

POTENSI ANTIMIKROBA PROTEIN BIOAKTIF DARI BAKTERI SIMBION ALGA COKLAT *Sargassum* sp. ASAL PERAIRAN PULAU LAE-LAE

Sartika, Ahyar Ahmad, dan Hasnah Natsir
Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Hasanuddin
Kampus UNHAS Tamalanrea, Makassar 90245

ABSTRAK

Penelitian untuk mempelajari potensi antimikroba fraksi protein dari bakteri *Enterobacter agglomerans* simbion alga coklat *Sargassum binderi* yang dikumpulkan dari Pulau Lae-lae, Sulawesi Selatan telah dilakukan. Senyawa Protein diisolasi menggunakan metode fraksinasi ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20 %, 20-40 %, 40-60 % dan 60-80 %. Protein dimurnikan dengan metode dialisis menggunakan membran selofan. Uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar menggunakan *paper disc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua fraksi protein dari bakteri *Enterobacter agglomerans* yang diisolasi menunjukkan adanya senyawa protein bioaktif yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Fraksi protein 0-20 % memiliki daya hambat terbesar terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat masing-masing sebesar 10,00 mm dan 11,39mm.

Kata Kunci: Alga, Antimikroba, *Enterobacter agglomerans*, Fraksi Protein.

PENDAHULUAN

Infeksi oleh mikroba patogen terus mengalami peningkatan seiring munculnya kasus mikroba patogen yang resisten terhadap antibiotik, misalnya *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, dan *Morganella spp.* banyak ditemukan resisten terhadap antibiotik penisilin, oksasilin dan β -laktam (Mardiastuti dkk., 2007). Kondisi tersebut memacu pencarian sumber bahan antimikroba baru yang dapat menghambat dan membunuh bakteri-bakteri patogen (Tinambunan dkk., 2012).

Biota laut dalam beberapa tahun terakhir ini menjadi target pencarian bahan antibiotik. Beberapa diantaranya telah dilaporkan mengandung berbagai jenis senyawa dengan bioaktivitas yang berbeda-beda mulai dari antibakteri, antifungi, antikanker dan sebagainya (Arifuddin dkk., 2001; Trianto dkk., 2004).

Alga merupakan salah satu biota laut yang melimpah di perairan Indonesia, termasuk Sulawesi Selatan. Beberapa jenis alga telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba terutama dari kelompok alga coklat *Sargassum* dan *Turbinaria* (Salem dkk., 2011; Arifuddin dkk., 2001). Pengolahan jenis alga tersebut menghasilkan ekstrak berupa senyawa alginat yang banyak dimanfaatkan dalam pembuatan obat antibakteri, pengobatan kanker serta menurunkan kadar kolestrol dalam darah (Rachmat, 1999). *Sargassum* sp. memiliki kandungan bahan kimia utama antara lain alginat, protein, vitamin C, tanin, iodin dan fenol sebagai obat gondok, antibakteri, dan tumor (Trono dan Ganzon, 1988 dalam Kadi, 2005). Alga coklat juga memiliki kandungan nutrisi protein yang bervariasi. Kisaran nilai protein adalah sebesar 7–16 gram/100 gram berat kering. Protein alga coklat mengandung semua jenis asam amino esensial yaitu lisin, fenil alanin,

metionin, leusin dan valin (Ortiz dkk., 2006; Dawczynski dkk., 2007). Aktivitas antimikroba senyawa protein dari alga coklat juga telah diteliti. Arifuddin dkk (2001), melaporkan bahwa fraksi protein 40-60 % dari alga coklat *Sargassum echinocarpum* J.G Agardh dan *Turbinaria decurrens* bory efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan diameter hambat > 14 mm.

Pemanfaatan alga telah banyak dikenal luas sehingga adanya eksploitasi tanpa budidaya akan menyebabkan kepunahan jenis-jenis tertentu. Karena itu, pemanfaatan bakteri simbiosis alga adalah salah satu solusi yang paling baik (Nurhaedar, 2008).

Beberapa bakteri laut telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba, khususnya bakteri yang bersimbiosis dengan organisme lain. Menurut Nofiani (2008), bakteri tersebut memiliki kemampuan yang hampir sama dengan inangnya untuk menghasilkan senyawa bioaktif. Misalnya *Bacillus* yang diisolasi dari beberapa jenis alga coklat memiliki aktivitas antimikroba (Kanagasabhapathy dkk., 2006).

Sejauh ini belum banyak data penelitian yang mengeksplorasi senyawa protein bioaktif dari bakteri simbiosis alga coklat sebagai bahan baku obat. Penggunaan senyawa protein sebagai bahan obat memiliki beberapa keunggulan diantaranya dapat diterima baik oleh tubuh dan menyebabkan sedikit efek samping (Huang, 1999) serta kelompok senyawa protein dapat dikloning gennya sehingga dapat diproduksi secara besar-besaran pada skala industri melalui teknik rekayasa genetika (Arifuddin dkk., 2001).

Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri simbiosis alga coklat penghasil senyawa antimikroba. Isolat yang memiliki aktivitas tertinggi kemudian dikultur dalam media fermentasi untuk produksi protein bioaktif dan dilakukan ekstraksi, fraksinasi dan dialisis. Aktivitas antimikroba fraksi protein diuji dengan metode difusi agar.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga coklat *Sargassum* sp. (*Sargassum binderi* dan *Sargassum polycystum*), biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, media *Nutrien Broth* (NB), media *Nutrien Agar* (NA), media *Muller Hilton Agar* (MHA), *BSA (Bovine Serum Albumin)*, NaCl fisiologis, buffer A (Tris (hidroksimetil) amino metana 0,1 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M), buffer B (Tris (hidroksimetil) amino metana 0,01 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M), lowry A, Lowry B, amonium sulfat, kantong selofan, dan air laut.

Metode

Penyegaran Sampel dalam Media Nutrient Broth

Bagian Permukaan Alga

Sebanyak 15 gram sampel alga dibilas dengan 30 mL air laut steril. Kemudian air bilasan dimasukkan ke dalam 30 mL media NB lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam.

Bagian dalam Alga

Sebanyak 15 gram sampel alga dibilas dengan 30 mL air laut steril. Kemudian alga yang telah dibilas digerus hingga halus menggunakan mortal dan ditambahkan air laut steril. Suspensi lalu dimasukkan ke dalam 30 mL media NB dan dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam.

Isolasi Bakteri Simbiosis Penghasil Senyawa Antimikroba

Sampel yang telah disegarkan pada media NB diencerkan secara bertingkat yaitu 10⁻¹-10⁻⁵. Setelah itu, masing-masing pengenceran ditumbuhkan pada media NA pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam. Bakteri penghasil senyawa antimikroba ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Selanjutnya koloni dengan zona bening yang stabil diambil dan digores beberapa kali dengan metode kuadran hingga diperoleh koloni tunggal.

Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Untuk mengetahui kemampuan isolat-isolat bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dilakukan ujiantang langsung secara kualitatif (modifikasi Marinho dkk., 2009), dengan cara menggores atau menotolkan isolat pada permukaan media yang telah disebarkan dengan bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*). Kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang membentuk zona bening dengan aktivitas tertinggi setelah tiga kali pengulangan dipilih untuk penelitian selanjutnya.

Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Isolat bakteri dengan aktivitas antimikroba terbesar diidentifikasi. Identifikasi dilakukan dengan cara pewarnaan gram dan uji biokimia sederhana meliputi uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfid Indol Motility*), uji fermentasi gula-gula, sitrat, urea, dan VP-MR (*Methyl Red-Vogel Proskaur*).

Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein Bioaktif

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media NB steril pada suhu 37 °C di atas mesin goyang (shaker) selama ± 4 hari. Kemudian dilakukan sampling setiap 12 jam untuk mengukur *optical density* (OD) dan kadar proteinnya.

Isolasi dan Pemurnian Protein Bioaktif

Media produksi yang mengandung kultur dipanen dengan disentrifugasi sehingga diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing: 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, dan 60-80 %.

Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dalam sejumlah buffer A, dan selanjutnya didialisis dalam buffer B menggunakan kantong selofan sampai larutan buffernya tidak berubah warna.

Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein pada setiap fraksi menggunakan metode Lowry dengan bovine serum albumin (BSA) sebagai larutan standar.

Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian daya hambat protein bioaktif terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi agar. *Paper disc* yang mengandung Protein bioaktif diletakkan pada permukaan media MHA yang berisi 0,5 mL bakteri uji. Selanjutnya diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 37 °C lalu diamati dan diukur zona hambatannya dengan mistar geser.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri

Pada penelitian ini diperoleh 16 isolat bakteri penghasil senyawa antimikroba yang diisolasi dari dua jenis alga coklat *Sargassum* sp. koleksi pulau Lae-lae., yaitu 6 isolat dari bagian permukaan alga dan 10 isolat dari bagian dalam alga.

Berdasarkan hasil ujiantang langsung, 5 isolat bakteri dari bagian permukaan alga dan 8 isolat bakteri dari bagian dalam alga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen.

Isolat bakteri simbiosis pada alga yang memiliki aktivitas antimikroba cukup melimpah. Keberadaan bakteri tersebut diduga sebagai akibat dari bentuk simbiosis mutualisme. Alga menyediakan tempat dan nutrisi yang dibutuhkan bakteri, sedangkan bakteri mendorong pertumbuhan dan melindungi permukaan alga terhadap patogen (Hollants dkk., 2012).

Isolat bakteri yang berasal dari bagian dalam memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan isolat bakteri yang berasal dari bagian permukaan. Menurut Abubakar dkk. (2011), bakteri simbiosis yang berasal dari bagian dalam umumnya memiliki populasi yang berlimpah dan merupakan mikroba yang spesifik karena secara langsung berinteraksi

dengan senyawa bioaktif yang dihasilkan dari dalam alga. Sedangkan bakteri simbiosis yang berasal dari permukaan memiliki populasi yang lebih sedikit diduga karena membutuhkan daya pertahanan yang lebih tinggi untuk mengatasi patogen dan predator yang berada di sekitar alga.

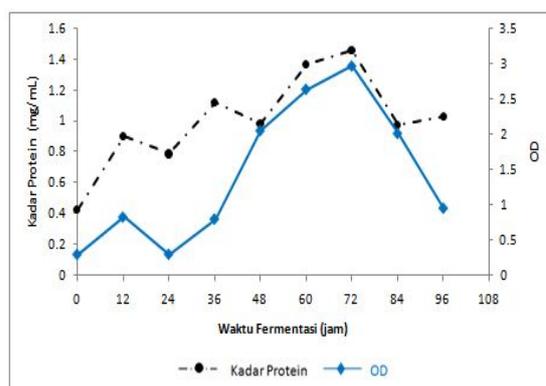
Berdasarkan kestabilan zona bening yang terbentuk terhadap bakteri uji setelah tiga kali pengujian, maka untuk penelitian selanjutnya isolat SB 5(1) yang diisolasi dari bagian dalam alga coklat *Sargassum binderi* digunakan sebagai isolat terpilih untuk identifikasi dan isolasi protein bioaktif. Karakteristik isolat SB 5(1) terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi isolat bakteri SB 5(1)

Pengujian		Hasil
Pewarnaan Gram	Bentuk Gram	Batang Negatif
	TSIA	+
		+
		-
SIM	H ₂ S	-
	Gas	+
	Indol	-
MR-VP	Motility	+
	MR	+
Sitrat	VP	+
		+
Urea		+
Uji Gula-gula	Glukosa	+
	Laktosa	+
	Sukrosa	+
	Mannitol	+

Dari beberapa pengujian yang telah dilakukan baik itu pewarnaan gram maupun uji biokimia sederhana, isolat SB 5(1) menunjukkan ciri-ciri yang mengarah ke bakteri *Enterobacter agglomerans*. Kelompok bakteri *Enterobacter* ternyata telah dilaporkan sebagai bakteri simbiosis pada beberapa jenis biota laut. Hasil penelitian menemukan adanya bakteri simbiosis *Enterobacter* sp. pada alga hijau dan spons yang memiliki aktivitas antimikroba (Gopi, 2011; Suryadi dkk., 2012).

Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein Bioaktif



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri dan kadar protein.

Protein yang disekresi oleh bakteri menunjukkan peningkatan seiring lamanya waktu fermentasi. Dari grafik dapat terlihat bahwa kadar protein dari jam ke-0 sampai jam ke-60 mengalami peningkatan. Pada jam ke-72 diperoleh nilai kadar protein tertinggi sebesar 1,462 mg/mL dan pada jam ke-84 sampai jam ke-96 terjadi penurunan kadar protein. Hal ini sesuai dengan laju pertumbuhan bakteri dimana pertumbuhan bakteri paling banyak pada jam ke-72 sehingga sekresi protein pun semakin besar.

Ekstraksi dan Isolasi Protein Bioaktif

Ekstraksi dan isolasi protein bioaktif dari bakteri *Enterobacter agglomerans* menggunakan prosedur dari metode sebelumnya yang telah dimodifikasi (Maya., 2011). Media produksi yang mengandung kultur disentrifugasi untuk memperoleh supernatan yang mengandung ekstrak kasar protein.

Selanjutnya ekstrak kasar difraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20 % (F1), 20-40 % (F2), 40-60 % (F3), dan 60-80 % (F4). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan perbedaan kelarutannya di dalam air. Endapan protein dari masing-masing fraksi kemudian dilarutkan dengan sejumlah buffer A dan didialisis dalam buffer B menggunakan kantong selofan sampai larutan buffernya tidak berubah warna. Dialisis

bertujuan untuk menghilangkan senyawa kecil dan kelebihan garam amonium sulfat yang turut mengendap bersama dengan protein. (Lehninger, 1993).

Adapun kadar protein dari masing-masing fraksi baik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar protein dari masing-masing fraksi

No	Fraksi Protein	Volume Setiap Fraksi (mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Total protein (mg)
1	0-20 %	9	1,002	9,018
2	20-40 %	9	0,387	3,483
3	40-60 %	8,5	0,437	3,715
4	60-80 %	8,5	0,693	5,891

Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar protein pada tiap fraksi berbeda-beda dengan kadar tertinggi ditemukan pada fraksi 0-20 % sebesar 1,002 mg/mL. Dari data tersebut dapat diduga bahwa fraksi protein yang memiliki kadar protein tertinggi merupakan jenis protein yang kelarutan rendah dalam air.

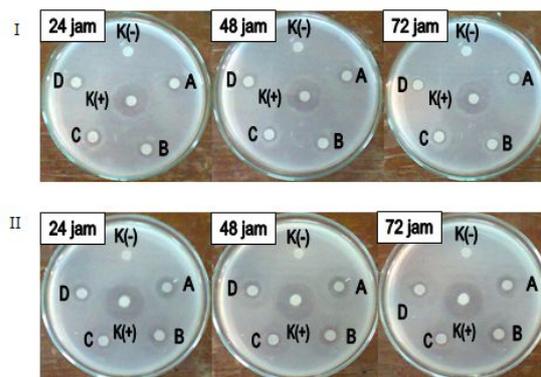
Uji Antimikroba Fraksi Protein dari Bakteri *Enterobacter agglomerans*

Berdasarkan data pada Tabel 3, semua fraksi protein umumnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar *paper disc* yang membuktikan bahwa bakteri simbiosis alga *Enterbacter agglomerans* mengandung senyawa protein yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Tabel 3. Diameter hambatan rata-rata dari fraksi protein bakteri *Enterobacter agglomerans*

No	Fraksi Protein	Rata-rata Diameter Hambatan (mm)					
		<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
		24 jam	48 jam	72 jam	24 jam	48 jam	72 jam
1	0-20 %	10,00	9,55	9,10	11,39	11,20	10,31
2	20-40 %	9,70	9,30	8,87	11,25	11,11	10,18
3	40-60 %	9,54	8,94	8,64	8,77	8,60	7,96
4	60-80 %	9,49	9,26	8,00	9,45	9,23	9,10
5	Kontrol (+)	19,80	19,70	19,61	20,13	21,99	22,10
6	Kontrol (-)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00

Zona hambatan yang terbentuk pada fraksi protein terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara visual dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diameter zona hambatan fraksi protein terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* (I) dan *Staphylococcus aureus* (II) pada masa inkubasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam

Aktivitas antimikroba terbesar terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada masa inkubasi 1x 24 jam terdapat pada fraksi 0-20 % dengan diameter zona hambatan masing-masing sebesar 10,00 mm dan 11,39 mm. Sedangkan kontrol positif untuk masing-masing bakteri uji menunjukkan diameter zona hambatan sebesar 19,80 mm dan 20,13 mm.

Setelah masa inkubasi 3 x 24 jam, terjadi penurunan diameter zona hambatan terhadap bakteri *Escherichie coli* dan *Staphylococcus aureus* pada semua fraksi protein. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa protein bioaktif yang terkandung dalam semua fraksi tersebut bersifat bakteriostatik yaitu hanya dapat menghambat bakteri, tidak untuk mematikannya karena protein yang aktif telah habis. Menurut Wattimena (1991), suatu antimikroba dikatakan bakteriostatik jika antimikroba tersebut berkhasiat untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji dan tidak mematikan kuman hingga dalam waktu 48 jam daerah hambatan kembali ditumbuhi bakteri, dengan demikian terjadi penurunan diameter hambatan pada bakteri tersebut.

Secara umum, semua fraksi protein menunjukkan kemampuan yang kurang

efektif dalam menghambat bakteri patogen, bahkan beberapa fraksi dapat dikatakan tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji, karena menurut (Cappucino dan Sherman, 1992). Suatu bahan antimikroba dinilai efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji apabila memiliki diameter hambatan ≥ 14 mm, sedangkan apabila diameter hambatannya 10-11 mm maka bahan antimikroba tersebut cenderung bersifat kurang efektif dan apabila diameter hambatannya ≤ 9 mm maka bahan antimikroba tersebut dinilai tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Kemampuan fraksi protein dalam menghambat bakteri uji menunjukkan diameter zona hambatan yang jauh lebih kecil dari kontrol positif, hal ini mungkin terjadi karena difusi bahan aktif pada media yang berlangsung lambat dan rendahnya konsentrasi kandungan zat aktif, sehingga fraksi tersebut tidak dapat menghambat bakteri secara optimal (Cappucino dan Sherman, 1992).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Sebanyak 16 isolat bakteri penghasil senyawa antimikroba berhasil diisolasi dari dua jenis alga coklat *Sargassum* sp. yaitu 6 isolat dari bagian permukaan alga dan 10 isolat dari bagian dalam alga.
2. Bakteri yang memiliki aktivitas terbesar terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* berasal dari bagian dalam alga coklat *Sargassum binderi* dan teridentifikasi sebagai bakteri *Enterobacter agglomerans*.
3. Aktivitas antimikroba terbesar terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* terdapat pada fraksi 0-20 % dengan daya hambat masing-masing sebesar 10,00 mm dan 11,39 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abubakar, H., Wahyudi, A. T., dan Yuhana, M., 2011, Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis* sp. sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba, *Ilmu Kelautan*, **16** (1), 35-40.
2. Arifuddin, Patong, R., dan Ahmad, A., 2001, Penelusuran Protein Bioaktif dalam Makro Alga sebagai Bahan Antibakteri dan Antijamur, *Marina Chimica Acta*, **2** (2), 11-18.
3. Cappuccino, J. G., dan Sherman, N., 1992, *Microbiology a Laboratory Manual*, Rockland Community College, Suffern, New York.
4. Dawczynski, C., Schubert, R., and Jahreis, G., 2007, Amino Acids, Fatty Acids, and Dietary Fibre In Edible Seaweed Product, *Food Chemistry*, Friedrich Schiller University of Jena, Institute of Nutrition, Dornburger Strasse 24, D-07743 Jena, Germany, **103**, 891–899.
5. Gopi, M., Kumaran, S., Kumar, T. T. A., Deivasigamani, B., Alagappan, K., dan Prasad, S. G., 2012, Antibacterial Potential of Sponge Endosymbiont Marine *Enterobacter* sp. at Kavaratti Island, Lakshadweep archipelago, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 142-146.
6. Hollants, J., Leliaert, F., De-Clerck, O., dan Willems, A., 2012, What We can Learn from Sushi: A Review on Seaweed-Bacterial Associations, *FEMS Microbiology Ecology*, 1-16.
7. Huang, L. 1999. *Protein dalam Air mata Obat untuk AIDS*, (Online), (<http://www1.rad.net.id/warta/wao4701.htm>, diakses tanggal 06 November 2012).
8. Kadi, A, 2005, Beberapa Catatan Kehadiran Marga *Sargassum* di Perairan Indonesia, Bidang Sumber Daya Laut, Pusat Penelitian Oseaografi-LIPI, Jakarta, **30** (4), 19-29.
9. Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., Yamasaki, S., dan Nagata, S., 2006, Antibacterial Activities of Marine Epibiotic Bacteria Isolated from Brown Algae of Japan, **56** (2), 167-173.
10. Lehninger, A. L., 1993, *Dasar-dasar Biokimia*, Erlangga, Jakarta.
11. Mardiasuti, H. W., Karuniawati, A., Kiranasari, A., Ikaningsih, dan Kadarsih, R., 2007, Emerging Resistance Pathogen: Situasi Terkini di Asia, Eropa, Amerika Serikat, Timur Tengah dan Indonesia,

- Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, **57** (3), 75-79.
12. Marinho, P. R., Paula, A., Moreira, B., Lucia, F., Costa, P., dan Muricy, G., 2009, Marine *Pseudomonas putida*: A Potential Source of Antimicrobial Substances against Antibiotic-Resistant Bacteria, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **104**, 678-682.
 13. Maya, I. S., 2011, *Isolasi dan Karakterisasi Protein Bioaktif dari Alga Merah (Gelidium amansii) dan Alga Hijau (Turbinaria decurrens) sebagai Antibakteri dan Antikanker*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar.
 14. Nofiani, R., 2008, Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut, *Jurnal Natur Indonesia*, **10** (2), 120-125.
 15. Nurhaedar, 2008, Potensi Bakteri Symbion Spongs Class *Demospongiae* sebagai Sumber Senyawa Antimikroba. *Makalah Poster Seminar Nasional Persatuan Biologi Indonesia Ke-XIX*, Universitas Hasanuddin, Makassar.
 16. Ortiz, J., Romer, E., Robert, P., Araya, J., Lopez, J., Bonzo, C., Navarrete, E., Osorio, A., dan Ang Rios, A., 2006. Dietary Fiber, Amino Acid, Fatty Acid and Tocopherol Contents of The Edible Seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea Antarctica*, *Food Chemistry, Santiago, Chile*, **99**, 98-104.
 17. Rachmat, R., 1999, Potensi Alga Coklat di Indonesia dan Prospek Pemanfaatannya, *IFI*, 31-35.
 18. Salem, W. M., Galal, H., dan Nasr E. F., 2011, Screening for Antibacterial Activities In Some Marine ALgae from The Red Sea (Hurghada, Egypt), *African Journal of Microbiology Research*, **5** (15), 2160-2167.
 19. Suryadi, Afni, N., Sari, A. P., dan Sartini, 2012, *Potensi Bakteri Symbion dari Beberapa Ganggang Hijau sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba*, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.
 20. Tinambunan, H., Melki, dan Isnaini, 2012, Efektifitas Ekstrak Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons dan Karang Lunak sebagai Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung, *Maspuri Journal*, **4** (2), 225-230.
 21. Trianto, A., Ambariyanto, dan Murwani, R., 2004, Skrining Bahan Antikanker pada Berbagai Jenis Gorgonian terhadap L1210 *Cell Line*, *Ilmu Kelautan, UNDIP*, **9** (3), 120-124.
 22. Wattimena, 1991, *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*, Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta.