SKRINING BAKTERI SIMBION PADA SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI *Multi Drug Resistant* (MDR)

(Skripsi)

Oleh

DWI PUSPITASARI
NPM 1814221010

FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024

ABSTRAK

SKRINING BAKTERI SIMBION PADA SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI *Multi Drug Resistant* (MDR)

Oleh

DWI PUSPITASARI

Permasalahan resistensi antibiotik mendorong penelitian untuk mencari antibiotik baru salah satunya yang bersumber dari laut. Bakteri yang banyak ditemukan resisten terhadap antibiotik adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Spons memiliki potensi menghasilkan senyawa aktif sebagai bahan baku obat. Pemanfaatan spons yang berlebihan untuk mencari bahan bioaktif yang baru dapat mengakibatkan tindakan yang kurang konservatif yang dapat merugikan sistem ekologi biota laut. Alternatif yang dapat dilakukan adalah penelitian dengan memanfaatkan bakteri simbion spons untuk mencari senyawa agen antibiotik baru. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi dan mengidentifikasi bakteri simbion spons sebagai antibakteri. Penelitian dilakukan pada bulan September 2022-September 2023 di Laboratorium Oseanografi. Spons yang digunakan adalah *Stylissa massa*. Hasil isolat bakteri simbion spons *Stylissa massa* yang potensial yaitu BSP-01 dan BSP-06. BSP-01 memiliki aktivitas antibakteri pada uji pendahuluan terhadap patogen *S. aureus* strain MDR dan *E. coli* strain MDR dengan zona hambat 4,74 mm dan 4,02 mm. BSP-06 memiliki zona hambat terhadap *S. aureus* strain MDR sebesar 5,82 mm dan MDR *E. coli* strain MDR sebesar 4,6 mm. Hasil identifikasi molekuler dari bakteri simbion potensial spons *S. massa* adalah bakteri *Bacillus altitudinis* (BSP-01) dan *Bacillus thuringiensis* (BSP-06).

Kata kunci : Antibiotik, E. coli, Multi drug resisten, S. aureus, Spons

ABSTRACT

SCREENING OF SYMBIONT BACTERIA IN SPONGES AS ANTIBACTERIAL Multi Drug Resistant (MDR)

By

DWI PUSPITASARI

The problem of antibiotic resistance driven research to find out the new antibiotics, that one of them comes from the sea. The bacteria that are highly resistant to antibiotics include *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Sponges have the potential to produce active compounds as raw materials for drugs. The exploitation of sponge as the source of substances can lead to harm the ecological system of marine biota. The alternative approach is to explore the symbiotic bacteria of sponges to discover new antibiotic agents. The aimed of this research are to find out and identify symbiotic bacteria in sponges as antibacterial agents. The study was conducted from September 2022 to September 2023 in the Oceanography Laboratory. The sponge used *Stylissa massa*. The result of this research have been finding two isolated bacteria i.e BSP-01 and BSP-06. Both of isolate showed the activity as anti bacterial to *S. aureus* and *E. coli* by forming the inhibition zone. The inhibition zone formed by isolate BSP-01 were 4,74 mm and 4,02 mm respectively. Meanwhile, the inhibition zones formed by isolate BSP-6 were 5,82 and 4,6 mm respectively. Molecular identification revealed that the potential symbiotic bacteria from *Stylissa massa* sponges were *Bacillus altitudinis* (BSP-01) and *Bacillus thuringiensis* (BSP-06).

Keywords: Antibiotic, E.coli, Multi drug resistant, S. aureus, Sponges

SKRINING BAKTERI SIMBION PADA SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI *Multi Drug Resistant* (MDR)

Oleh

DWI PUSPITASARI

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Perikanan dan Kelautan
Fakultas Pertanian Universitas Lampung

FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024

Judul skripsi	: **SKRINING BAKTERI SIMBION PADA SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI *MULTI DRUG RESISTANT* (MDR)**
Nama Mahasiswa	: Dwi Puspitasari
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1814221010
Jurusan/Program Studi	: Perikanan dan Kelautan/Ilmu Kelautan
Fakultas	: Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Eko Efendi, S.T., M.Si.	**Oktora Susanti, S.Pi., M.Si.**
NIP.197803292003121001	NIP.198810012019032014

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

Munti Sarida, S.Pi., M.Sc.,Ph.D.

NIP. 198309232006042001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Eko Efendi, S.T., M.Si.

Sekretaris : Oktora Susanti, S.Pi., M.Si.

Penguji Bukan Pembimbing : Dr. Henky Mayaguezz, S.Pi., M.T.

2. Dekan Fakultas Pertanian

Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIP. 196411181989021002

Tanggal lulus ujian skripsi : 15 Maret 2024

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dwi Puspitasari
NPM : 1814221010
Judul Skripsi : Skrining Bakteri Simbion pada Spons sebagai Antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR)

Menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah murni hasil karya saya sendiri berdasarkan pengetahuan dan data yang saya dapatkan. Karya ini belum pernah dipublikasikan sebelumnya dan bukan plagiat dari karya orang lain. Demikian pernyataan ini saya buat, apabila di kemudian hari terbukti terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 16 Juni 2025

Dwi Puspitasari
1814221010

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung pada 30 September 2000, yang merupakan anak kedua dari tiga bersaudara pasangan suami istri Bapak Suprayitno dan Ibu Munkodah. Penulis mengawali pendidikan di Taman Kanak-kanak PGRI 3 Tegal Yoso (2004-2006), lalu melanjutkan pendidikan dasar di SDN 3 Tegal Yoso pada tahun 2006-2012, dilanjutkan pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Purbolinggo pada tahun 2012-2015, dan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Purbolinggo pada tahun 2015-2018 jurusan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA).

Penulis kemudian melanjutkan pendidikan tinggi di Program Studi Ilmu Kelautan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2018. Penulis aktif pada organisasi Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan (HIMAPIK) sebagai anggota Bidang Kerohanian Periode 2021.

Penulis juga mengikuti kegiatan magang mandiri di Taman Nasional Kepulauan Seribu, Seksi Pengelolaan Taman Nasional (SPTN) Wilayah III Pulau Pramuka pada Januari 2020. Magang mandiri di Yayasan Penyelam Lestari, *Divers Clean Action* (DCA) Indonesia pada Juni-Agustus 2020. Magang kemitraan di Yayasan Greeneration Indonesia pada April-Juli 2021. Penulis mengikuti Kuliah Kerja

Nyata (KKN) di Desa Tegal Yoso, Kecamatan Purbolinggo, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung selama 40 hari pada Januari-Februari 2021. Penulis melaksanakan kegiatan Praktik Umum (PU) di Kawasan Ekowisata Mangrove Petengoran, Desa Gebang, Kecamatan Teluk Pandan, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung pada Juli-Agustus 2021 dengan judul "Struktur Komunitas Mangrove di Ekowisata Mangrove Petengoran".

Untuk orang tua tercinta, Ibu Munkodah dan Bapak Suprayitno, yang tiada henti selalu mendoakan dan mengusahakan yang terbaik untuk penulis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala yang melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi.

Skripsi dengan judul "*Skrining Bakteri Simbion pada Spons Sebagai Antibakteri Multi Drug Resistant (MDR)*" adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
2. Munti Sarida, S.Pi., M.Sc. Ph.D. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan;
3. Eko Efendi, S.T., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik;
4. Oktora Susanti, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Pembantu/Sekretaris;
5. Dr. Henky Mayaguezz, S.Pi., M.T. selaku Dosen Penguji Utama; dan
6. Keluarga tercinta dan tersayang, Bapak Suprayitno, Ibu Munkodah, Mbak Umi Sulistiani, dan Adik Adinda Aulia Zahra.

Bandar Lampung, 16 Juni 2025

Dwi Puspitasari

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN i
DAFTAR ISI ii
DAFTAR TABEL iv
DAFTAR GAMBAR v
DAFTAR LAMPIRAN viii

I. PENDAHULUAN 7
1.1 Latar Belakang 7
1.2 Tujuan 8
1.3 Manfaat Pnelitian 9
1.4 Kerangka Pikir 9

II. TINJAUAN PUSTAKA 11
2.1 Spons 11
2.2 Potensi Senyawa Bioaktif Spons 12
2.3 Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons 13
2.4 Potensi Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Spons 13
2.5 Bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) 14
2.5.1 *Eschericia coli strain multi drug resistant* 15
2.5.2 *Staphylococcus aureus strain multi drug resistant* 16

III. METODE PENELITIAN 18
3.1 Waktu dan Tempat 18
3.2 Alat dan Bahan 18
3.3 Prosedur Penelitian 20
3.3.1 Preparasi Alat Bahan 21
3.3.2 Pengambilan Sampel dan Isolasi 22
3.3.3 Pemurnian dan Peremajaan Isolat Bakteri 23
3.3.4 Uji Antagonis Bakteri Isolat dengan Bakteri Patogen iii
3.3.5 Identifikasi Mikroskopis dan Uji Gram Bakteri Isolat 25
3.3.6 Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Potensial 26
3.3.7 Ekstraksi Bakteri Simbion Potensial 29

3.3.8 Uji Aktivitas Ekstrak Bakteri Simbion Potensial 30
3.3.9 Uji Toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* 30
3.3.10 Penetapan Nilai LC_{50}-24 Jam BSLT 33
3.4 Pengolahan dan Analisis Data 35

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 36
4.1 Identifikasi Spons 36
4.2 Inventarisasi Isolat Bakteri Simbion Spons *Stylisa massa* 37
4.3 Uji Antagonis Isolat Bakteri Simbion Spons *Stylisa massa* 37
4.4 Identifikasi Mikroskopis dan Uji Gram Bakteri Simbion Potensial 39
4.5 Ekstraksi dan Uji Aktivitas Ekstrak bakteri Simbion Spons Potensial.. 40
4.6 Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) 44
4.7 Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Potensial 46

V. SIMPULAN DAN SARAN 51
5.1 Simpulan 51
5.2 Saran 51

DAFTAR PUSTAKA 52

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Senyawa bioaktif yang ditemukan dari berbagai jenis spons 12
2. Senyawa bioaktif bakteri simbion spons 14
3. Resistensi bakteri *E. coli* strain MDR terhadap antibiotik 15
4. Resistansi bakteri *S. aureus* strain *MDR* terhadap antibiotik 16
5. Alat yang digunakan 18
6. Bahan yang digunakan 19
7. Kategori diameter zona hambat 24
8. Kategori toksisitas ekstrak 35
9. Morfologi isolat bakteri simbion spons Stylissa massa 37
10. Hasil uji aktivitas isolat bakteri simbion spons terhadap bakteri patogen 38
11. Ekstrak dan rendemen ekstrak isolat bakteri simbion spons potensial 41
12. Uji aktivitas ekstrak bakteri 42
13. Hasil uji *brine shrimp lethality test* (BSLT) ekstrak bakteri BSP-01 44
14. Hasil uji *brine shrimp lethality test* (BSLT) ekstrak bakteri BSP-06 45
15. Hasil uji pendahuluan BSLT ekstrak BSP-01 70
16. Hasil uji pendahuluan BSLT ekstrak BSP-06 72

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Kerangka pikir penelitian 10
2. Diagram alir metode penelitian 20
3. Sampel spons dari perairan Pulau Pahawang 36
4. Hasil pengamatan mikroskopis isolat bakteri 40
5. Target gen DNA BSP-01 dengan BSP-06 46
6. Pohon filogenetik isolat BSP-01 47
7. Pohon filogenetik isolat BSP-06 49
8. Isolat bakteri simbion spons yang berhasil diisolasi 66
9. Zona hambat yang terbentuk dari bakteri simbion spons terhadap *S. aureus* strain MDR 67
10. Zona hambat yang terbentuk dari bakteri simbion spons terhadap *E. coli* strain MDR 68
11. Ekstrak BSP-01 diuji terhadap *S. aureus* strain MDR 69
12. Ekstrak BSP-06 diuji terhadap *S. aureus* strain MDR 69
13. Ekstrak BSP-01 diuji terhadap *E. coli* strain MDR 69
14. Ekstrak BSP-06 diuji terhadap *E. coli* strain MDR 69
15. Hubungan antara log konsentrasi dengan probit mortalitas untuk menentukan LC_{50}-24 jam ekstrak BSP-01 72
16. Hubungan antara log konsentrasi dengan probit mortalitas untuk menentikan LC_{50}-24 jam ekstrak BSP-06 74
17. Beberapa dokumentasi selama proses penelitian 76

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Dokumentasi bakteri hasil isolasi..... 66
2. Dokumentasi uji antagonis isolat bakteri simbion spons 67
3. Dokumentasi uji aktivitas ekstrak bakteri simbion potensial..... 69
4. Perhitungan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) 70
5. Dokumentasi penelitian..... 76

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi antibiotik pada strain bakteri patogen muncul sebagai ancaman serius bagi kesehatan masyarakat dalam beberapa tahun terakhir (Mouokeu et al., 2011). Bakteri yang banyak ditemukan resisten terhadap antibiotik adalah bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. *E. coli* merupakan bakteri yang hidup di usus manusia dan hewan. Pada umumnya bakteri ini tidak berbahaya dan merupakan bagian penting di saluran usus manusia yang sehat. Namun, beberapa *E. coli* bersifat patogen yang dapat menyebabkan penyakit seperti diare dan penyakit saluran usus lainnya (CDC, 2014). Bakteri *E. coli* diketahui resisten terhadap antibiotik ampisilin (34%), kotrimoksazol (29%) dan kloramfenikol (25%) (Depkes RI, 2011). *Staphylocccus aureus* merupakan bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial dan keracunan makanan (Lutpiatina, 2015). Bakteri *S. aureus* ditemukan resisten terhadap berbagai antibiotik seperti sefalosporin, penisilin dan karbapenem (Kemalaputri et al., 2017). Permasalahan resistensi antibiotik mendorong penelitian untuk mencari antibiotik baru salah satunya yang bersumber dari laut.

Sumber daya laut merupakan sumber daya hayati yang sangat potensial untuk dikembangankan dan dikelola secara maksimal (Marzuki et al., 2014). Kekayaan bahari tersebut dapat dimanfaatkan untuk penelitian dan pengembangan bahan dasar obat (Meldha et al., 2021). Spons memiliki potensi besar dalam menghasil-kan senyawa aktif sebagai bahan baku obat. Spons telah dimanfaatkan dalam bidang farmasi karena sejak dulu berpotensi sebagai obat dengan kandungan senyawa bioaktif yang ada didalamnya (Schram et al., 2019). Komunitas mikroba yang beragam dan berjumlah besar pada spons diduga merupakan sumber dari berbagai senyawa bioaktif tersebut. Isolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons, dan

karakterisasi senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri tersebut merupakan strategi yang dapat digunakan dalam memproduksi berbagai senyawa yang memiliki potensi terapi antibakteri dalam jumlah besar (Proksch et al., 2003).

Penelitian mengenai bakteri simbion biota laut telah dilakukan oleh Sartika et al., (2014) melaporkan bahwa bakteri simbion alga coklat *Sargassum* sp. yang berasal dari perairan Pulau Lae-Lae memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Susanti et al., (2021) melaporkan bahwa bakteri endofit lamun *Enhalus* sp. asal perairan Lampung memiliki aktivitas antimikrofouling. Madilana et al., (2018) melaporkan bahwa bakteri simbion Karang Porites dari perairan Gunungkidul memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Hendrianto et al., (2012) mengenai aktivitas antibakteri dari ekstrak bakteri simbion spons yang diambil dari Perairan Pulau Tegal, Lampung. Hasilnya ekstrak tersebut efektif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal tersebut menjadi bukti bahwa perairan Lampung memiliki potensi dari biota yang dapat menghasilkan senyawa metabolit sebagai antibakteri. Maka perlu dilakukan kajian yang lebih mendalam mengenai potensi senyawa antibakteri yang berasal dari mikroba simbion biota laut, agar dapat dimanfaatkan dengan maksimal dan tetap memegang aspek keberlanjutan.

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian dengan judul “Skrining Bakteri Simbion pada Spons Sebagai Antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR)” yaitu:

1. Skrining bakteri simbion spons,
2. Uji aktivitas ekstrak bakteri simbion spons potensial, dan
3. Identifikasi molekuler bakteri simbion spons yang potensial sebagai antibakteri terhadap bakteri MDR.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sebagai salah satu informasi mengenai potensi antibakteri dari bakteri simbion spons,
2. Sebagai pengetahuan peneliti mengenai potensi antibakteri dari bahan alam, dan
3. Sebagai bahan referensi untuk penelitian lanjutan di bidang yang serupa.

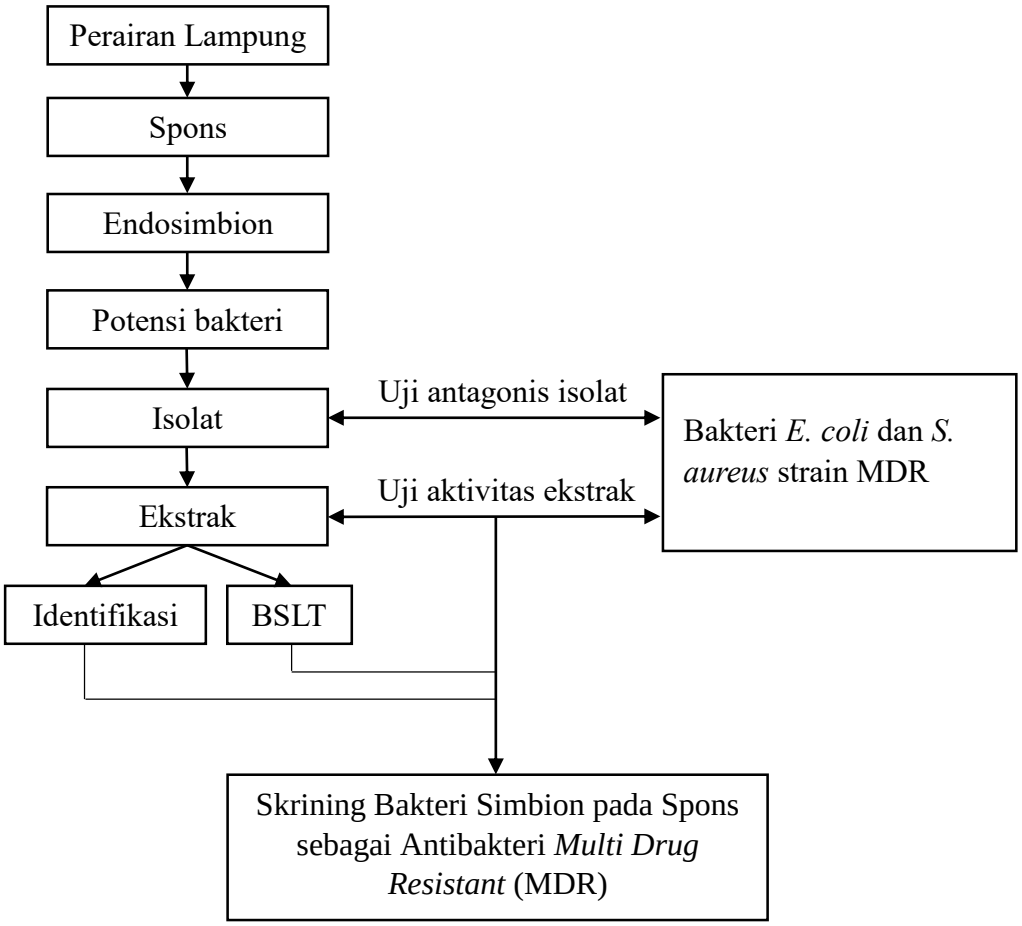
1.4 Kerangka Pikir

Resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi ancaman serius bagi masyarakat. Bakteri resisten yang sering menginfeksi manusia di antaranya *E. coli* dan *S. aureus*. Permasalahan resistensi antibiotik mendorong pene-litian untuk mencari antibiotik baru salah satunya yang bersumber dari lautan. Potensi senyawa bioaktif dari biota laut sangat besar dan dapat digunakan dalam bidang farmasi sebagai bahan baku obat-obatan.

Penelitian mengenai senyawa bioaktif dari biota laut telah banyak dilakukan seperti halnya pada spons. Namun pemanfaatan langsung dari spons yang dilakukan terus-menerus dalam jumlah besar dapat mengakibatkan kegiatan kurang konservatif. Maka dilakukanlah penelitian dengan menggunakan bakteri simbion spons untuk mengetahui adanya kandidat senyawa aktif sebagai antibakteri. Penelitian menggunakan bakteri simbion dapat mendukung aspek keberlanjutan spons pada ekosistem karena menggunakan sedikit bagian dari spons dan dikembangkan dalam skala laboratorium.

Permasalahan resistensi antibiotik mendorong penelitian untuk mencari antibiotik baru salah satunya yang bersumber dari lautan. Potensi senyawa bioaktif dari biota laut sangat besar dan dapat digunakan dalam bidang farmasi sebagai bahan baku obat-obatan. Pemanfaatan bakteri simbion spons dilakukan guna me-

nemukan senyawa metabolit yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli strain multidrug resistant* dan *S. aureus strain multidrug resistant*. Kerangka pikir penelitian terdapat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spons

Spons merupakan hewan multiseluler dari filum Porifera yang termasuk komponen biota penyusun terumbu karang. Spons terbagi dalam empat kelas utama, yaitu *Demospongiae*, *Hexactinellida*, *Calcarea*, dan *Homoscleromorpha*, dengan kelas *Demospongiae* mencakup sebagian besar spesies spons yang ada (Van Soest et al., 2016). Karakteristik spons adalah bersifat *filter feeder* yaitu menyerap, menyaring dan menyebarkan nutrien dalam proses mengolah makanan (Isnaeni dan Rahmawati, 2016).

Habitat spons sangat beragam, mencakup ekosistem laut dangkal hingga laut dalam, gua laut, padang lamun, dan substrat keras seperti batu dan terumbu karang. Di lingkungan air tawar, spons dari famili *Spongillidae* dapat ditemukan di sungai, danau, dan rawa dengan kondisi perairan yang bersih dan sedikit bergerak (Evans & Montagnes, 2019). Spons dapat hidup baik pada perairan dengan arus yang kuat , karena aliran air tersebut menyediakan kumpulan makanan dan oksigen. Makanan spons terdiri dari detritus organik seperti fitoplankton, zooplankton, dan bakteri yang ditangkap oleh flagella pada spons (Fidayat et al., 2021).

Potensi keberagaman jenis spons di Indonesia diperkirakan mencapai 80% populasi dunia, menjadikan spons sebagai kekayaan alam laut yang harus dipertahankan agar tetap lestari (Marzuki et al., 2016). Spons dapat dimanfaatkan sebagai biomonitor dan bioindikator pencemaran di lingkungan perairan karena pola makannya yang bersifat menyaring apa yang ada di sekitarnya (Dewi, 2010). Hal tersebut menjadikan spons memiliki pertahanan ekstra untuk kelangsungan hi-

dupnya sehingga dikenal memiliki kandungan senyawa bioaktif yang bervariasi sesuai dengan kebiasaan makan dari masing-masing jenisnya (Ode et al., 2019).

2.2 Potensi Senyawa Bioaktif Spons

Penemuan senyawa bioaktif pada spons semakin berkembang. Alam et al. (2005) yang menemukan senyawa bioaktif alkaloid manzamine A dan 8-OH manzamine A dari spons *Petrosia sp* yang diperoleh dari teluk Bunaken Manado. Regalado et al. (2011) yang menemukan alkaloid bromopirol dari spons *Agelas cerebrumdari* Karibia. Beberapa senyawa bioaktif yang telah ditemukan dari berbagai jenis spons beserta aktivitas biologisnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Senyawa bioaktif yang ditemukan dari berbagai jenis spons

No.	Jenis spons	Kandungan Bioaktif	Aktivitas Biologis	Sumber
1.	*Hyrtios erectus*	Turunan alkil benzoat	Aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7)	Hawas *et al*., 2017
2.	*Petrosia* sp	Senyawa alkaloid (6-hydroxyl-1,3,7-trimethyl-3,5-dihydro-1-himidazo[4,5-c] piridine-2,4-dione	Antioksidan secara kualitatif	Malaka *et al*., 2021
3.	*Melophlus sarasinorum*	Alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin	Imunomodulator	Wahyuni *et al*., 2019
4.	*Stylissa massa*	Alkaloid, terpenoid, dan steroid	Aktivitas antimalaria	Presson et al., 2021
5.	*Callyspongia aerizusa*	Alkaloid, terpenoid, flavonoid, steroid, dan saponin	Aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*	Mangurana *et al*., 2019
6.	*Lamellodysidea herbacea*	Alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan tannin	Aktivitas antioksidan	Rumagit *et al*., 2015
7.	*Petrosia alfiani*	β- sitosterol	Aktivitas sitotoksik dan antimikroba	Aqa'id *et al*., 2015
8.	*Phylospongia* sp	Alkaloid, steroid, dan flavonoid	Aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*	Sahputra *et al*., 2019
9.	*Ptilocaulis marquezii*	Alkaloid dan triterpenoid	Aktivitas daya hambat terhadap *Escherichia coli*	Maisaroh *et al*., 2023
10.	*Haliclona* sp	Alkaloid dan steroid	Aktivitas sitotoksik dan berpotensi sebagai antikanker	Kurniawan *et al*., 2021

2.3 Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons

Bakteri dan spons memiliki hubungan simbiosis secara mutualisme (Megawati et al., 2019). Hubungan simbiosis mutualisme merupakan hubungan yang saling menguntungkan. Mikroorganisme simbion memberikan sumber makanan baik untuk spons dan untuk dirinya sendiri, sedangkan spons menyediakan tempat tinggal untuk mikroorganisme (Marzuki et al., 2016). Adanya senyawa aktif yang dihasilkan oleh bakteri simbion spons dan memiliki sifat antagonisme diketahui menghambat pertumbuhan *Staphylococcus lugdunensis* (Situmorang, 2019). Hal tersebut dapat terjadi karena adanya hubungan asosial dimana bakteri tidak dapat hidup berdampingan dengan bakteri lainnya (Pastra dan Surbakti, 2012).

Beberapa penelitian terkait pemanfaatan spons yang berlebih dengan tujuan mencari senyawa bioaktif yang berpotensi dalam bidang farmakologis seperti halnya antibakteri dapat mengakibatkan tindakan yang kurang konservatif karena dapat merusak ekologi laut. Oleh karena itu apabila bakteri simbion yang berasosiasi dengan spons dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya akan lebih mengu-rangi risiko kerusakan alam. Selain itu pemanfaatan bakteri simbion spons lebih menguntungkan karena dapat dikultur dalam skala laboratorium dan dalam waktu relatif singkat dapat diperbanyak dengan mudah (Gultom, 2014).

2.4 Potensi Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Spons

Mikroorganisme dijumpai hidup dan berkolonisasi dengan memanfaatkan nutrien yang terdapat pada spons. Mikroorganisme dapat berupa bakteri atau jamur. Produk alami laut sebagai hasil metabolit sekunder dihasilkan oleh kehadiran mikroorganisme pada jaringan spons sebagai simbion, baik simbion intraseluler maupun ekstraseluler. Senyawa-senyawa organik tersebut dapat ditransformasi karena adanya kerjasama antara simbion dan inangnya. Kehadiran kedua pasangan simbion ini juga menjadi syarat untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti senyawa bioaktif yang bersifat antimikroba (Abubakar, 2009). Beberapa bakteri

simbion spons beserta senyawa bioaktif yang telah diteliti dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Senyawa bioaktif bakteri simbion spons

No	Jenis spons	Bakteri simbion	Kandungan senyawa	Aktivitas biologis	Sumber
1.	*Callyspongiidae*	Kelompok bakteri gram negatif	Enzim amilase	Agen bioremediatory	Marzuki et al, 2014
2.	*Pseudoceratina purpurea*	Famili Bacillaceae	Senyawa peptida	Antibakteri	Kanagasabhapathy et al, 2005
3.	*Spheciospongia vagabunda*	*Actinokineospora spheciospongiae* sp. november	Fridamycins H	Anti-tripanosomal	Tawfike et al, 2019
4.	*Spirastrella* sp. dan *Plakinastrela* Sp	Kelompok bakteri gram positif	Triterponoid dan flavonoid	Anthelmintika	Faisal et al, 2014
5.	*Callyspongia aerizusa*	Bakteri *Desulfotomaculum* dan bakteri *Brochothrix*	-	Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*	Liempepas et al, 2019
6.	*Spheciospongia inconstans*	*Bacillus thermopillus*	-	Antibakteri	Pahriyani et al, 2019
7.	*Aplysina aerophoba* *Axinella polypoides* *Tedania* sp. *Tethya* sp.	*Streptomyces* sp.	Valinomicin Staurosporine Butenolide	Anti-parasit Anti-infeksi	Pimentel et al, 2010

2.5 Bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR)

Bakteri *multi drug resistant* (MDR) merupakan bakteri yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik. Pemakaian antibiotik yang tidak bijaksana menyebabkan bakteri yang semula sensitif terhadap antibiotik menjadi resisten (Lenny dan Zuhra, 2005). Resistansi bakteri terjadi ketika kehidupan sel bakteri tidak terganggu oleh antibakteri. Resistensi merupakan mekanisme alami untuk bertahan hidup bakteri yang dibagi menjadi resistensi genetik, resistensi nongenetik, dan resistensi silang. Resistensi genetik merupakan mutasi spontan karena terjadi tanpa dipengaruhi keberadaan anti mikroba tersebut, resistensi non

genetik terdapat pada mikroba dalam keadaan inaktif atau istirahat, sedangkan resistenasi silang sifat resistensi mikroba terhadap suatu mikroba tertentu juga memperlihatkan sifat resistensi terhadap mikroba yang lain (Walewangko et al., 2015). Secara garis besar bakteri dapat dibedakan antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif yang dibedakan berdasarkan dinding sel (Wassenaar, 2012). *E. coli* mewakili gram-negatif dan *S. aureus* mewakili gram-positif merupakan contoh bakteri yang resisten terhadap beberapa antibiotik (Lestari et al., 2008).

2.5.1 *Eschericia coli strain multi drug resistant*

Jenis antibiotik yang resisten dan sensitif oleh MDR *E. coli* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Resistensi bakteri *E. coli* strain MDR terhadap antibiotik

No.	Antibiotik	Keterangan
1.	Ampicillin	Resisten
2.	Ampicillin/Sulbactam	Resisten
3.	Piperacillin/Tazobactam	Resisten
4.	Ceftazidime	Resisten
5.	Ceftriaxone	Resisten
6.	Cefepime	Resisten
7.	Aztreonam	Resisten
8.	Ertapenem	Sensitif
9.	Meropenem	Sensitif
10.	Amikacin	Sensitif
11.	Gentamicin	Sensitif
12.	Ciprofloxacin	Resisten
13.	Tigecycline	Sensitif
14.	Nitrofurantoin	Sensitif
15.	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Sensitif

(Microbiology Chart Report Vitek 2 RSUP DR. Kariadi, 2020)

E. coli adalah penghuni usus normal dan patogen umum yang menyebab-kan infeksi saluran kemih, infeksi enterik, dan infeksi aliran darah atau sistemik

(BSI) pada manusia. Resistensi terhadap antibiotik yang paling banyak digunakan, antibiotik β-laktam, biasanya disebabkan oleh produksi β-laktamase. *E. coli* telah menjadi multiresisten melalui produksi berbagai β-laktamase (Sidjabat dan Paterson, 2015). Kelompok *E. coli* patogen ekstra-intestinal, menyebabkan infeksi ekstra-intestinal, terutama infeksi saluran kemih, dan merupakan organisme kunci yang menyebabkan penyebaran resistensi antibiotik (Pitout, 2012).

2.5.2 *Staphylococcus aureus strain multi drug resistant*

Jenis antibiotik yang resisten dan sensitif oleh S. *aureus* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Resistansi bakteri *S. aureus* strain MDR terhadap antibiotik

No.	Antibiotik	Keterangan
1.	Benzylpenicillin	Resisten
2.	Oxacillin	Resisten
3.	Gentamicin	Sensitif
4.	Ciprofloxacin	Sensitif
5.	Levofloxacin	Sensitif
6.	Moxifloxacin	Sensitif
7.	Erythromycin	Sensitif
8.	Clindamycin	Sensitif
9.	Quinupristin/Dalfopristin	Sensitif
10.	Linezolid	Sensitif
11.	Vancomycin	Sensitif
12.	Tetracycline	Resisten
13.	Tigecycline	Sensitif
14.	Nitrofurantoin	Sensitif
15.	Rifampicin	Sensitif
16.	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Sensitif

(Microbiology Chart Report Vitek 2 RSUP DR. Kariadi, 2020)

S. aureus strain MDR adalah golongan bakteri Gram-positif yang resisten terhadap penisilin semisintetis (Nurkusuma, 2009). *S. aureus* telah muncul beberapa dekade terakhir dan terus menjadi penyakit yang mengancam di seluruh

dunia. Kasus multi-resisten telah muncul di beberapa bagian dunia. Studi terbaru menunjukkan bahwa 50% isolat S. *aureus* strain MDR telah resisten terhadap ciprofloxacin, gentamisin dan klindamisin (Lestari dan Severin, 2009). S. *aureus* strain MDR mendapat perhatian yang lebih besar dibanding *S. aureus* sensitif terhadap metisilin, karena sebagai penyebab infeksi nosokomial yang kasusnya terus meningkat di dunia.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada 2 September 2022-7 September 2023 di Laboratorium Oseanografi, Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Pengambilan sampel spons dilakukan 2022 di perairan Pulau Pahawang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian merupakan alat dan bahan yang digunakan pada pengambilan sampel di lapangan dan pengujian di Laboratorium Oseanografi Jurusan Perikanan dan Kelautan dan Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Alat yang digunakan pada kegiatan penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Alat yang digunakan

No	Alat	Keterangan/fungsi
1	Autoklaf	Sterilisasi alat dan bahan
2	Bunsen	Sterilisasi di dalam *laminar air flow*
3	Cawan petri	Wadah media tumbuh
4	*Coolbox*	Alat penyimpanan sampling
5	*Coolpack*	Alat pendingin pada *coolbox*
6	*Erlenmeyer*	Wadah untuk membuat media
7	Gelas ukur	Pengukur pelarut untuk membuat media
8	*Hot plate*	Untuk memanaskan media menjadi campuran yang homogen
9	Inkubator	Tempat inkubasi mikroba dengan suhu terkontrol

Tabel 5 (Lanjutan)

11	Jarum ose	Untuk menginokulasi mikroba
12	Jas lab	Alat pelindung dan menjaga tubuh tetap steril
13	Laptop	Untuk menuliskan dan menganalisis data hasil uji
14	Lemari pendingin	Menaruh media agar dan media cair yang belum terpakai
15	*Log book* dan alat tulis	Untuk menuliskan kegiatan harian dan data mikroba
17	Pinset	Untuk memegang dan meletakkan kertas cakram
18	Pipet tetes	Untuk mengambil larutan
19	Pisau/*cutter*	Untuk mengiris dan menyayat sampel
20	*Shaker*	mencampur zat pada tabung atau labu dengan mengguncangkannya
21	*Spreader*	Untuk meratakan bakteri di atas media agar
22	Tabung reaksi	Wadah media tumbuh untuk kultur bakteri
23	Timbangan digital	Untuk menimbang media dan bakteri

Bahan yang digunakan pada penelitian disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Bahan yang digunakan

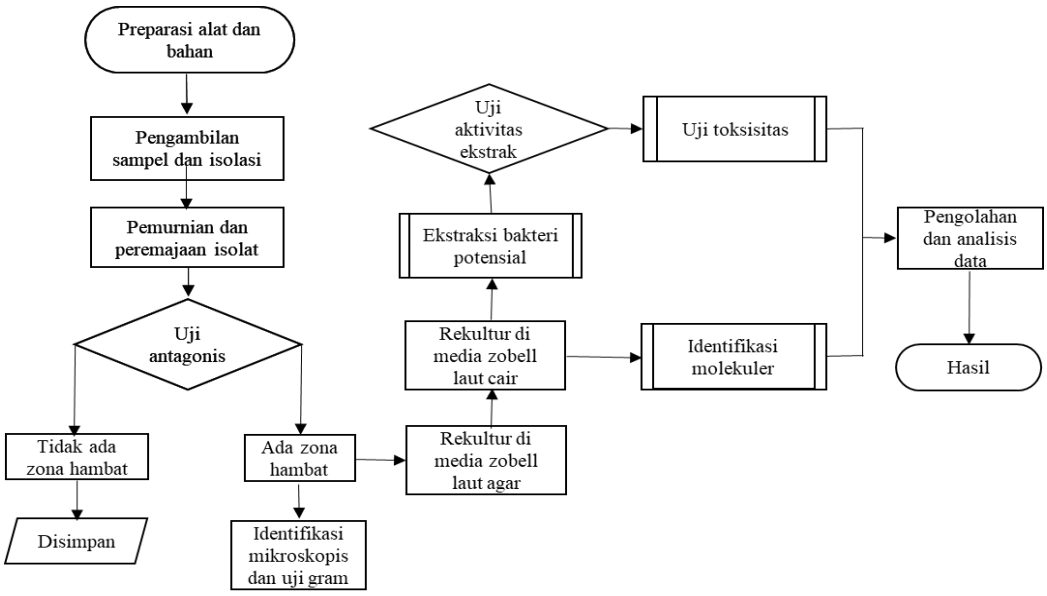
No	Bahan	Kegunaan/fungsi
1	Akuades	Sebagai pelarut media, untuk sterilisasi pada autoklaf
2	Air laut steril	Sebagai pelarut media, untuk sterilisasi pada autoklaf
3	Alkohol	Mensterilisasi alat dan diri
4	*Aluminum foil*	Untuk membungkus alat
5	Kain kasa	Untuk membuat penutup tabung reaksi dan *Erlenmeyer*
6	Karet gelang	Untuk mengikat *aluminum foil* dengan tabung dan Erlenmeyer
7	Masker	Penutup hidung dan mulut untuk mencegah kontaminasi
8	Sarung tangan medis	Melindungi tangan dan mencegah kontaminasi
9	*Nystatin* 100.000 IU	Sebagai kontrol (-), mencegah kontaminasi oleh jamur
10	Papper disk	Untuk uji antagonis terhadap bakteri patogen
11	Plastik tahan panas	Membungkus alat dan bahan saat sterilisasi
12	Plastik *wrap*	Membungkus tepian cawan petri dan mulut tabung
13	*Tissue*	Membersihkan alat
14	Kloramfenikol	Sebagai kontrol (+), menghindari kontaminasi media
15.	*Zobell marine agar*	Media tumbuh bakteri simbion
16.	*Nutrient Agar* (NA)	Media tumbuh bakteri patogen

Tabel 6 (Lanjutan)

17.	*Nutrient Broth* (NB)	Media cair untuk bakteri patogen dan potensial
18.	Metanol	Pelarut untuk ekstraksi bakteri
19.	*Cotton swab*	Untuk mengambil dan meratakan bakteri saat inokulasi

3.3 Metode Penelitian

Langkah-langkah kerja yang dilakukan dalam kegiatan penelitian disajikan pada Gambar 2. Langkah pertama yang dilakukan adalah preparasi alat dan bahan yang akan digunakan. Pengambilan sampel spons dan isolasi bakteri simbion spons, kemudian dilanjutkan dengan pemurnian dan peremajaan isolat bakteri. dilakukan uji antagonis isolat untuk melihat ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk. Isolat bakteri simbion yang menghasilkan zona hambat diidentifikasi mikroskopis dan uji gram serta dikultur ulang pada media *zobell marine agar*. Setelah dikultur pada media *zobell marine agar*, dilanjutkan dikembangkan lebih banyak pada media cair *zobell marine*.



Gambar 2. Diagram alir metode penelitian.

Bakteri simbion spons yang telah dikultur kemudian dipanen dan selanjutnya diekstraksi. Ekstrak bakteri diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji menggunakan metode difusi kertas cakram. Ekstrak bakteri juga diuji toksisitas ekstraknya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Setelah seluruh prosedur dilakukan dan mendapatkan data, selanjutnya dilakukan pengolahan dan analisis data untuk mendapatkan hasil.

3.4 Preparasi Alat Bahan

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan 2 dua cara yaitu:

1. Sterilisasi basah dilakukan ketika preparasi. Alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf untuk mencegah kontaminasi.
2. Sterilisasi kering dilakukan sebelum memulai proses isolasi, inokulasi, pemurnian, dan peremajaan. Alat yang digunakan ketika sterilisasi kering yaitu Bunsen dan alkohol 70%. Semua proses penelitian dilakukan secara aseptik dengan menggunakan api bunsen dan dilakukan dalam bilik laminar untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain (Madigan et al., 2012). Cawan petri yang akan digunakan disterilisasi kering terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%, lalu dikeringkan menggunakan tisu dan selanjutnya dibungkus menggunakan kertas dengan permukaan bersih. Tujuan pembungkusan dengan kertas adalah untuk memberi perlindungan ganda cawan petri terhadap kontak dengan lingkungan sekitar. Setelah itu dilakukan sterilisasi basah dengan diautoklaf.

Media yang dibutuhkan yaitu media *zobell marine agar* dan *nutrient agar* (NA) dalam bentuk padat, dan *nutrient broth* (NB) dalam bentuk cair. Tahapan pembuatan media yaitu:

1. Media yang akan digunakan ditimbang menggunakan timbangan analitik. Banyak sedikitnya media disesuaikan degan kebutuhan, perbandingan banyaknya media dan pelarut dapat dilihat pada petunjuk di kemasan media.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu ditambahkan pelarut sesuai dengan asal isolat bakteri. Isolat yang habitatnya dari laut, pelarutnya berupa air laut steril. Isolat yang berasal dari perairan tawar , pelarutnya menggunakan akuades.
3. Media *zobell marine agar* diberi antijamur (*nystatin*) dengan dosis 0,01 ml/L untuk menghindari kontaminasi.
4. Media diaduk menggunakan *hot plate stirrer* hingga homogen lalu disterilkan menggunakan autoklaf.
5. Media yang akan digunakan di dalam tabung agar miring dituang ke dalam tabung reaksi sebelum diautoklaf.
6. Media dituang ke dalam cawan petri dituang setelah diautoklaf.

3.3.2 Pengambilan Sampel dan Isolasi

Sampel spons yang digunakan diambil dari Perairan Pulau Pahawang, Kecamatan Punduh Pidada, Kabupaten Pesawaran dengan acuan Trianto et al., 2019. Tahapan pengambilan sampel yaitu:

1. Sampel spons diambil dengan cara *skin-diving* pada lokasi perairan yang terdapat terumbu karang dengan kedalaman 2-5 meter.
2. Sampel yang telah diambil selanjutnya dibilas menggunakan air laut steril.
3. Sampel spons dimasukan ke dalam plastik zip dan disimpan di dalam *coolbox* kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi.

Isolasi dilakukan di Laboratorium Oseanografi Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Isolasi dilakakukan dengan metode pengenceran (Marzuki et al., 2014). Tahapan dalam isolasi yaitu:

1. Sampel spons dibilas menggunakan air laut steril kemudian dipotong kecil-kecil dan ditimbang 1 gram lalu ditumbuk menggunakan mortar dan stamper.

2. Air laut steril disiapkan dalam tabung reaksi. Tabung reaksi pertama diisi 10 ml, tabung reaksi ke-2 sampai ke-7 diisi 9mL air laut. Isolasi ini menggunakan 6 tingkat pengenceran (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}).
3. Media agar *zobell* laut yang sudah disterilkan disiapkan dalam cawan petri untuk media tumbuh bakteri simbion.
4. Spons yang sudah halus dimasukkan ke dalam tabung reaksi pertama (10^0) yang berisi 10 ml air laut steril lalu dilarutkan. Pengenceran dilakukan 10^{-1} sampai 10^{-6}.
5. Air laut sebanyak 0,1 ml dari tabung pengenceran 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} diambil dan diinokulasi pada media agar *zobell* laut dalam cawan petri ± 15 ml secara aseptik. Setiap tingkat pengenceran diinokulasi dengan 2x pengulangan.
6. Pinggiran cawan ditutup rapat menggunakan plastik wrap lalu diinkubasi pada suhu 37ºC di dalam inkubator selama 24-48 jam.

3.3.3 Pemurnian dan Peremajaan Isolat Bakteri

Setelah 1x24 jam bakteri hasil isolasi diamati, jika sudah tumbuh dilakukan peremajaan dan pemurnian. Tahapan yang dilakukan yaitu:

1. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh hasil isolasi selanjutnya dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran di media zobell agar baru dalam cawan petri. Selanjutnya simpan dalam inkubator suhu ruang selama 1x24 jam. Lakukan berulang hingga mendapatkan koloni bakteri murni yang tunggal dan seragam (Mikdarullah dan Nugraha, 2017).
2. Isolat-isolat koloni tunggal yang sudah murni selanjutnya dikoleksi, dengan cara masing-masing isolat dikultur pada media *zobell marine agar* tabung miring dan diberi pengkodean sesuai sampel yang didapat.
3. Isolat disimpan di inkubator untuk selanjutnya diidentifikasi dan diseleksi secara kualitatif dan kuantitatif.
4. Bakteri murni yang telah tumbuh disimpan dengan suhu rendah <10^{o}C untuk penyimpanan lebih dari 1x24 jam. Untuk penyimpanan bakteri dengan waktu

yang cukup lama (maksimal 60 hari) dapat disimpan pada suhu dibawah -20^{o} sampai -70^{o}C dengan penambahan DMSO (*dimethylsulfoxide*).

3.3.4 Uji Antagonis Bakteri Isolat dengan Bakteri Patogen

Penapisan aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (Radjasa et al, 2007).

1. Bakteri *E. coli* strain MDR dan *S. aureus* strain MDR sebanyak 100 µl pada fase log (10^{9} sel/ml) disebar diatas media agar NA tawar dan diratakan menggunakan *cotton swab*.
2. Bakteri simbion spons yang telah dikultur pada media cair *zobell marine* diambil 30 µl dan diinokulasi ke kertas cakram (8 mm; Advantec, Toyo Roshi, Ltd, Jepang).
3. Kertas cakram yang telah berisi strain bakteri simbion diletakan pada permukaan media NA yang sebelumnya telah disebar bakteri *E. coli* strain MDR dan *S. aureus* strain MDR.
4. Uji dilakukan 3x pengulangan pada setiap bakterinya.
5. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 2x24 jam.
6. Aktivitas antibakteri diamati pada jam ke-24 dan 48.
7. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat (*clear zone*) disekitar kertas cakram.
8. Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong (3x pengulangan; vertikal, horizontal, dan diagonal) dan dicatat hasilnya.

Susanto et al. (2012), mengkategorikan zona hambat seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Kategori diameter zona hambat

Diameter	Kekuatan daya hambat
≤5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥21 mm	Sangat kuat

3.3.5 Identifikasi Mikroskopis dan Uji Gram Bakteri Isolat

Identifikasi mikroskopis dan uji gram dilakukan terhadap isolat bakteri yang memiliki aktivitas daya hambat guna mengetahui bakteri tersebut termasuk dalam bakteri gram postif atau gram negatif (Dash dan Payyappilli, 2016). Tahapan identifikasi mikroskopis yaitu:

1. Bakteri pada media agar miring diambil sebanyak 1 (satu) ose dan diletakkan diatas gelas objek yang telah ditetesi aquades.
2. Gelas objek yang telah berisi bakteri kemudian difiksasi diatas api bunsen.
3. Bakteri pada gelas objek diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 (objektif) x 10 (okuler).

Uji Gram dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram dan teknik KOH *string test*. Tahapan uji Gram dengan teknik pewarnaan yaitu:

1. Gelas objek ditetesi aquades sebanyak 1-2 tetes.
2. Bakteri sebanyak 1 ose diletakkan diatas gelas objek yang telah ditetesi aquades.
3. Gelas objek yang telah berisi bakteri kemudian difiksasi diatas api bunsen. Setelah difiksasi, larutan kristal violet diteteskan pada gelas objek dan didiamkan selama 1 (satu) menit.
4. Gelas objek yang telah difiksasi dibilas menggunakan akuades. Kemudian, diteteskan larutan lugol diatas bakteri yang telah dibilas menggunakan akuades.
5. Gelas objek ditetesi alkohol 96 %, dan dihomogenkan selama 30 detik.
6. Gelas objek dibilas kembali menggunakan akuades.
7. Gelas objek ditetesi larutan safranin dan dididamkan selama 1 menit.
8. Gelas objek dibilas kembali menggunakan akuades untuk kemudian diamati dibawah mikroskop.

Pengujuan Gram dengan teknik KOH *string test* dilakukan dengan tahapan:

1. Larutan KOH 3% sebanyak 1-2 diteteskan pada gelas objek.

2. Bakteri pada media diambil sebanyak 1 (satu) ose dan digoreskan pada gelas objek.
3. Bakteri yang digoreskan pada gelas objek berisi KOH 3% diamati ada atau tidaknya lendir. Adanya lendir menandakan bahwa bakteri tersebut gram negatif dan tidak adanya lendir menandakan bahwa bakteri tersebut gram positif

3.3.6 Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Potensial

Identifikasi molekuler dilakukan dengan mengekstraksi DNA dari isolat bakteri, PCR, dan sekuensing. Tahapan yang dilakukan berdasarkan pada metode dari Suharjo, 2015. Adapun langkah-langkah identifikasi molekuler secara lengkap yaitu sebagai berikut:

1. Ekstraksi DNA
    - Isolat bakteri dikultur dalam media *zobell* laut cair dalam tabung reaksi dengan volume media 10 ml dan di*shaker* selama 1x24 jam.
    - Bakteri dari tabung dipindah ke *microtube* berukuran 1,5 ml, lalu disentrifugasi selama 1 menit menggunakan mikro-sentrifuge dengan kecepatan 14.000 rpm.
    - Sentrifugasi dilakukan berulang sampai bakteri sudah dipanen secara keseluruhan.
    - Setelah selesai disentrifugasi, buang sisa media cair menggunakan mikropipet.
    - Bakteri dalam *microtube* ditambahkan larutan TE sebanyak 567 µl lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*.
    - Larutan SDS 10 % sebanyak 30 µl dan proteinase-K sebanyak 3 µl dimasukkan ke dalam *microtube*, lalu dihomogenkan.
    - Sampel kemudian diinkubasi dalam mini-inkubator dengan suhu 37^{o}C selama 1 jam.

- Sampel yang telah diinkubasi kemudian ditambahkan 100 µl NaCl 5 molar lalu dihomogenkan.
- Larutan CTAB sebanyak 80 µl ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit dalam suhu 65^{o}C.
- Setelah diinkubasi, larutan *chloroform isoamyl* sebanyak 720 µl, kemudian homogenkan dengan kuat lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.
- Sampel yang telah disentrifugasi diambil supernatan sebanyak 500 µl, diambil mengguunakan mikropipet per 100 µl lalu dipindahkan ke *microtube* yang baru dan ditambahkan larutan *phenol chloroform isoamyl* (PCI) dengan perbandingan 1:1.
- Sampel diaduk kuat, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.
- Sampel diambil sebanyak 300 µl menggunakan mikropipet per 100 µl lalu dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru.
- Isopropanol ditambahkan dengan volume 60% dari supernatan (60% dari 300 µl adalah 180 µl) lalu homogenkan dan disimpan pada refrigerator selama 10 menit.
- Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit.
- Supernatan dibuang dan tambahkan etanol 70% sebanyak 300 µl lalu disentrifugasi kembali selama 5 menit.
- Larutan dibuang dan kering anginkan sampel selama 24 jam.
- Larutan TE sebanyak 20 µl di hari berikutnya, lalu simpan DNA sampel dalam refrigerator.

2. Elektroforesis

   Tahap selanjutnya yaitu elektroforesis sampel untuk melihat ada atau tidaknya genome yang didapatkan. Untuk elektroforesis terlebih dahulu dibuat gel agarose untuk diamati menggunakan UV *transilluminator*. Tahapan yang dilakukan yaitu :

   - Pembuatan gel agarose dilakukan dengan melarutkan 0,1 gram bubuk agarose dengan 20 ml larutan TBE lalu di*microwave* hingga homogen.

- Media yang telah homogen ditunggu beberapa saat sampai tidak terlalu panas kemudian ditambahkan E+Br sebanyak 1 µl.
- Media kemudian dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga mengeras.
- Gel agarose yang sudah mengeras, selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis.
- Untuk proses elektroforesis dicampurkan 3 µl *leader*, 1 µl *loading dye*, dan 3 µl DNA sampel lalu dimasukkan sebanyak 3 µl ke dalam sumur pada gel agarose kemudian tunggu selama 45 menit.
- Gel agarose diangkat dan ditaruh di atas UV *transilluminator* kemudian diamati ada atau tidaknya genome sampel.
- Jika ada, selanjutnya DNA sampel dapat dilakukan proses *polimerase chain reaction* (PCR) untuk memperbanyak jumlah DNA sampel.

3. *Polimerase chain reaction* (PCR)
   - PCR dilakukan dengan mengambil DNA sampel sebanyak 1 µl dan dimasukkan ke dalam microtube ukuran 0,2 ml.
   - Larutan *red mix* 12,5 µl, *primer forward* 1 µl, *primer referse* 1 µl, dan air steril 9,5 µl ditambahkan ke *microtube* yang telah berisi sampel, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dan ditunggu selama 90 menit.
   - Setelah selesai PCR, dilakukan kembali proses elektroforesis untuk mengetahui ada atau tidaknya genome.
   - DNA sampel selanjutnya dikirimkan ke PT Genetika Science Indonesia untuk dilakukan proses sekuens DNA.

4. Analisis data sekuensing
   - Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *software* BioEdit dan Mega 11.
   - Hasil sekuensing dari masing-masing *primer forward* dan *reverse*, selanjutnya dilakukan penggabungan dengan merubah hasil *sekuensing reverse* untuk dilakukan pembalikan berpasangan (*reverse complement*).

- Untuk analisa *sequence alignment*, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang diperoleh (*query*) dengan sekuens yang telah ada pada Gen Bank dengan *database searches* NCBI internet site (http//www.ncbi.nlm.nih.gov) menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).
- Ukuran fragmen hasil amplifikasi PCR ditentukan dengan cara dibandingkan antara posisi ukuran penanda DNA (Marker) dengan ukuran fragmen sampel.
- Hasil positif ditunjukkan dengan adanya band pada ukuran 996 bps (Rismawati, 2018).

3.3.7 Ekstraksi Bakteri Simbion Potensial

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu berdasarkan Yati (2018) yang disesuaikan dan dimodifikasi.

1. Bakteri simbion spons potensial ditumbuhkan dalam media NB sebanyak 500 ml lalu dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 170 rpm, selama 72 jam pada suhu 37ºC.
2. Hasil kultur dipanen dengan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan dan biomassa (Yati, 2018).
3. Biomassa yang diperoleh kemudian diekstraksi secara maserasi dengan pelarut metanol 96% menggunakan perbandingan (1/2: v/v) dan didiamkan selama 1x24 jam.
4. Lapisan atas (fase metanol) dituang ke dalam erlenmeyer dengan disaring menggunakan kertas saring, sedangkan residu cairan media (lapisan bawah) dilanjutkan ke ekstraksi berikutnya.
5. Fase metanol selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 35ºC sehingga diperoleh ekstrak kental, untuk digunakan pada uji aktivitas ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri patogen yakni *E. coli* strain MDR dan *S. aureus* strain MDR.

3.3.8 Uji Aktivitas Ekstrak Bakteri Simbion Potensial

Uji aktivitas ekstrak dilakukan untuk melihat aktivitas ekstrak terhadap patogen. Oleh karena itu, uji ini sering disebut uji konfirmasi untuk melihat darimana aktivitas daya hambat berasal. Aktivitas daya hambat dapat berasal dari sel dan juga senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi kertas cakram (Trianto et al., 2019). Ekstrak diuji tantang dengan *E. coli* strain MDR dan *S. aureus* strain MDR.

1. Bakteri patogen yang telah dikultur di media NB dituang sebanyak 100 µl ke dalam cawan berisi media NA tawar lalu diratakan menggunakan *cotton swab*.
2. Kertas cakram ditetesi dengan ekstrak yang sudah tersedia dengan konsentrasi 1% atau sekitar 10.000 ppm menggunakan mikropipet sebanyak 20 µl, 2 kertas cakram lainya diisi kontrol positif dan negatif. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 10.000, 5000, 1000, 100, dan 10 ppm
3. Kontrol positif menggunakan larutan kloramfenikol dengan kadar 1%.
4. Kemudian diinkubasi kembali selama 1-2 hari untuk dilihat ada atau tidaknya zona hambat.

3.3.9 Uji Toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) mengacu pada penelitian Irawan et al., 2014 menggunakan hewan uji *Artemia salina* dengan uji dibagi menjadi 2 yaitu uji pendahuluan dan uji utama.

a. Uji Pendahuluan

- Persiapan wadah

  Tabung reaksi disterilisasi menggunakan alkohol dan dikeringkan menggunakan tisu bersih. Dalam uji pendahuluan BSLT dilakukan 3x pengulangan disetiap konsentrasi dan perlakuan kontrol. Wadah yang digunakan adalah 33 tabung reaksi yang telah diisi air laut sebanyak 3 ml.

- Persiapan hewan uji

  Prosedur penetasan telur *A. salina* untuk pengujian BSLT adalah telur *A. salina* ditetaskan di tempat penetasan artemia dengan berisi air laut dan aerator seba-gai sirkulasi udara. Telur menetas dan bergerak aktif pada usia 24-48 jam. Umur artemia 24 jam tersebut yang digunakan pada uji BSLT. *A. salina* yang digunakan pada uji sebanyak 10 ekor per tabung reaksi.

- Pembuatan larutan stok

  Larutan stok dibuat menggunakan hasil dari ekstrak bakteri simbion spons yang telah didapatkan. Larutan stok dibuat dengan mengencerkan ekstrak dengan pelarutnya sesuai konsentrasi yang diinginkan. Larutan stok yang akan dibuat adalah 10.000 ppm.

- Pelaksanaan uji pendahuluan

  1. *A. salina* sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditentukan masing-masing perlakuan. Konsentrasi yang digunakan untuk uji pendahuluan yaitu 9000, 7000, 5000, 3000 dan 1000 ppm.
  2. Tabung reaksi lalu diletakkan di bawah penerangan dan setelah 12 jam dilakukan pengamatan dengan menghitung jumlah larva *A. salina* yang mati.
  3. Kriteria standar untuk menilai kematian larva *A. salina* adalah bila larva *A. salina* tidak menunjukkan pergerakan selama waktu observasi.

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan ambang batas atas dan ambang batas bawah pada uji lanjut BSLT. Konsentrasi ambang batas atas adalah konsentrasi terendah dari bahan uji yang dapat menyebabkan semua hewan uji mati pada waktu pemaparan 24 jam. Sedangkan konsentrasi ambang batas bawah adalah konsentrasi tertinggi dari bahan uji yang dapat menyebabkan semua hewan uji mati setelah pemaparan 48 jam.

b. Uji utama BSLT

- Persiapan wadah

  Wadah yang digunakan pada uji utama adalah 33 buah tabung reaksi. Dalam uji utama dilakukan 3x pengulangan untuk setiap konsentrasi

ekstrak dan perlakuan kontrol. Konsentrasi ekstrak pada uji utama dihitung setelah mengetahui nilai ambang batas atas dan ambang batas bawah pada uji pendahuluan.

- Persiapan hewan uji

  Telur *A. salina* ditetaskan di tempat penetasan artemia dengan berisi air laut dan aerator sebagai sirkulasi udara. Telur menetas dan bergerak aktif pada usia 24-48 jam. Umur artemia 24 jam tersebut yang digunakan pada uji BSLT. *A. salina* yang digunakan pada uji sebanyak 10 ekor per tabung reaksi.

- Pelaksanaan uji utama

  Pada uji utama, konsentrasi yang digunakan berdasarkan batas atas dan batas bawah berdasarkan pada uji pendahuluan. Dalam penentuan rentang konsentrasi harus mempunyai logaritma yang tetap agar tidak terjadi keracunan dalam menentukan LC_{50}-24 jam bahan uji tersebut (Ngatidjan, 1997). Interval konsentrasi pendugaan LC_{50}-24 jam yang digunakan dengan rumus Hubert (1979) dalam Yunita et al. (2009). Perhitungan kisaran konsentrasi yang digunakan dalam uji toksisitas dihitung berdasarkan persamaan respon kuantum (Finney, 1971)

$$\text{Log } \frac{N}{n} = \text{k log} \frac{a}{n} \qquad \cdots (1)$$

dengan perhitungan nilai konsentrasi sebagai berikut:

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d} \quad \cdots (2)$$

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} \text{ maka } b = \frac{a^2}{n}$$

$$\frac{b}{a} = \frac{c}{b} \text{ maka } c = \frac{b^2}{a}$$

$$\frac{c}{b} = \frac{d}{c} \text{ maka } d = \frac{c^2}{b}$$

$$\frac{d}{c} = \frac{e}{d} \text{ maka } e = \frac{d^2}{c}$$

Keterangan :

N : Konsentrasi ambang atas
n : Konsentrasi ambang bawah
a : Konsentrasi ke-1 untuk pengujian
k : Banyaknya konsentrasi yang diuji (ada 5; dengan nilai a,b,c,d, dan e)

Penentuan nilai konstanta a,b,c,d, dan e dilakukan dengan mengambil ekstrak dari larutan stok. Untuk memperoleh konsentrasi yang diinginkan digunakan persamaan :

$$V_1.M_1=V_2.M_2 \quad \cdots (3)$$

Keterangan :

V_1 : Volume larutan stok yang akan digunakan
M_1 : Konsentrasi
V_2 : Volume yang diuji
M_2 : Konsentrasi yang diinginkan

Pengamatan pada uji utama BSLT dilakukan setelah 24 jam. Pada uji utama ini data yang diambil adalah mortalitas dari hewan uji pada setiap perlakuan.

3.3.10 Penetapan Nilai LC_{50}-24 Jam BSLT

Perhitungan nilai LC_{50}-24 jam dilakukan dengan analisis probit (Hendri et al., 2010). Perhitungan Analisis Probit mengacu pada Hubert (1979). Nilai LC_{50}-24 jam diperoleh dari hubungan nilai logaritma konsentrasi bahan uji dan nilai probit dari persentase mortalitas hewan uji merupakan fungsi linear dengan persamaan :

$$Y = a + bx \quad \cdots (4)$$

Keterangan :

Y : Nilai Probit Mortalitas
a : konstanta
b : slope/kemiringan
X : Logaritma konsentrasi bahan uji

Nilai LC_{50}-24 diperoleh dari anti log m, dimana m merupakan logaritma konsentrasi bahan toksik pada Y = 5, yaitu nilai Probit 50% hewan uji, sehingga persamaan regresi menjadi :

$$\mathrm{M} = \frac{Y-a}{b} \quad \cdots (5)$$

$$\mathrm{M} = \frac{5-a}{b}$$

Dengan nilai a dan b diperoleh berdasarkan persamaan sebagai berikut :

$$\mathrm{a} = \frac{1}{n}(\sum \mathrm{Y} - \mathrm{b}\sum \mathrm{X}) \quad \cdots (6)$$

$$\mathrm{b} = \frac{\sum \mathrm{XY} - \frac{1}{\mathrm{n}}(\sum \mathrm{X}\sum \mathrm{Y})}{\sum X^2 - \frac{1}{n}(\sum X)^2} \quad \cdots (7)$$

Keterangan :

n : banyaknya perlakuan
m : nilai X pada Y = 5

Menurut Meyer et al. 1982, terdapat sebaran toksisitas berdasarkan nilai LC_{50} yang dapat dilihat pada Tabel 8:

Tabel 8. Kategori toksisitas ekstrak

Konsentrasi (ppm)	Kategori
< 10	Sangat kuat
10 – 100	Kuat
100 – 500	Sedang
500 – 1000	Lemah

3.4 Pengolahan dan Analisis Data

Hasil dari tahap isolasi dilanjutkan ke uji antagonis untuk mengetahui aktivitas isolat bakteri simbion spons terhadap bakteri uji. Isolat yang memiliki aktivitas diukur zona beningnya menggunakan jangka sorong dan dicatat hasil pengukurannya. Isolat bakteri simbion spons yang paling potensial selanjutnya masuk ke tahap ekstrak. Hasil ekstrak kental bakteri simbion potensial dari hasil ekstraksi isolat bakteri simbion spons diuji lanjut pada uji aktivitas ekstrak. Nilai konsen-trasi yang memiliki aktivitas diukur zona beningnya menggunakan jangka sorong dan dicatat hasil pengukurannya.

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini ialah menggunakan analisis deskriptif. Data yang dikumpulkan yaitu data hasil uji antagonis dan data hasil uji aktivitas ekstrak. Kemudian data tersebut dikolektifkan dan diolah dan dihitung standar deviasinya menggunakan *Microsoft Excel* 2019. Perhitungan standar deviasi untuk mengetahui seberapa luas penyimpangan nilai data tersebut dari nilai rata-rata zona hambat yang terbentuk.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Spons merupakan salah satu biota laut yang dapat dijadikan sumber senyawa metabolit yang dapat dimanfaatkan dan diteliti lebih lanjut. Kesimpulan dari penelitian Skrining Bakteri Simbion pada Spons Sebagai Antibakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) yaitu :

1. Hasil penyeleksian terhadap bakteri simbion spons diperoleh 2 isolat yang memiliki aktivitas antibakteri.
2. Ekstrak bakteri BSP-06 memiliki aktivitas yang lebih kuat dibandingkan isolate BSP-01.
3. Isolat BSP-01 memiliki kemiripan dengan *B. altitudins* dan isolat BSP-06 memiliki kemiripan dengan *B. thuringiensis*.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat dilakukan dari penelitian yaitu :

1. Bakteri simbion spons *B. altitudinis* dan *B. thuringiensis* dapat diteliti lebih lanjut untuk dijadikan antibiotik.
2. Penelitian lanjut yang dapat dilakukan diantaranya uji fitokimia, GCMS, ataupun LC-MS agar diperoleh senyawa tunggal produk bionatural yang dapat dimanfaatkan secara luas di masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

Alam, G., Astuti, P., Sari, D., Wahyuono, S., & Hamman, M.T. (2005). Structure elucidation of bioactive alkaloid compounds isolated from sponge *Petrosia* sp. collected From Bunaken Bay Manado. *Indonesian Journal of Chemistry*, *5*(2) : 177-181. https://doi.org/10.22146/ijc.21828

Anderson, J. E., Goetz C.M., & Mc Laughlin J. L. (1991). A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescrenss. *Phytochemical Analysis, 2*(3). 107-111. https://doi.org/10.1002/pca.2800020303

Aqa'id, M. S., Usman, H., & Nasir, H. (2015). Isolasi, identifikasi, dan uji bioaktivitas metabolit sekunder ekstrak N-Heksana spons *Petrosia alfiani* dari Kepulauan Barrang Lompo, Skripsi. *Jurnal Ilmiah Kimia Organik, 254*.

Ariyanti, N.K., Darmayasa, I.B.G. & Sudirga, S.K. (2012). Daya Hambat Ekstrak Kulit daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis Miller*) Terhadap pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* ATCC25922.*Jurnal Biologi* XVI (1):1-4. http://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/view/5301/4057

Bibi, F., Naseer, M. I., & Azhar, E. I. (2023). Exploring bioactive compounds from a symbiotic bacterial strain of *Spongiobacter*sp. *Bioinformation*, *19*(4), 369. doi: 10.6026/97320630019369

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2018). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *35*(1), 8–53. https://doi.org/10.1039/C7NP00052A

Bordel, S., Martín-González, D., Muñoz, R., & Santos-Beneit, F. (2023). Genome sequence analysis and characterization of *Bacillus altitudinis* B12, a polylactic acid-and keratin-degrading bacterium. *Molecular Genetics and Genomics*, *298*(2), 389-398. https://doi.org/10.1007/s00438-022-01989-w

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus*

thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, *41*(7), 423-431. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006

Brown, S., Santa Maria Jr, J. P., & Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, *67*, 313-336. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620

Cahayanti, I. A. P. A., Wartini, N. M., & Wrasiati, L. P. (2016). Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap karakteristik pewarna alami buah pandan (*Pandanus tectorius*). *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, *4*(2252), 32-41. https://ojs.unud.ac.id/index.php/jtip/article/view/19592

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2014). *Escherichia coli* (E. *coli*). https://www.cdc.gov/ecoli/about/index.html

Choe, S. G., Maeng, H. R., & Park, S. J. (2022). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using penicillin fermentation waste matter and application in agriculture. *Journal of Natural Pesticide Research*, *2*(100012). https://doi.org/10.1016/j.napere.2022.100012

Dash, C. & Payyappilli, R. J. (2016). KOH string and Vancomycin susceptibility test as an alternative method to Gram staining. *Journal of International Medicine and Dentistry*, *3*(2), 88-90. http://dx.doi.org/10.18320/JIMD/201603.0288

Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1794*(5), 808–816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005

Depkes RI. (2011). *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik*. Jakarta. https://farmalkes.kemkes.go.id/unduh/permenkes-2406-2011/

Dewi, A.S. (2010). Respon stres pada spons dan potensi aplikasinya sebagai biomonitor polutan pada ekosistem terumbu karang. *Squalen*, *5*(3) : 92-100. https://doi.org/10.15578/squalen.52

Diastuti H, Warsinah, & Purwati. (2009). Uji aktivitas antikanker ekstrak etanol daun *Rhizopora mucronata* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan Sel Raji. *Jurnal Molekul*, *4*(1): 12-20. http://dx.doi.org/10.20884/1.jm.2009.4.1.58

Emilia, I. (2010). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Daun Tumbuhan Sengugu (*Clerodendron serratum* Sp reng). *Jurnal Sainmatika*, 7(2) Desember 2010. ISSN 1829.586x. https://doi.org/10.31851/sainmatika.v7i2.16

Evans, K. L., & Montagnes, D. J. S. (2019). Freshwater sponge (Porifera: *Spongillidae*) distribution across a landscape: Environmental tolerances, habitats, and morphological variation. *Invertebrate Biology*, *138*(3). https://doi.org/10.1111/ivb.12258

Faisal, M.R., Kawaroe, M. & Satria, F. (2014). Potensi senyawa bioaktif ekstrak kasar bakteri simbion spons sebagai anthelmintika: sebuah uji pendahuluan. *Omni-Akuatika*, *10*(2). http://dx.doi.org/10.20884/1.oa.2014.10.2.23

Fajarningsih ND, Januar HI, Nursid M, & Wikanta T. (2006). Potensi antitumor ekstrak spons *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, *1*(1): 35-42. http://dx.doi.org/10.15578/jpbkp.v1i1.229

Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., & Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekular, Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta.

Fidayat, F., Lestari, F.,& Nugraha, A. H. (2021). Keanekaragaman spons pada ekosistem padang lamun di perairan Malang Rapat, Kabupaten Bintan. *Jurnal Akuatiklestari*, *4*(2) : 71-83. https://doi.org/10.31629/akuatiklestari.v4i2.2469

Finney, D.J.(1971). *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge.

Fristiohady, A., Wahyuni, W., Malik, F., Leorita, M., Yusuf, M. I., Febriansyah, H., & Sahidin, S. (2019). Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Xestospongia* Sp. Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan Galur Balb/C. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, *5*(01), 15-30. https://doi.org/10.35311/jmpi.v5i01.38

Haris, A. & Jompa, J. (2021). *Spons*. Lily Publisher. Yogyakarta.

Harris, A. D. & Ramalingam, C. (2010). Xylanases and its application in food industry: a review. *Journal of Experimental Sciences*, *1*(7), 1-11. https://core.ac.uk/download/pdf/236015843.pdf

Hasan, N., Khan, I. U., Farzand, A., Heng, Z., Moosa, A., Saleem, M., & Canming, T. (2022). *Bacillus altitudinis* HNH7 and *Bacillus velezensis* HNH9 promote plant growth through upregulation of growth-promoting genes in upland cotton. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(5), 3812-3824.

https://doi.org/10.1111/jam.15511

Hawas, U.W., Abou El-Kassem, L.T., Abdelfattah, M.S., Elmallah, M., Eid, M., Monier, M., & Marimuthu, N. (2018). Cytotoxic activity of alkyl benzoate and fatty acids from the red sea sponge *Hyrtios erectus*. *Natural Product Research*, *32*(12): 1369-1374. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1344662

Holt, J. G. N. R., Krieg. Ph, A., Sneath. J. T., Staley, & Williams. S. T. (1994). Bergey's Manual of Determination Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore.

Irawan, O., Efendi, E., & Ali, M. (2014). Efek pelarut yang berbeda terhadap toksisitas ekstrak akar tuba (*Derris elliptica*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, *2*(2), 259-266. https://jurnal.fp.unila.ac.id/index.php/bdpi/article/view/220

Islamiyah, A., (2019). *Parameter Spesifik Ekstrak Etanol 70% Daun Matoa (Pometia pinnata JR Forst & G. Forst) Hasil Maserasi*. Doctoral Dissertation, Akademi Farmasi Putera Indonesia Malang. https://repository.poltekkespim.ac.id/id/eprint/437/

Ismet, M. S. (2007). Penapisan Senyawa Bioaktif Spons *Aaptos aaptos* dan *Petrosia* sp. dari Lokasi yang Berbeda. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan*, *3*(2), 153– 161.

Isnaeni, D., & Rahmawati. (2016). Isolasi dan Karakterisasi Mikrosimbion dari Spons *Callyspongia* vaginalis dan Uji Daya Hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Majalah Farmasi Nasional*, *13*(2), 8–19.

Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., & Nagata, S., (2005). Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Environments*, *20*(3),178-185. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/20/3/20_3_178/_pdf

Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*, 123-140. doi : 10.1038/nrmicro818

Katrin, D., Idiawati, N. & Sitorus, B. (2015). Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun malek (*Litsea graciae* Vidal) terhadap bakteri *Stapylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, *4*(1), 7-12. https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmipa/article/view/11720/11003

Kelly, M., Bell, L.J. & Herr, B. (2016). *Splendid sponges of Palau*. NIWA. Auckland.

Kemalaputri D.W., Jannah S.N., & Budiharjo A. (2017). Deteksi MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) Pada Pasien Rumah Sakit Dengan Metode Maldi-Tof MS dan Multiplex PCR. *Jurnal Biologi*. *6*, 51-61. https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/19607

Khan, M., Ijaz, M., Chotana, G. A., Murtaza, G., Malik, A., &Shamim, S. (2022). *Bacillus altitudinis* MT422188: A potential agent for zinc bioremediation. *Bioremediation Journal*, *26*(3), 228-248. https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1927973

Khan, S. I., Zarin, A., Ahmed, S., Hasan, F., Belduz, A. O., Çanakçi, S., & Shah, A. A. (2022). Degradation of lignin by *Bacillus altitudinis* SL7 isolated from pulp and paper mill effluent. *Water Science and Technology*, *85*(1), 420-432. https://doi.org/10.2166/wst.2021.610

Klaassen, C. D., Aqmdur, M. O., & Doull, J. (1986). *Toxikologi, The Basic Science of Poisons*. Mc Millan Publishing Compane. New York.

Kumar, P., Kamle, M., Borah, R., Mahato, D. K., & Sharma, B. (2021). *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*(1), 1-7. https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-021-00440-3

Kurniawan, M. R., Sapar, A., & Aritonang, A. B. (2021). Uji Toksisitas dan Uji Fitokimia Spons *Haliclona* sp. Asal Pulau Lemukutan Kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, *9*(1). https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmipa/article/view/48164

Lenny, S., & Zuhra, C.F. (2005). Uji bioaktivitas kandungan kimia utama puding merah (*Graptophyllum pictum* L. Griff) dengan metode brine shirmp. *Jurnal Komunikasi Penelitian*, *17*(5), 1-4.

Leon, M., Presson, J., Kolo, S. M. D., & Pardosi, L. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Diklorometana (DCM) dari Ekstrak Bakteri SM10 Bersimbiosis Spons *Stylissa massa*. *Journal of Chemical Science and Application*, *1*(1), 6-12.

Lestari, E.S. & Severin, J.A. (2009). *Antimicrobial Resistance in Indonesia: Prevalence, determinants and genetic basis*. [Thesis, Erasmus University Rotterdam]. https://repub.eur.nl/pub/17713/091215_Lestari,%20Endang%20Sri%20&%20Severin,%20Juliette%20Astrid.pdf

Lestari, E.S., Severin, J.A., Filius, P.N.G., Kuntaman, K., Duerink, D.O., Hadi, U., Wahjono, H., & Verbugh, H.A. (2008). Antimicrobial resistance

among commmensal isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in the indonesian population inside and outsidehospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, *27*, 45–51. 10.1007/s10096-007-0396-z

Leys, S. P., Mackie, G. O., & Reiswig, H. M. (2007). The biology of glass sponges. *Advances in marine biology*, *52*, 1-145. https://doi.org/10.1016/S0065-2881(06)52001-2

Liempepas, A., Lolo, W.A. & Yamlean, P.V. (2019). Isolasi dan uji antibakteri dari isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons *Callyspongia aerizusa* Serta Identifikasi Secara Biokimia. *Pharmacon*, *8*(2):380-387. https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29304

Loomis, T. A. (1987). *Toksikologi Dasar*. Terjemahan oleh Donatus I.A., Edisi III. UGM Press. Yogyakarta.

Loutfi, H., Fayad, N., Pellen, F., Le Jeune, B., Chakroun, M., Benfarhat, D., & Abboud, M. (2020). Morphological study of *Bacillus thuringiensis* crystals and spores. *Applied Sciences*, *11*(1), 155. https://doi.org/10.3390/app11010155

Lutpiatina, L. (2015). Pewarnaan Gram *Buffy Coat* Untuk Deteksi Awal Pasien Bakteremia. *Medical Laboratory Technology Journal*, *1*(1), 38-46.

Madigan, M.T., Marthinko., Stahl., & Clark. (2012). *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. San Francisco.

Madilana, R. N., Wijayanti, D. P., & Sabdono, A. (2018). Bakteri Simbion Karang Porites dari Perairan Gunungkidul, Yogyakarta dan Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Buletin Oseanografi Marina*, *7*(1), 43-50. https://doi.org/10.14710/buloma.v7i1.19044

Mafazah, A., & Zulaika, E. (2017). Potensi Bacillus thuringiensis dari Tanah Perkebunan Batu Malang sebagai Bioinsektisida terhadap Larva *Spodoptera litura* F. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, *6*(2), E99-E104. 10.12962/j23373520.v6i2.27447

Maisaroh, D. S., Al Hanif, Y. A., Munir, M., & Sa'adah, N. (2023). Uji Ekstrak Spons Laut Jenis *Ptilocaulis marquezii* dari Perairan Kendit sebagai Potensi Antibakteri *Escherichia coli*. *Journal of Marine Research*, *12*(1), 161-166. https://doi.org/10.14710/jmr.v12i1.36278

Malaka, M. H., Hartina, H., Fristiohady, A., Sadarun, B., & Sahidin, I. (2021). Isolation and Identification of Secondary Metabolite from Ethyl Acetate Extract of *Petrosia* sp. and Its Antioxidant Activity. *Jurnal Farmasi Sains*

dan Praktis, *7*(3), 365-373. https://doi.org/10.31603/pharmacy.v7i3.6521

Maldonado, M., Ribes, M., & van Duyl, F. C. (2005). Nutrient fluxes through sponges: Biology, budgets, and ecological implications. *Advances in Marine Biology*, *50*, 113–182. https://doi.org/10.1016/S0065-2881(05)50002-9

Mangurana, Wa O. I., Yusnaini, & Sahidin. (2019). Analisis Lc-ms/ms (Liquid Crhomatogaph Mass Spectrometry) Dan Metabolit Sekunder Serta Potensi Antibakteri Ekstrak N-heksana Spons *Callyspongia erizusa* Yang Diambil Pada Kondisi Tutupan Terumbu Karang Yang Berbeda Di Perairan Teluk Staring." *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2), 131-141 doi:10.29303/jbt.v19i2.1126.

Manning, S.D. (2010). *Deadly Diseases and Epidemics: Escherichia coli Infection, Ed ke-2*. Chelsea Publishers. New York.

Marzuki, I., Noor, A., Nafie, N.L., & Djide, M.N. (2014). Isolasi dan identifikasi bakteri simbion spons penghasil enzim amilase asal Pantai Melawai Balikpapan. *Jurnal Ilmiah "dr. Aloei Saboe"*, *1*(2):11-18.

Marzuki, I., Noor, A., Nafie, N.L., & Djide, M.N. (2016). Morphological and phenotype analysis of microsymbiont and biomass marine sponge from Melawai Beach, Balikpapan, East Kalimantan. *International Journal Marina Chimica Acta*, *17*(1), 8-15. https://doi.org/10.31219/osf.io/p73en

Megawati, Ananda, M., & Suwastika. I.N. (2019). Isolasi dan karakterisasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons. *Natural Science : Journal of Science and Technology*, *8*(3), 177-181.

Meldha, Wewengkang, D.S., & Mansauda, K.L.R. (2021). Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi spons *Callyspongia aerizusa* dari perairan Pulau Mantehage Manado. *Pharmacon*, *10*(3), 953-961. https://doi.org/10.35799/pha.10.2021.35597

Meyer B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, Dj., & McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, (45), 31-34. 10.1055/s-2007-971236

Mikdarullah, M., & Nugraha, A. (2017). Teknik Isolasi Bakteri Proteolitik Dari Sumber Air Panas Ciwidey, Bandung. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, *15*(1), 11-14. http://dx.doi.org/10.15578/blta.15.1.2017.11-14

Mouokeu, R.S., Ngono, R.A.N., Koanga, M.M., Tiabou, A.T., Njateng, G.S.S., Tamokou, J.D.D., & Kuiate, J.R. (2011). Antibacterial and Dermal toxicological profiles of ethyl acetat extract from Crassocephalu bauchiense (Hutch.) Milne-Redh (Asteraceae). *BMC Complementary & Alternative Medicine, 11*(43), 1-7. 10.1186/1472-6882-11-43

Ngatidjan. *(*1997). *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Nieto-Domínguez, M., de Eugenio, L. I., York-Durán, M. J., Rodríguez-Colinas, B., Plou, F. J., Chenoll, E., Pardo, E., Codoner, F., & Martínez, M. J. (2017). Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chemistry*, *232*, 105-113. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.149

Noviana, H. (2004). Isolasi *Salmonella typhi* dari Penderita Demam Tifoid, *Jurnal Kedokteran Yarsi, 12*(3), 54-57.

Nurhayati, A.P.D., Abdulgani, N., & Febrianto, R. (2006). Uji toksisitas ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai studi pendahuluan potensi antikanker. *Akta Kimindo 2*(1), 41-46.

Nurhidayati, S., Faturrahman, F., & Ghazali, M. (2015). Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) bergejala penyakit ice-ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, *1*(2), 24-30. https://doi.org/10.29303/jstl.v1i2.53

Nurkusuma, D.D. (2009). Faktor yang Berpengaruh terhadap Kejadian Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Pada Kasus Infeksi Luka Pasca Operasi Di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang. [Doctoral dissertation, Diponegoro University]. https://eprints.undip.ac.id/28863/1/Dudy_Disyadi_Nurkusuma_Tesis.pdf

Ode, M.F., Ramli, M., & Sahidin. (2019). Kajian Bioaktivitas Antibakteri dan Senyawa Metabolit Sekunder Spons Laut *Haliclona* sp., dari Perairan Tanjung Tiram Moramo Utara, Sulawesi Tenggara. Sapa Laut, 4(1), 13-22. http://dx.doi.org/10.33772/jsl.v4i1.6803

Oktavia, G. A. E., Ibrahim, M., & Lisdiana, L. (2013). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*) terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Lentera Bio*, *2*(3), 239–243. https://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio/article/view/4344

Pahriyani, A., Haq, F.M.& Wahyudi, P. (2019). Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Spons Laut *Haliclona* (Reinera) sp. sebagai antibakteri. *Jurnal*

Farmasi Indonesia, *11*(2):74-82. https://doi.org/10.35617/jfionline.v11i2.38

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Ruiz de Escudero, I., & Caballero, P. (2014). Molecular and insecticidal characterization of a novel Cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae*. *Toxins*, *6*(11), 3144-3156. https://doi.org/10.3390/toxins6113144

Pastra, D.A. & Surbakti, H. (2012). Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina* sp sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. *Maspari Journal: Marine Science Research*, *4*(1), 77-82. https://repository.unsri.ac.id/9388/1/9.Defin_ari_pastra_77-82.pdf

Pimentel-Elardo, S.M., Kozytska, S., Bugni, T.S., Ireland, C.M., Moll, H. & Hentschel, U. (2010). Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from *Mediterranean* sponges. *Marine drugs*, *8*(2):373-380. https://doi.org/10.3390/md8020373

Pitout, J.D., (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, *3*:9. 10.3389/fmicb.2012.00009

Prawirodihardjo, E. (2014). Uji aktivitas antioksidan dan uji toksisitas ekstrak etanol 70% dan ekstrak air laut batang kayu jawa (*Lannea coromandelica*). [Skripsi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta]. https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/29363/1/ERWIN%20PRAWIRODIHARJO-FKIK.pdf

Prayudo, A. N., Novian, O., Setyadi, & Antaresti. (2015). Koefisien Transfer Massa Kurkumin dari Temulawak. *Jurnal Ilmiah Widya Teknik,14*, 26–31. 10.33508/wt.v14i1.1739

Presson, J., Swasono, R. T., Matsjeh, S., Putri, M. P., Zahra, Z. A., & Pardosi, L. (2021). Antimalarial Activity of Sea Sponge Extract of *Stylissa massa* originating from waters of Rote Island. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, *24*(4), 136-145. https://doi.org/10.14710/jksa.24.4.136-145

Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R. A., Schupp, P., Lin, W. H., Wray, V., & Steube, K. (2003). Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from Indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure and applied chemistry*, *75*(2-3), 343-352. DOI: 10.1351/pac200375020343

Pujiastuti, Y., Arsi, A., & Sandi, S. (2020). Characteristics of Bacillus thuringiensis isolates indigenous soil of South Sumatra (Indonesia) and their pathogenicity against oil palm pests Oryctes rhinoceros (Coleoptera:

Scarabaeidae). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *21*(4). https://doi.org/10.13057/biodiv/d210403

Putra, R. E., Widyastuti, Y., & Nurkanto, A. (2020). Aktivitas antibakteri dan rendemen ekstrak etil asetat dari isolat Actinomycetes endofit. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, *7*(2), 197–203. https://doi.org/10.33096/jffi.v7i2.599

Putri, A. R., Astuti, D. I., & Wahyuni, D. S. I. (2020). Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* serta hubungan dengan konsentrasi. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, *7*(1), 48–53. https://doi.org/10.33096/jffi.v7i1.549

Putri, D. A. (2014). Pengaruh Metode Ekstraksi dan Konsentrasi terhadap Aktivitas Jahe Merah (*Zingiber officinale var rubrum*) sebagai Antibakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia*, 46.

Putri, W.S., Warditiani, N.K., & Larasanty, L.P.F. (2013). Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*, *2*(4), 56-60.

Radjasa, O. K., Sabdono, A., Junaidi, J., & Zocchi, E. (2007). Richness of Secondary Metabolite-Producing Marine Bacteria Associated with Sponge *Hatictona* sp. *International Journal of Pharmacology*, *3*(3), 275-279. 10.3923/ijp.2007.275.279

Regalado, E.L., Laguna, A., Mendiola, J., Thomas, O.P., & Nogueiras, C. (2011). Bromopyrrole alkaloids from the Caribbean sponge *Agelas cerebrum*. *Quimica Nova*, *34*(2), 289-291. https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200022

Rismawati, R. (2018). Identifikasi Bakteri Endofit Daun Mangrove Api-Api Putih (Avicennia marina) dan Potensinya Menghasilkan Senyawa Anti Mikroba. [Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar].

Rumagit, H. M. (2015). Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Spons Lamellodysidea Herbacea. *Pharmacon*, *4*(3), 183-192. https://doi.org/10.35799/pha.4.2015.8858

Sabdono, A., & Radjasa, O. K. (2006). Anti-bacterial property of a coral-associated bacterium *Bacillus* sp. against coral pathogenic BBD (Black Band Disease). *Journal of Coastal Development*, *9*, 175-182.

Sahputra, A., Sadarun, B., & Sahidin, I. (2019). Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Anti Bakteri Spons *Phyllospongia* sp. di Perairan yang Berbeda. *Sapa Laut*, *4*(4), 153-162. http://dx.doi.org/10.33772/jsl.v4i4.10760

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, *9*(3), 283-300. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x

Sangi, M.S., Momuat, L.I., & Kumaunang M. (2012). Uji toksisitas dan skrining fitokimia tepung gabah pelepah aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains, 12*(2), 127-13. https://doi.org/10.35799/jis.12.2.2012.716

Sartika, Ahmad, A., & Natsir, H. (2014). Potensi antimikroba protein bioaktif dari bakteri simbion alga cokelat *Sargassum* sp. asal Perairan Pulau Lae-Lae. *Jurnal Ekstrakulikuler*, 1-7. https://core.ac.uk/download/pdf/25495357.pdf

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., & Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, *62*(3), 775-806. https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.775-806.1998

Schram, S. A., Tumbol, R. A., & Kreckhoff, R. L. (2019). The Use Of Marine Sponge Crude Extract To Improve The Resistance Of Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*) To *Streptococcus agalactiae* Infections. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, *7*(2), 347-357. 10.35800/jip.7.2.2019.23723

Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Doublet, B. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, *28*(5), 519–542. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001

Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar, J.V., & Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(7), 1465-1473. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0

Sidhatra, B. R. (2000). *Pengantar Mikrobiologi Kelautan*. Universitas Jaya. Yogyakarta

Sidjabat, H.E. & Paterson, D.L. (2015). Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Asia: epidemiology and management. *Expert review of anti-infective therapy*, *13*(5), 575-591. DOI: 10.1586/14787210.2015.1028365

Situmorang, A. (2019). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Simbion Spons yang Berpotensi Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Multi Drug Resistant Organism (MDRO) dengan Penanda Gen 16S RRNA. [Doctoral Dissertation, Universitas Negeri Medan]

Sogandi. (2018). *Biologi Molekuler Identifikasi Bakteri Secara Molekuler*. Universitas17 Agustus 1945. Jakarta. https://www.researchgate.net/publication/335925525_Biologi_Molekuler_Identifikasi_Bakteri_Secara_Molekuler

Stankiewicz, P. J., Franzblau, S. G., & Winter, J. S. (2007). Antibacterial activity of secondary metabolites from marine sponge-associated microorganisms. *Journal of Natural Products*, *70*(1), 123-128. https://doi.org/10.1021/np060447j

Subagio, I. B., & Aunurohim. (2013). Struktur komunitas spons laut (porifera) di Pantai Pasir Putih, Situbondo. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, *2*(2) : 159-165. 10.12962/j23373520.v2i2.3962

Saputra, S., Hanoum, A., Mulyadi, M., & Dinoto, A. (2022). Aktivitas xylanase dari *Bacillus altitudinis* yang diproduksi dengan variasi waktu inkubasi dan kondisi pengujian pH netral dan alkalin. *Berita Biologi: Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, *21*(2), 159-166. DOI: 10.14203/beritabiologi.v21i2.4310

Suharjo, R. (2015). Sekilas tentang Klasifikasi dan Teknik Identifikasi *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* dan *E. ananas*. *Prosiding Seminar Regional Ilmu Penyakit Tumbuhan*, 58-65. https://repository.lppm.unila.ac.id/2838/1/seminar%20regional.pdf

Sukandar, D., Hermanto, S., & Lestari, E. (2008). Uji toksisitas ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT). Program Studi Kimia FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. 61-68. 10.15408/jkv.v1i2.217

Sumarni, N. K., Rahmawati, R., Syamsuddin, S., & Ruslan, R. (2019). Daya Hambat Ekstrak Etanol Sabut Kelapa (*Cocos Nucifera* Linn) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan Escherichia coli pada Tahu. *Jurnal Kimia Mulawarman*, *17*(1), 45-51.

Sun, T., Zhao, X. W., Yang, L. B., & Fan, L. H. (2012). The impact of psychological capital on job embeddedness and job performance among nurses: a structural equation approach. *Journal of advanced nursing*, *68*(1), 69-79. 10.1111/j.1365-2648.2011.05715.x

Susanti, O., Yusuf, M. W., & Elisdiana, Y. (2021). Potensi Bakteri Endofit Lamun *Enhalus* sp. dengan Aktivitas Antimikrofouling dari Perairan Lampung. *Journal of Marine Research*, *10*(4): 589-594. https://doi.org/10.14710/jmr.v10i4.32286

Susanto, D.S. & R. Ruga. (2012). Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (*Shorea leprosula Miq*) Sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *Mulawarman Scientifie*, *11*(2), 181-190.

Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(2), 295-347. https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06

Tawfike, A., Attia, E. Z., Desoukey, S. Y., Hajjar, D., Makki, A. A., Schupp, P. J., Edrada-Ebel, R. A., & Abdelmohsen, U. R. (2019). New bioactive metabolites from the elicited marine sponge-derived bacterium *Actinokineospora spheciospongiae* sp. nov. *AMB Express*, *9*(1), 1–9.

Tetti, M. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, *7*(2):361. https://doi.org/10.24252/kesehatan.v7i2.55

Tiwari, P., Jain, R., Kumar, K., Panik, R., & Sahu, P. K. (2011). An evaluation of antimicrobial activities of root extract of *Calendula officinalis* (Linn.). *Newsletter*, *2*, 886–892. https://www.researchgate.net/publication/274733034_An_evaluation_of_antimicrobial_activities_of_root_extract_of_Calendula_officinalis_Linn

Trianto, A., Nirwani, N., Susanti, O., Maesaroh, D. S., & Radjasa, O. K. (2019). The bioactivity of bacterium and fungi living associate with the sponge *Reniera* sp. against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *20*(8), 2302-2307. https://doi.org/10.13057/biodiv/d200827

Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N.J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., Hooper, J.N.A. (2016). Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS ONE*, *11*(4). 10.1371/journal.pone.0035105

Verdiana, M., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2018). Pengaruh Jenis Pelarut pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan* (ITEPA), *7*(4), 213. https://download.garuda.kemdikbud.go.id/article.php?article=1351925&val=948

Vijayan, V., Jasmin, C., Anas, A., Parakkaparambil Kuttan, S., Vinothkumar, S., Perunninakulath Subrayan, P., & Nair, S. (2017). Sponge-associated bacteria produce non-cytotoxic melanin which protects animal cells from photo-toxicity. *Applied biochemistry and biotechnology*, *183*(1), 396-411. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2453-0

Wahyuni, W., Yusuf, M. I., Malik, F., Lubis, A. F., Indalifiany, A., & Sahidin, I. (2019). Efek imunomodulator ekstrak etanol spons *Melophlus sarasinorum* terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag pada mencit jantan Balb/C. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)(e-Journal)*, *5*(2), 147-157. DOI: 10.22487/j24428744.0.v0.i0.13611

Walewangko, G. V.Ch., Boddhi, W., & Kepel, B.J. (2015). Uji resistensi bakteri escherichia coli yang diisolasi dari plak gigi menggunakan merkuri dan ampisilin. *Jurnal e-Biomedik*, *3*(1), 118-124 https://doi.org/10.35790/ebm.v3i1.6634

Wantania, L. L., Ginting, E. L., & Wullur, S. (2016). Isolasi bakteri simbion dengan spons dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, *3*(1), 57-65. https://doi.org/10.35801/jlppmsains.3.1.2016.15208

Wassenaar, T.M. (2012). *Bacteria: The Benign, the Bad, and the Beautiful*. Jhon Wiley & Sons Inc. Canada.

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163-175. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521

Willey, J. M., Sherwood L.M., & Woolverton C, J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology seventh Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York.

Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, *6*(2), 247-258. https://doi.org/10.29122/jbbi.v6i2.3084

Yang, J., Wang, C., Guo, Q., Deng, W., Du, G., & Li, R. (2022). Isolation of the thermostable β-glucosidase-secreting strain *Bacillus altitudinis* JYY-02 and its application in the production of Gardenia Blue. *Microbiology Spectrum*, *10*(4), e01535-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.01535-22

Yati, S. J., Sumpono., & Candra, N. (2018). Potensi Aktivitas Antioksidan

Metabolit Sekunder dari Bakteri Endofit Pada Daun *Moringa Oleifera L*. *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia, 2*(1), 82-87. https://doi.org/10.33369/atp.v2i1.4744

Yuliani, N.N. & Dienina, D.P. (2015). Uji aktivitas antioksidan infusa daun kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) Dengan Metode 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Jurnal info kesehatan*, *13*(2), 1060-1082. https://core.ac.uk/download/pdf/229499467.pdf

Yuliani, S., & Fatimah, S. (2018). Karakterisasi *Bacillus thuringiensis* dari tanah pertanian sebagai bioinsektisida potensial. *Jurnal Biologi Tropis*, *18*(3), 202–208.

Yuniarti, A., & Pranowo, H. D. (2018). Aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons laut asal perairan Karimunjawa terhadap bakteri patogen. *Jurnal Ilmu Kelautan*, *23*(1), 21–28. https://doi.org/10.14710/ik.ijms.23.1.21-28

Yunita, E. A., Suparpti, N. H., & Hidayat, J. W. (2009). Pengaruh ekstrak daun teklan (*Eupatorium riparium*) terhadap mortalitas dan perkembangan larva *Aedes aegypti*. *BIOMA, 11*(1), 11-17. https://eprints.undip.ac.id/1990/1/Bioma_Nanik_Juni_2009.pdf

Yuwono, Triwibowo. (2005). *Biologi Molekuler*. UGM Press. Yogyakarta

Zeng, Q., Xie, J., Li, Y., Gao, T., Zhang, X., & Wang, Q. (2021). Comprehensive Genomic Analysis of the endophytic bacillus altitudinis strain GLB197, a potential biocontrol agent of grape downy mildew. *Frontiers in Genetics*, *12*, 729603. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.729603

Zulharmitta, Z., Elrika, D. & Rivai, H. (2010). Penentuan Pengaruh Jenis Pelarut Ekstraksi Terhadap Perolehan Kadar Senyawa Fenolat dan Daya Antioksidan Dari Herba Miniran (*Phyllanthus niruri* L.). *Jurnal Farmasi Higea*, *2*(1):37-45. https://download.garuda.kemdikbud.go.id/article.php?article=969412&val=14917