*Disc Diffusion Kirby and Bauer*). Dengan pengujian aktivitas antimikroba ini cakram (*paper disc*) yang digunakan berukuran 6 mm dengan daya serap 50 µL pada tiap cakram. Sampel yang telah ditentukan konsentrasinya (250 µg/50 µL) ditotolkan pada masing-masing cakram dengan menggunakan mikropipet. Media agar B1 yang sudah diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian di dinginkan sampai suhu 40°C. Media agar B1 dituangkan ke cawan petri, kemudian bakteri yang telah dikultur dalam tabung reaksi diambil sebanyak 100 µL, lalu dipipet dan diinokulasi pada media agar B1 dan tunggu sampai media B1 mengeras. Masing-masing cawan petri diberi label dan nomor sampel yang sesuai. Letakkan kertas cakram yang telah ditotolkan sampel uji spons *Aaptos aaptos* kedalam cawan petri menggunakan pinset lalu diinkubasi selama 1x24 jam (Ortez, 2005).

Pengamatan dan Pengukuran Zona Hambat

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan masa inkubasi. Daerah pada sekitar cakram menunjukkan kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) menggunakan *digital caliper* dengan cara diukur diameter total zona bening cakram. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya (Fridly, 2014)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pengujian aktivitas antimikroba dari Spons *Aaptos aaptos* dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* mewakili bakteri Gram negatif, bakteri *Staphylococcus aureus* yang mewakili bakteri Gram positif menggunakan metode difusi agar (difusi *Kirby-Bauer* yang telah dimodifikasi). Hasil disajikan pada tabel 1 dan 2.

Pembahasan

Pengujian ini menggunakan metode difusi agar dengan cara kertas cakram yang berisi senyawa antimikroba diletakkan pada media pada yang telah diinokulasi bakteri. Senyawa antimikroba akan berdifusi ke dalam media padat yang diinokulasikan bakteri sehingga menghambat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terbentuknya daerah jernih di sekeliling kertas cakram (Brooks *et al.*, 2005).

Metode difusi digunakan karena prosedurnya yang sederhana, mudah dan praktis untuk dikerjakan dan dapat melihat sensitivitas berbagai jenis mikroba terhadap antimikroba (Mpila, 2012). Penggunaan mikroba hal ini bertujuan melihat apakah ekstrak dan fraksi Spons *Aaptos aaptos* memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroba patogen pada tubuh manusia dan untuk mengetahui spektrum dari aktivitas antimikroba Spons *Aaptos aaptos* memiliki spektrum luas (membunuh banyak jenis mikroba) atau spektrum sempit (membunuh salah satu mikroba) (Tunggali, 2019).

Hasil yang diperoleh dalam uji aktivitas antimikroba dilakukan pengamatan setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan 3 kali pengulangan pada masing-masing bakteri. Aktivitas yang terbentuk terlihat dari adanya zona hambat (zona bening) disekitaran cakram dengan ukuran cakram (*paper disc*) 6 mm, membuktikan bahwa ekstrak dan fraksi Spons *Aaptos aaptos* yang diujikan menunjukkan kepekaan terhadap masing-masing mikroba dan antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif.

Konsentrasi yang digunakan yaitu 250 µg dalam setiap kertas cakram yang memiliki daya serap 50 µg dari sampel Spons *Aaptos aaptos* terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dari ekstrak etanol, fraksi n-Heksan, fraksi kloroform, dan fraksi metanol terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ditunjukkan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil pengujian ekstrak fraksi Spons *Aaptos aaptos* terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*

Ulangan	Diameter zona hambat (mm) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>					
	Ekstrak EtOH	Fraksi N-Hexana	Fraksi CHCl ₃	Fraksi MeOH	Kontrol (+)	Kontrol (-)
I	15,14	11,01	13,59	15,39		
II	15,13	10,30	14,84	14,83		
III	14,75	9,81	14,21	13,91	40,32	0
Total	45,02	31,12	42,64	44,13		
\bar{X}	15,00	10,37	14,21	14,71		

Tabel 2. Hasil pengujian ekstrak fraksi Spons *Aaptos aaptos* terhadap bakteri uji *Escherichia coli*

Ulangan	Diameter zona hambat (mm) terhadap <i>Escherichia coli</i>					
	Ekstrak EtOH	Fraksi N-Hexana	Fraksi CHCl ₃	Fraksi MeOH	Kontrol (+)	Kontrol (-)
I	12,43	8,71	11,66	18,40		
II	12,71	9,21	11,65	18,38	33,53	0

III	11,67	8,19	11,47	17,58
Total	36,81	26,11	34,78	54,36
\bar{X}	12,27	8,70	11,59	18,12

Hasil pengukuran diameter zona hambat digolongkan berdasarkan klasifikasi zona hambat menurut (Davis and Stout) yaitu meliputi respon lemah dengan diameter 5 mm, respon sedang dengan diameter 5-10 mm, respon kuat dengan diameter 10-20 mm, dan respon sangat kuat dengan diameter >20 mm.

Kontrol negatif yang digunakan yaitu metanol, terlihat dari hasil yang diperoleh metanol tidak menunjukkan adanya zona hambat pada pengujian yang dilakukan pada masing-masing mikroba uji. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wewengkang *et al.*, (2014) dan Mujipradhana, (2018) membuktikan bahwa kontrol negatif metanol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antimikroba, sehingga daya hambat yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh pelarut melainkan karena aktivitas senyawa yang ada dalam Spons *Aaptos aaptos*. Kontrol positif yang digunakan yaitu kloramfenikol. Kloramfenikol dipilih karena merupakan antibiotik berspektrum luas. Kloramfenikol memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap bakteri uji dibandingkan ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi metanol. Diameter zona bening yang dihasilkan kloramfenikol pada *Staphylococcus aureus* sebesar 40,32 mm sedangkan pada *Escherichia coli* sebesar 33,53 mm.

Hasil ekstrak kasar kasar etanol, fraksi kloroform , fraksi metanol dan fraksi N-heksan pada Spons *Aaptos aaptos* dari semua mikroba uji yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, terlihat yang memberikan daya hambat yang paling besar terdapat pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan jumlah 15,00 mm dengan kategori kuat, fraksi kloroform 14,21 mm dengan kategori kuat, fraksi metanol 14,71 mm dengan kategori kuat, dan fraksi N-heksan 10,37 mm dengan kategori kuat. Sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* terlihat memberikan daya hambat pada ekstrak etanol

sebesar 12,27 mm dengan kategori kuat, fraksi kloroform 11,59 mm dengan kategori kuat, fraksi metanol 18,12 mm dengan kategori kuat dan fraksi N-heksan 8,70 mm dengan kategori sedang. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi dari Spons *Aaptos aaptos* memiliki daya hambat yang lebih peka pada *Staphylococcus aureus* dibanding *Escherichia coli*. Bakteri Gram positif cenderung lebih sensitif terhadap antimikroba, karena struktur dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana dibandingkan struktur dinding sel bakteri Gram negatif sehingga memudahkan senyawa antimikroba untuk masuk kedalam sel bakteri Gram positif (Murniasih, 2003).

KESIMPULAN

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak kasar dan fraksi dari Spons *Aaptos aaptos* memiliki aktivitas antimikroba karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan aktivitas yang paling terjadi pada fraksi metanol dengan daya hambat sebesar 18,12 mm menghambat bakteri *Escherichia coli*, dan daya hambat sebesar 14,71 mm menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* yang dapat dikategorikan kuat.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa apa yang efektif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli* yang ada pada fraksi metanol.

DAFTAR PUSTAKA

Bergquist, P.R. 1968. The Marine Fauna of New Zealand: Porifera, Demospongiae, Part 1 (Tetractinomorpha and Lithistida). New Zealand Department of Scientific and Industrial Research. New Zealand Oceanographic Institute Memoirs.

- Brooks, G. L., Butel, J.S., Morse, S.A. 2005. Mikrobiologi Kedokteran Ed. 23, Translation of Medical Microbiology, 23th Ed. Alih Bahasa oleh Hartanto, Salemba Medika, Jakarta.
- Dwidjoseputro, D. 1980. Pengantar Fisiologi Tumbuhan. Gramedia, Jakarta.
- Davis, W.W and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. Microbiology. Vol. 22 No (4).
- Sayed E, Mohamed AG, Noval L, Mahfouz A, Zeid HA. 2001. Malnutrition Among Pre-School Children in Alexandria, Egypt. Journal Health Popular Nutrition. Centre for Health and Population Research. Vol. 19 No (4).
- Fridly M, Defny SW, Frenly W. 2014. Aktivitas Antibakteri Dan Karakterisasi Senyawa Spons Haliclona sp. Yang Diperoleh Dari Teluk Manado. Jurnal Ilmiah. PHARMACON. Farmasi UNSRAT. Vol.3 No (4).
- Kozloff, EN. 1990. Invertebrates. Saunders College Publishing.
- Mpila, D. A. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus benth*) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomas aeruginosa* Secara Invitro [Skripsi]. Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Murniasih, T. 2003. Metabolit Sekunder Dari Spons Sebagai Bahan Obat-Obatan. *Oseana*. Vol 28 No. (3).
- Mujihradana, V., Defny, W., Edi, S. 2018. Aktivitas antimikroba dari ekstrak ascidian herdmania momus pada mikroba patogen manusia. Jurnal Ilmiah Farmasi. Vol. 7 No (3).
- Ortez, J.H. 2005. *Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Marie B. Coyle (Coord.Ed). American Society for Microbiology.
- Pelletier JC, Cava MP. 1987. Synthesis of marine alkaloids aaptamine and demethoxyaaptamine of the parent structure didemethoxyaaptamine. J Org Chem . 52: 616-622.
- Siswando dan Soekardjo, B. 1995. Kimia Medisinal. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tunggali SN., Simbala H., Rotinsulu H. 2019. Uji Daya Hambat Ekstrak Dan Fraksi Spons *Aaptos aaptos* Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah. PHARMACON. Farmasi UNSRAT. Vol 8 No (1).
- Wewengkang, D., Deiske. S., Hengki. R. 2014. Karakterisasi dan Bioaktif Antibakteri Senyawa Spons *Haliclona* sp. Dari Teluk Manado. Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi. Vol 1 No (1).
- Waluyo, L. 2009. *Teknik dan Metode Dasar Mikrobiologi*. UMM, Malang.