

**KARAKTERISASI SENYAWA EKSTRAK BAKTERI SIMBION SPONS
DAN AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Vibrio***

SKRIPSI

Oleh

**ANNISHA AGUSVIAN PUTRI
2014221001**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

**KARAKTERISASI SENYAWA EKSTRAK BAKTERI SIMBION SPONS
DAN AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Vibrio***

Oleh

ANNISHA AGUSVIAN PUTRI

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
2026**

ABSTRAK

KARAKTERISASI SENYAWA EKSTRAK BAKTERI SIMBION SPONS DAN AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Vibrio*

Oleh

ANNISHA AGUSVIAN PUTRI

Spons laut merupakan organisme yang memiliki hubungan simbiosis dengan berbagai bakteri penghasil metabolit sekunder bioaktif, termasuk senyawa antibakteri yang berpotensi menghambat berbagai spesies *Vibrio* patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, dan *Vibrio alginolyticus*, serta mengkarakterisasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Delapan isolat berasal dari perairan Pahawang diekstraksi menggunakan pelarut metanol, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dan air. Aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode difusi cakram pada dua tahap, yaitu uji ekstrak kasar dan uji fraksi. Karakterisasi senyawa dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan penyemprotan reagen vanilin-asam sulfat untuk menentukan golongan metabolit sekunder, serta mengidentifikasi molekuler menggunakan BLAST N pada database NCBI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat SB-16, SB-22, dan SB-47 memiliki aktivitas terbesar, dengan fraksi etil asetat menghasilkan zona hambat lebih besar dibandingkan fraksi air. Analisis KLT menghasilkan bercak berwarna coklat dengan nilai R_f tinggi yang mengindikasikan keberadaan senyawa terpenoid. Identifikasi molekuler melalui analisis BLAST menunjukkan kesesuaian tinggi dengan genus *Vibrio*, sehingga bakteri simbion spons tersebut berpotensi sebagai sumber antibakteri terhadap bakteri vibriosis.

Kata kunci: Antibakteri, Bakteri, Senyawa, Spons, *Vibrio*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF CHEMICAL COMPOUND OF SPONGE BACTERIAL SYMBION EXTRACT AND ACTIVITY AGAINST PATHOGENIC *Vibrio* sp.

By

ANNISHA AGUSVIAN PUTRI

Marine sponges have symbiont, include bacteria that capable to produce bioactive secondary metabolites. The bioactive antibacterial compounds allegedly have potential to inhibit multiple pathogenic *Vibrio* species. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of sponge-associated bacterial extracts against *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio alginolyticus*, and to characterize the bioactive compounds contained within. Eight bacterial isolates obtained from the waters of Pahawang were extracted using methanol and subsequently fractionated with ethyl acetate and water. Antibacterial activity was assessed using the disk diffusion method in two stages, namely crude extract testing and fraction testing. Compound characterization was carried out using thin-layer chromatography (TLC) with vanillin–sulfuric acid reagent to determine metabolite classes, and molecular identification was performed through BLAST N analysis using the NCBI database. The results showed that isolates SB-16, SB-22, and SB-47 exhibited the strongest activity, with ethyl acetate fractions producing larger inhibition zones than aqueous fractions. TLC analysis revealed brown spots with high R_f values, indicating the presence of terpenoid compounds. Molecular identification showed high similarity to the genus *Vibrio*, suggesting that these sponge-associated bacteria have potential as antibacterial sources against vibriosis causing pathogens.

Keywords: Antibacterial, Bacteria, Extract, Sponge, *Vibrio*

Judul Skripsi : KARAKTERISASI SENYAWA EKSTRAK
BAKTERI SIMBION SPONS DAN AKTIVITAS
TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Vibrio*

Nama Mahasiswa : **Annisha Agusvian Putri**

Nomor Pokok Mahasiswa : 2014221001

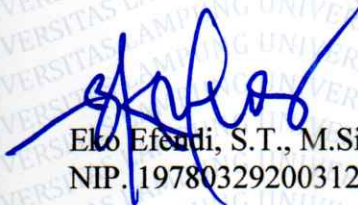
Program Studi : Ilmu Kelautan

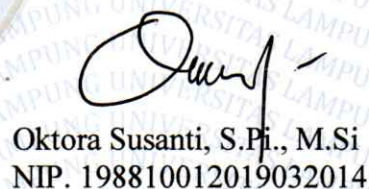
Fakultas : Pertanian




MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Eko Efeandi, S.T., M.Si.
NIP. 197803292003121001


Oktora Susanti, S.Pi., M.Si.
NIP. 198810012019032014

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan


Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 198309232006042001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

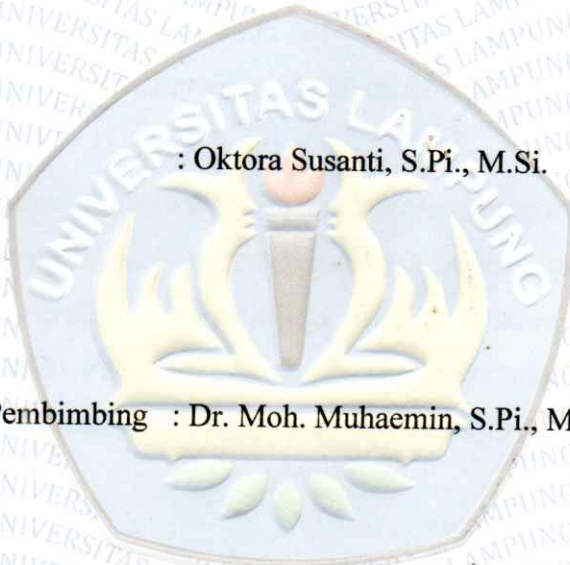
Ketua : Eko Efendi, S.T., M.Si.



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



Penguji Bukan Pembimbing : Dr. Moh. Muhaemin, S.Pi., M.Si.



Tanggal lulus ujian skripsi: 29 Januari 2026



KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS LAMPUNG
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN

Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145 Telp (0721) 704946 Fax (0721) 770347

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi yang berjudul “**Karakterisasi Ekstrak Bakteri Symbion Spons Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Vibrio* Patogen**” tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh pihak lain untuk mendapatkan karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebut dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata dalam naskah skripsi ini ditemukan dan terbukti terdapat unsur-unsur fabrikasi, falsifikasi, plagiat dan konflik kepentingan saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (S1) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Bandar Lampung, 18 Februari 2026

Yang membuat pernyataan



Annisha Agusvian Putri
NPM. 2014221001

RIWAYAT HIDUP

Annisha Agusvian Putri, lahir di Bandar Lampung, pada tanggal 05 Agustus 2002. Penulis lahir dari pasangan Bapak Agus Rustiawan dan Ibu Devianti sebagai anak ketiga. Penulis menempuh pendidikan dasar di SDN 2 Rawa Laut, Bandar Lampung pada tahun 2008 – 2014, dilanjutkan ke pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Bandar Lampung pada tahun 2014 – 2017, dan pendidikan menengah atas di SMAN 15 Bandar Lampung pada tahun 2017 – 2020.

Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang perguruan tinggi di Universitas Lampung, hingga akhirnya dapat menempuh kuliah Strata 1 di Prodi Ilmu Kelautan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2020. Penulis telah mengikuti salah satu organisasi kemahasiswaan tingkat Universitas, yaitu Koperasi Mahasiswa Universitas Lampung (KOPMA UNILA).

Selama masa studi, penulis pernah menjadi asisten pada mata kuliah Bionatural Produk Kelautan pada tahun 2024. Penulis pernah mengikuti kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Way Panas, Tanggamus, dan kegiatan Praktik Umum (PU) di Badan Meteorologi, Klimatologi, dan Geofisika (BMKG) Stasiun Meteorologi Maritim Kelas IV, Bandar Lampung.

Kepada Allah SWT yang selalu memberikan kekuatan dan rasa syukur serta untuk kedua orang tua dan kakak yang tidak pernah lupa memberikan semangat, do'a, dan cinta terbaik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan ucapan rasa syukur panjatkan kepada Allah SWT, atas berkat rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi dengan judul “*Karakterisasi Senyawa Ekstrak Bakteri Symbion Spons Aktivitas Terhadap Bakteri Patogen Vibrio*” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P. selaku Dekan FP Unila;
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;
4. Oktora Susanti, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Pembantu/Sekretaris dan Dosen Pembimbing Akademik;
5. Dr. Moh. Muhaemin, S.Pi., M.Si. selaku Penguji Utama;
6. Kedua orang tua, Bapak Agus Rustiawan dan Ibu Devianti;
7. Kakak, Agvina Aprilia Rustiawan dan Agviana Destyra Rustiawan;

Bandar Lampung, Maret 2026

Annisha Agusvian Putri
2014221001

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
1.4 Kerangka Pikir.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Spons.....	6
2.2 Potensi Senyawa Bioaktif Spons.....	7
2.3 Bakteri Simbion pada Spons.....	9
2.4 Potensi Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Spons.....	9
2.5 Bakteri <i>Vibrio</i>	12
III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat.....	16
3.2 Alat dan Bahan.....	16
3.3 Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Sterilisasi Alat.....	20
3.3.2 Pembuatan Media.....	20
3.3.3 Kultivasi Bakteri Simbion Spons.....	21
3.3.4 Ekstraksi Bakteri Simbion Spons.....	22
3.3.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bakteri Simbion.....	23
3.3.6 Fraksinisasi Ekstrak.....	25
3.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fraksi Terhadap Bakteri <i>Vibrio</i>	26
3.3.8 Analisis Senyawa Ekstrak.....	27
3.3.9 Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Spons.....	28
3.4 Pengolahan Data dan Analisis Data.....	28

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Ekstraksi Bakteri Symbion Spons.....	30
4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fraksi Bakteri Symbion Spons.....	31
4.3 Fraksinisasi Ekstrak	35
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fraksi Bakteri Symbion Spons	36
4.5 Profil Senyawa	38
4.6 Identifikasi Molekuler Bakteri Symbion Spons.....	42
V. SIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Simpulan	44
5.2 Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Senyawa bioaktif spons dan potensi bioaktivitas	8
2. Senyawa bioaktif bakteri simbion spons dan potensi bioaktivitas.....	10
3. Alat dan spesifikasi yang digunakan.....	16
4. Bahan dan spesifikasi yang digunakan	18
5. Hasil ekstrak dan rendemen ekstrak isolat bakteri simbion spons.....	30
6. Zona hambat uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen <i>V. vulnificus</i> ..	31
7. Zona hambat uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen <i>V. alginolyticus</i>	32
8. Zona hambat uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen <i>V. parahaemolyticus</i>	32
9. Zona hambat uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen <i>V. harveyi</i>	32
10. Ringkasan isolat unggul terhadap masing-masing bakteri patogen	34
11. Berat ekstrak fraksi aquades dan fraksi etil asetat bakteri simbion spons.....	35
12. Zona hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak fraksi bakteri simbion.....	36
13. Hasil identifikasi isolat bakteri simbion spons berdasarkan analisis BLAST	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka pikir penelitian.....	5
2. Struktur morfologi spons. Sumber: Marzuki, 2018	6
3. Bentuk bakteri vibrio, (a) <i>Vibrio vulnificus</i> (CDC PHIL, 2020), (b) <i>Vibrio harveyi</i> (Surhone et al., 2010), (c) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Yu, 2022), (d) <i>Vibrio alginolyticus</i> (Ye et al., 2019).	14
4. Prosedur penelitian.....	19
5. Profil KLT hasil fraksinisasi pada UV 366 nm, (a) SB-47 etil asetat:n-heksana (2:1), (b) SB-47 etil asetat:n-heksana(1:2), (c) SB-16 etil asetat:n-heksana (1:1).	39
6. Visualisasi hasil KLT setelah penyemprotan reagen vanilin-asam sulfat pada SB-47 dengan eluen etil asetat:n-heksana (2:1).....	40
7. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.vulni</i> (a) SB-16, (b) SB-22, (c) SB-25, (d) SB-27.	56
8. Bakteri <i>V. vulni</i> (e) SB-47, (f) SB-51, (g) SB-53, (h) SB-73.....	57
9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.alginolyticus</i> (a) SB-16, (b) SB-22, (c) SB-25, (d) SB-27.....	58
10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.alginolyticus</i> (e) SB-47, (f) SB-51, (g) SB- 53, (h), SB-73.	59
11. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.parahaemolitycus</i> (a) SB-16, (b) SB-22, (c) SB-25, (d) SB-27.....	60
12. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.parahaemolitycus</i> (e) SB-47, (f)SB-51, (g) SB-53, (h) SB-73.	61
13. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.harveyi</i> (a) SB-16, (b) SB-22, (c) SB-25, (d) SB-27.	62
14. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri <i>V.harveyi</i> (e) SB-47, (f) SB-51, (g) SB-53, (h) SB-73.....	63
15. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak fraksi (a) <i>V.vulnificus</i> , (b) <i>V.alginolyticus</i> , (c) <i>V.parahemolyticus</i> (d) <i>V.harveyi</i>	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons.....	56
2. Dokumentasi hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak fraksi	64

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Spons laut dikenal memiliki hubungan simbiosis yang saling menguntungkan dengan berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri, fungi, archaea, dan alga. Spons banyak bersimbion dengan bakteri, baik Gram positif maupun Gram negatif, yang memainkan peran penting dalam kesehatan spons. Bakteri simbion ini dapat memproduksi senyawa bioaktif yang berfungsi untuk melindungi spons dari patogen dan meningkatkan daya tahannya. Selain bakteri, spons juga dapat bersimbion dengan fungi yang menghasilkan senyawa antimikroba (Taylor et al., 2007). Archaea, meskipun kurang umum, juga dapat berperan dalam proses biokimia dalam tubuh spons. Di samping itu, beberapa spons memiliki simbiosis dengan alga fotosintetik, seperti dinoflagellata, yang membantu spons dalam mendapatkan energi melalui fotosintesis. Hubungan simbiotik yang kompleks ini tidak hanya penting bagi kelangsungan hidup spons, tetapi juga berkontribusi pada keseimbangan ekosistem laut yang kaya akan keanekaragaman hayati (Marzuki, 2018).

Spons laut memiliki potensi besar dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan seperti antibiotik, antitumor, antiinflamasi, inhibitor enzim, dan lainnya (Brinkmann et al., 2017). Senyawa aktif yang dihasilkan oleh spons dapat bervariasi dan terdiri dari alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, dan saponin (Wardany et al., 2023). Contohnya, spons *Stryphuous ponderosus* mengandung senyawa bioaktif alkaloid dan terpenoid yang berpotensi sebagai antikanker (Hudayah et al., 2017). Jenis spons lain, *Callyspongia aerizusa*, memiliki senyawa bioaktif alkaloid, terpenoid, steroid, dan saponin yang menunjukkan potensi sebagai agen antibakteri (Mangurana

et al., 2019). Selain itu, *Haliclona* sp. juga memiliki senyawa bio-aktif alkaloid yang berpotensi sebagai antibakteri (Wewengkang et al., 2014). Spons *Spirastrella tylyssa carteri* diketahui menghasilkan senyawa bioaktif etil ester yang memiliki potensi sebagai antitumor (Bashari et al., 2019). *Hyrtios erectus* mengandung senyawa bioaktif alkaloid yang menunjukkan potensi sebagai antiproliferatif (Muthiyar et al., 2017).

Dalam ekosistem laut yang kaya dan beragam, bakteri simbiosis spons sering kali menghasilkan senyawa bioaktif dengan potensi sebagai agen antibakteri. Misalnya, spons *Aplysina aerophoba* diketahui memiliki bakteri simbiosis *Helicobacter pylori* yang menghasilkan senyawa bioaktif alkaloid dengan potensi antibakteri (Bakhtara et al., 2018). Jenis spons lain seperti *Callyspongia aeri-zusa* mengandung bakteri simbiosis dari kelompok bakteri gram positif yang memproduksi senyawa bioaktif berupa alkaloid, terpenoid, steroid, dan saponin yang juga menunjukkan aktivitas antibakteri (Mangurana et al., 2019). Selain itu, spons *Aplysina* sp. yang memiliki bakteri simbiosis *Bacillus* sp. diketahui menghasilkan senyawa bioaktif flavonoid dan steroid dengan potensi antimikroba (Wibowo et al., 2020). Tidak hanya antibakteri, beberapa spons juga menunjukkan potensi terapeutik lain seperti spons *Spirastrella* sp. dan *Plakina-strella* sp. yang memiliki bakteri simbiosis dari kelompok bakteri gram positif, menunjukkan potensi anthelmintika (Faisal et al., 2014). Anthelmintika adalah senyawa yang digunakan untuk mengobati infeksi cacing parasit, yang sering menjadi masalah kesehatan pada manusia maupun hewan. Senyawa-senyawa anthelmintika ini bekerja dengan cara melumpuhkan atau membunuh cacing parasit yang ada di dalam tubuh inang.

Senyawa aktif yang dihasilkan oleh simbiosis spons dapat bervariasi tergantung pada jenis simbiosis dan kondisi lingkungan tempat spons tumbuh. Variasi dalam komposisi kimia bakteri simbiosis, misalnya, dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu, salinitas, dan kedalaman perairan. Oleh karena itu, penelitian mengenai hubungan antara lokasi dan komposisi senyawa aktif sangat penting untuk memahami keanekaragaman biologis dan potensi terapeutik spons. Spons dapat bersimbiosis dengan satu jenis bakteri, tetapi juga dapat bersimbiosis dengan dua hingga enam jenis bakteri. Jika satu jenis spons diambil dari

dua lokasi sampling yang berbeda, ada kemungkinan ditemukan jenis bakteri simbion yang berbeda, serta variasi dalam jumlah simbion. Hal ini menunjukkan bahwa lokasi atau habitat spons, ketersediaan nutrisi, pencahayaan, salinitas, kekeruhan, serta faktor-faktor seperti arus laut dan gelombang dapat mempengaruhi karakter mikrosimbion yang terdapat pada spons (Marzuki, 2018).

Di perairan Pahawang, yang dikenal dengan keanekaragaman hayatinya yang kaya, spons dapat bersimbion dengan berbagai jenis bakteri dan mikroorganisme lainnya. Lokasi ini memberikan peluang menarik untuk meneliti ekstrak bakteri simbion dari spons, terutama terkait dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen seperti *Vibrio* sp. Sebuah penelitian sebelumnya telah berhasil mengumpulkan sejumlah bakteri simbion spons di perairan Pahawang, tetapi delapan isolat bakteri yang diambil belum pernah dianalisis lebih lanjut. Oleh karena itu, penting untuk mengkarakterisasi senyawa bioaktif dan menilai potensi antibakterinya terhadap bakteri *Vibrio* patogen, yang dapat menyebabkan penyakit serius pada organisme laut dan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi senyawa bioaktif yang dihasilkan dari ekstrak bakteri simbion spons, yang dapat digunakan sebagai agen antibakteri baru.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah:

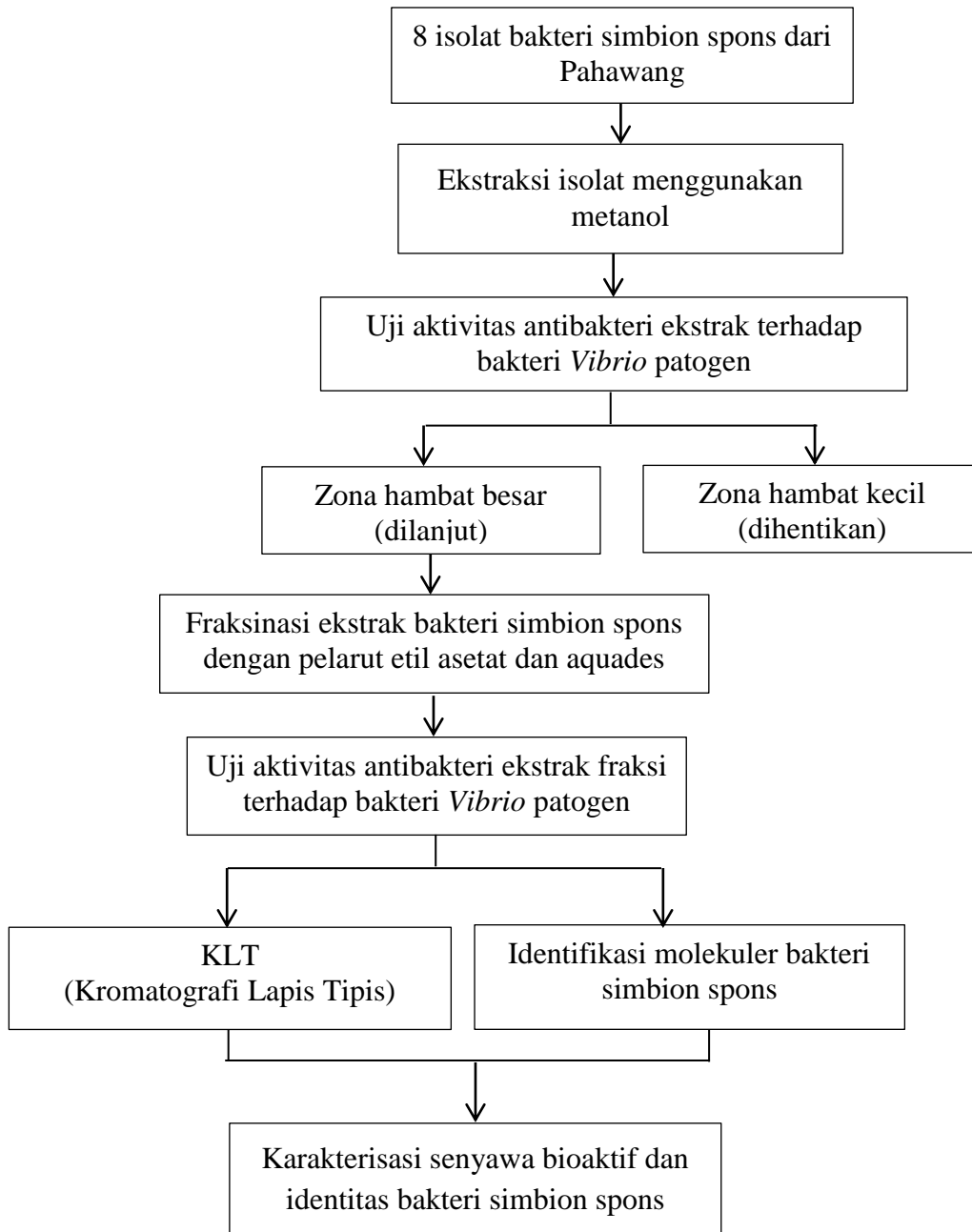
1. Mengetahui hasil skrining aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion spons terhadap bakteri *Vibrio* patogen.
2. Menganalisis aktivitas hasil fraksinasi ekstrak bakteri simbion spons sebagai antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* patogen.
3. Mengetahui kelompok senyawa bioaktif serta identitas bakteri simbion spons yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* patogen.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi senyawa bioaktif dari bakteri simbion spons yang memiliki aktivitas antibakteri, sehingga dapat menjadi dasar dalam pengembangan agen antibakteri alternatif untuk menghambat bakteri *Vibrio* patogen.

1.4 Kerangka Pikir

Perairan Pahawang yang kaya akan keanekaragaman hayati lautnya merupakan habitat berbagai jenis spons yang memiliki hubungan simbiosis dengan bakteri. Penelitian sebelumnya telah dikumpulkan sejumlah isolat bakteri simbiosis spons, dan delapan isolat yang berasal dari Pahawang dipilih untuk diteliti lebih lanjut. Isolat tersebut diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol untuk memperoleh ekstrak bakteri simbiosis spons. Ekstrak kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Vibrio* patogen. Isolat yang menunjukkan zona hambat kecil dihentikan, sedangkan isolat dengan zona hambat besar dilanjutkan ke tahap penelitian berikutnya. Isolat terpilih selanjutnya difraksinasi menggunakan dua jenis pelarut, yaitu etil asetat dan aquades digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan polaritas. Fraksi yang dihasilkan kemudian diuji kembali aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Vibrio* patogen untuk memastikan fraksi mana yang memiliki potensi antibakteri terbesar. Fraksi dengan zona hambat tinggi dilanjutkan ke tahap analisis berikutnya. Tahap selanjutnya adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang dilakukan untuk mengetahui pola pemisahan senyawa dan mengidentifikasi kelompok metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibakteri. Selain itu, dilakukan identifikasi molekuler terhadap bakteri simbiosis yang terpilih untuk mengetahui identitas bakteri tersebut secara genetik. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran komprehensif mengenai aktivitas antibakteri, kelompok senyawa bioaktif, serta identitas bakteri simbiosis spons yang berpotensi sebagai sumber senyawa antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* patogen. Kerangka pikir penelitian ini disajikan pada Gambar 1.

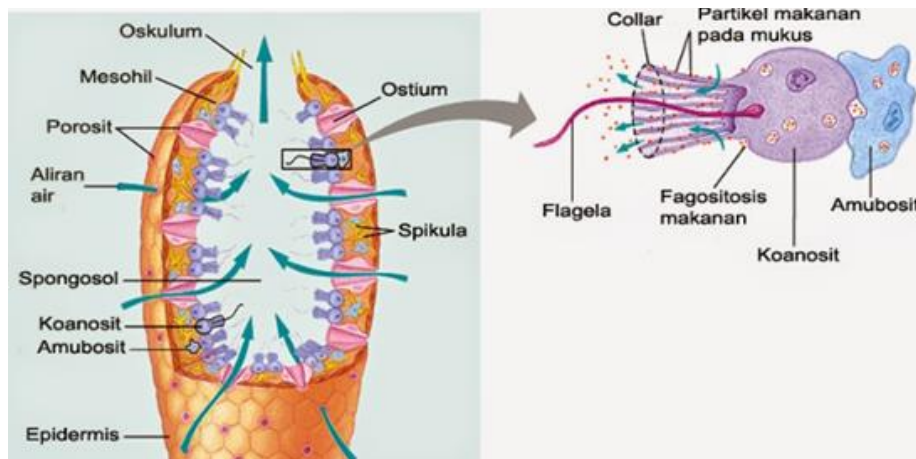


Gambar 1. Kerangka pikir penelitian.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spons

Spons merupakan organisme multiseluler unik dari filum Porifera yang memiliki struktur yang berbeda dengan organisme multiseluler lainnya. Sebagian besar tubuh spons ditandai dengan banyak pori yang membentuk saluran untuk sirkulasi air yang berkelanjutan (Marzuki et al., 2015a; Ismet et al., 2011). Spons tidak memiliki sistem saraf, saluran pencernaan, maupun peredaran darah. Sebagai gantinya, spons terus menerus bergantung pada aliran air melalui tubuh mereka untuk mendapatkan makanan, oksigen, dan mengeluarkan limbah. Kondisi aliran air ini harus tetap terjaga agar terus berlangsung (Marzuki, 2018).



Gambar 2. Struktur morfologi spons.

Sumber: Marzuki, 2018

Secara umum, struktur spons terdiri atas *osculum*, *mesohyl*, *spongocoel*, *choanocyt*, *amoebocyt*, dan *spicula* (Gambar 2). Spons memiliki tubuh berpori dengan sistem saluran air yang memungkinkan terjadinya aliran air masuk dan

keluar, sehingga berperan sebagai organisme *filter feeder*. Air masuk melalui pori-pori (*porocyte*) dengan membawa oksigen serta partikel makanan, kemudian mengalir ke dalam *spongocoel* dan keluar melalui *osculum*. Di dalam *spongocoel*, *choanocyte* yang memiliki flagelaberfungsi membentuk arus air dan menangkap partikel makanan melalui struktur kerahnya. Partikel makanan kemudian dicerna melalui proses fagositosis atau disalurkan ke *amoebocyte* untuk didistribusikan ke seluruh tubuh spons. *Amoebocyte* juga berperan dalam pembentukan spikula serta pembuangan sisa metabolisme. *Mesohyl* berfungsi sebagai jaringan penghubung yang menjadi tempat berbagai jenis sel, sedangkan epidermis melapisi bagian luar tubuh spons yang berfungsi sebagai pelindung (Marzuki, 2018).

Hidup spons yang menetap dapat ditemukan di berbagai habitat seperti berpasir, karang mati, batu, dan media lain yang memiliki struktur keras (Astro et al., 2013). Setiap spons memiliki anatomi dan bentuk sesuai lingkungan spesifiknya dan kondisi hidrodinamika perairan di mana spons tersebut hidup. Perairan pantai dangkal yang memiliki arus, ombak, serta gelombang yang besar, spesies spons yang ditemukan memiliki tubuh lunak mirip seperti cambuk yang fleksibel dan dapat digerakkan oleh arus. Sementara itu, di perairan yang lebih dalam yang di mana pergerakan airnya memiliki ciri bertubuh keras, kaku, dan berlimpah (Haris et al., 2021). Tubuh spons dapat dijadikan habitat bagi mikroorganisme lain dengan bersarang di tubuhnya, sedangkan mikroorganisme bertindak sebagai pertahanan yang dapat menghasilkan zat beracun sebagai respons terhadap perubahan lingkungan laut yang ekstrem karena pencemaran (Marzuki, 2018).

2.2 Potensi Senyawa Bioaktif Spons

Invertebrata laut seperti Porifera, Bryzoa, Cnidaria, dan Chordata merupakan penyumbang utama dalam produksi senyawa alami laut. Spons menjadi salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang menjadi sumber utama dari senyawa alami laut baru yang memiliki potensi bioaktif, namun belum sepenuhnya dimanfaatkan. Senyawa alami yang dihasilkan oleh spons antara lain terpenoid, alkaloid, dan steroid yang memiliki sifat antibakteri. Spons juga

diyakini mengandung senyawa seperti saponin, asam fenolik, glikosida, peptida, amina beserta turunannya, serta squalen dan turunannya yang berasal dari metabolit sekunder (Hardiningtias, 2009). Presentase keaktifan senyawa aktif yang terkandung dalam spesies laut ini lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa aktif yang berasal dari tumbuhan darat (Marzuki, 2018).

Senyawa bioaktif yang terdapat dalam spons memiliki potensi untuk digunakan dalam bidang biomedis, seperti antibiotik, antitumor, antiinflamasi, inhibitor enzim, dan lainnya. Senyawa-senyawa ini telah terbukti menunjukkan aktivitas yang kuat dalam berbagai uji *in vitro* dan *in vivo* (Varijakzhan et al., 2021). Spons laut diketahui menjadi habitat bagi beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40 persen dari total biomassa spons. Interaksi simbiosis antara bakteri dan spons laut menyebabkan organisme ini memiliki potensi antibakteri yang lebih besar daripada organisme darat dan laut lainnya (Wewengkang et al., 2014). Berikut merupakan beberapa potensi senyawa bioaktif yang ditemukan dari berbagai jenis spons (Tabel 1).

Tabel 1. Senyawa bioaktif spons dan potensi bioaktivitas

No.	Jenis Spons	Senyawa Bioaktif	Potensi	Sumber
1.	<i>Stryphuous ponderosus</i>	Alkaloid dan terpenoid	Antikanker payudara	(Hudayah et al., 2017)
2.	<i>Callyspongia aerizusa</i>	Alkaloid Terpenoid Steroid Saponin	Antibakteri	(Mangurana et al., 2019)
3.	<i>Haliclona sp.</i>	Alkaloid	Antibakteri	(Wewengkang et al., 2014)
4.	<i>Spirastrella tylissa carteri</i>	Etil ester	Antitumor	(Bashari et al., 2019)
5.	<i>Hyrtios erectus</i>	Alkaloid	Antiproliferatif	(Muthiyan et al., 2017).
6.	<i>Aplysina aerophoba</i>	Alkaloid	Antibakteri	(Bakhtra et al., 2018)
7.	<i>Axinella carteri</i>	Alkaloid dan terpenoid	Antitumor dan Antibakteri	(Handayani, 2012)

2.3 Bakteri Simbion pada Spons

Bakteri simbion pada spons adalah mikroorganisme yang hidup dalam hubungan simbiosis yang saling menguntungkan dengan spons laut. Spons laut, yang merupakan organisme bentik, hidup di lingkungan yang kompleks dan beragam. Mereka sering kali menghadapi persaingan ketat untuk sumber daya dan ancaman dari patogen serta predator. Dalam kondisi ini, spons telah mengembangkan hubungan simbiosis dengan berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri, untuk bertahan hidup dan beradaptasi. Bakteri simbion ini berperan penting dalam metabolisme spons, termasuk dalam proses nutrisi, detoksifikasi, dan pertahanan terhadap patogen.

Spons laut dikenal sebagai reservoir alami bagi berbagai senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas biologis, termasuk aktivitas antibakteri (Lee et al., 2001). Bakteri simbion yang hidup di dalam spons adalah produsen utama senyawa-senyawa ini. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri simbion dapat melindungi spons dari serangan mikroorganisme patogen dan predator. Senyawa-senyawa ini meliputi antibiotik alami, antijamur, antivirus, dan senyawa antipredator (Taylor et al., 2007). Bakteri simbion mampu menghasilkan berbagai metabolit sekunder yang kompleks, yang sering kali tidak ditemukan pada bakteri non-simbion. Kemampuan ini menjadikan bakteri simbion spons sebagai sumber potensial untuk menemukan senyawa baru yang dapat digunakan dalam pengembangan obat. Oleh karena itu, bakteri simbion spons menjadi sumber potensial untuk menemukan senyawa baru yang dapat digunakan dalam pengembangan obat, terutama sebagai agen antibakteri (Mehbub et al., 2014). Dalam penelitian ini, isolat bakteri simbion diperoleh dari berbagai spesies spons laut, yang disajikan dalam tabel berikut.

2.4 Potensi Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Spons

Bakteri simbion yang hidup dalam jaringan spons laut memiliki potensi besar dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan sebagai agen antibakteri. Senyawa-senyawa ini berperan penting dalam melindungi spons dari infeksi patogen dan predator, serta berkontribusi pada kelangsungan

hidup spons dalam ekosistem laut yang kompetitif. Bakteri simbiosis spons diketahui mampu menghasilkan berbagai metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis tinggi, termasuk antibiotik, antijamur, antivirus, dan antikanker (Taylor et al., 2007). Senyawa bioaktif dari bakteri simbiosis spons memiliki struktur kimia yang unik dan beragam, yang sering kali tidak ditemukan pada mikroorganisme non-simbiosis. Keragaman genetik dan metabolisme bakteri simbiosis memungkinkan mereka untuk menghasilkan senyawa dengan mekanisme aksi yang beragam dan spesifik terhadap berbagai target biologis. Hal ini menjadikan bakteri simbiosis spons sebagai sumber potensial untuk penemuan senyawa baru yang dapat mengatasi tantangan resistensi antibiotik.

Tabel 2. Senyawa bioaktif bakteri simbiosis spons dan potensi bioaktivitas

No.	Jenis Spons	Bakteri Simbiosis	Senyawa Bioaktif	Potensi	Sumber
1.	<i>Callyspongia aerizusa</i>	Kelompok bakteri Gram positif	Alkaloid Terpenoid Steroid Saponin	Antibakteri	(Mangurana et al., 2019)
2.	<i>Xestospongia testudinaria</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	Antimikroba	(Cita et al., 2017)
3.	<i>Axinella carteri</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Alkaloid dan terpenoid	Antitumor dan Antibakteri	(Handayani, 2012)
4.	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	famili Bacillaceae	Peptida	Antimikroba	(Kanagasabhapathy, 2005)
5.	<i>Aplysina sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	-	Antimikroba	(Wibowo et al., 2020)
6.	<i>Erylus discophorus</i>	<i>Vibrio sp.</i>	-	Antibakteri	(Graça et al., 2013)

Spons *Xestospongia testudinaria* memiliki bakteri simbiosis berupa *Bacillus licheniformis*, yang terbukti memiliki aktivitas antimikroba (Tabel 2). Hasil karakterisasi mikroskopis dan biokimia menunjukkan bahwa isolat ini memiliki sifat khas *Bacillus*, seperti bentuk batang, sifat Gram positif, dan aktivitas enzim katalase, yang sesuai dengan karakteristik *B. licheniformis*. Keberadaan simbiosis pada spons laut dipengaruhi oleh faktor ekologi. Spons *X. testudinaria* biasanya

bersimbiosis dengan bakteri penghasil senyawa bioaktif untuk mempertahankan diri dari infeksi patogen dan persaingan lingkungan. Kombinasi dari faktor-faktor ini mengonfirmasi bahwa *B. licheniformis* merupakan salah satu simbion utama spons *X. testudinaria* (Cita et al., 2017).

Spons laut *Axinella carteri*, yang ditemukan di perairan Sumatera Barat, mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid dan terpenoid. Senyawa ini telah terbukti memiliki potensi sebagai antitumor dan antibakteri, khususnya terhadap patogen *Ralstonia solanacearum*. Keberadaan bakteri simbion dalam spons ini mendukung aktivitas antibakteri, menjadikan *Axinella carteri* sebagai sumber bioaktif potensial yang bermanfaat untuk farmasi dan agroindustri. Faktor yang memungkinkan spons *Axinella carteri* memiliki bakteri simbion seperti *Ralstonia solanacearum* meliputi struktur spons yang berpori, yang memungkinkan bakteri masuk dan hidup di dalam tubuh spons. Selain itu, hubungan simbiotik ini menguntungkan spons karena bakteri dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memberikan perlindungan alami dari patogen eksternal serta berkontribusi pada efek antibakteri spons itu sendiri (Handayani, 2012).

Spons *Pseudoceratina purpurea* terbukti memiliki bakteri simbion dari famili *Bacillaceae*, khususnya *Bacillus* dan *Virgibacillus*, yang menghasilkan peptida bioaktif dengan aktivitas antimikroba dan antifouling. Interaksi mutualistik ini memungkinkan senyawa bioaktif dari bakteri simbion melindungi spons dari kolonisasi bakteri pengganggu, sehingga mendukung potensi simbion sebagai sumber alami untuk pengembangan agen antibakteri dan antifouling ramah lingkungan (Kanagasabh apathy, 2005). Spons *Aplysina* sp. memiliki bakteri simbion dari genus *Bacillus* sp. karena lingkungan laut yang kaya nutrisi, seperti di Pulau Enggano, mendukung keberadaan mikroorganisme ini. *Bacillus* sp. menyediakan perlindungan bagi spons melalui produksi senyawa antimikroba yang melindungi spons dari patogen. Selain itu, kompatibilitas fisiologis antara *Bacillus* sp. dan spons memungkinkan bakteri ini tumbuh dalam kondisi yang sama. Interaksi ini bersifat mutualisme, di mana spons mendapatkan perlindungan sementara *Bacillus* sp. memperoleh tempat hidup dan nutrisi dari spons (Wibowo et al., 2020).

Berdasarkan hasil penelitian Graca et al. (2013), bakteri dari genus *Vibrio* diidentifikasi sebagai bagian dari komunitas bakteri heterotrof yang hidup sebagai simbiosis pada spons *Erylus discophorus*. Beberapa isolat *Vibrio* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji seperti *Vibrio harveyi* dan *Aliivibrio fischeri*, sehingga mengindikasikan peran ekologisnya dalam mempertahankan kesehatan spons melalui produksi metabolit bioaktif. Studi tersebut juga menegaskan bahwa anggota Vibrionaceae merupakan kelompok bakteri laut yang dikenal kaya akan metabolit aktif secara biologis, sehingga keberadaannya sebagai simbiosis pada spons berpotensi memberikan kontribusi penting terhadap mekanisme pertahanan kimia spons. Dengan demikian, genus *Vibrio* dapat dianggap sebagai salah satu bakteri simbiosis yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif meskipun jenis metabolit spesifiknya tidak dijelaskan dalam penelitian tersebut (Graca et al., 2013).

2.5 Bakteri *Vibrio*

Bakteri *Vibrio* adalah kelompok bakteri Gram-negatif yang hidup di perairan laut maupun tawar. Genus *Vibrio* terdiri atas lebih dari 100 spesies, sebagian di antaranya bersifat patogen dan berpotensi menimbulkan penyakit pada manusia maupun hewan laut (Suharni et al., 2008). Bakteri patogen memanfaatkan materi organik dari inangnya (saprofit) dan dapat menyebabkan penyakit dengan dampak dari ringan hingga kematian, sekaligus menurunkan kualitas produk perikanan (Ihsan et al., 2020). Penelitian difokuskan pada empat spesies *Vibrio* yang umum ditemukan di lingkungan laut dan dikenal patogenik, yaitu *Vibrio vulnificus* (Reichelt et al., 1979; Farmer, 1980), *Vibrio harveyi* (Johnson & Shunk, 1936), *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino et al., 1953; Sakazaki et al., 1963), dan *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto et al., 1961; Sakazaki, 1968). Keempat spesies ini diketahui sering menyebabkan infeksi pada organisme laut serta menimbulkan dampak signifikan terhadap kesehatan ikan dan kualitas produk perikanan.

Meskipun beberapa spesies dikenal sebagai patogen penyebab vibriosis, beberapa isolat *Vibrio* juga dapat hidup sebagai simbiosis pada spons laut. Graca et al. (2013) melaporkan keberadaan isolat *Vibrio* sebagai bagian dari komunitas

bakteri heterotrof pada spons *Erylus discophorus*, beberapa diantaranya menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri lain. Hal ini menunjukkan fleksibilitas ekologis *Vibrio*, di mana strain tertentu bersifat patogen, sementara strain lain hidup secara komensal atau mutualistik, tergantung variasi strain, kondisi lingkungan, dan ekspresi gen virulensi. Untuk memahami keempat spesies *Vibrio*, yaitu *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, dan *Vibrio alginolyticus*, perlu diketahui karakteristik masing-masing spesies.

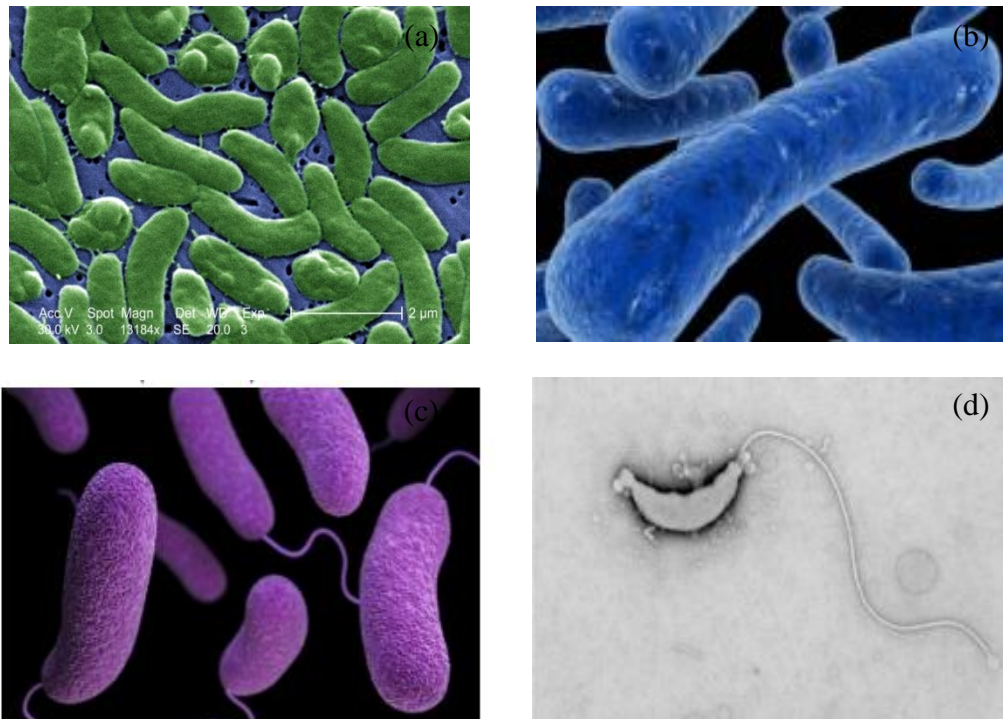
Taksonomi bakteri *Vibrio* menurut Garrity et al. (2016) sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Ordo : Vibrionales
 Family : Vibrionaceae
 Genus : *Vibrio*
 Spesies : *Vibrio vulnificus*
 Vibrio harveyi
 Vibrio parahaemolyticus
 Vibrio alginolyticus

Vibrio vulnificus, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, dan *Vibrio alginolyticus* adalah bakteri Gram-negatif yang hidup secara alami di lingkungan estuari dan laut, terutama di perairan hangat. *Vibrio vulnificus* tumbuh optimal pada suhu sekitar 30°C, sedangkan *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus* beradaptasi pada suhu sekitar 35°C (Urquhart et al., 2016). *Vibrio alginolyticus*, yang juga banyak ditemukan di daerah tropis, umumnya tumbuh pada suhu antara 30°C-37°C (Tukan et al., 2023).

Vibrio vulnificus memiliki morfologi berupa batang yang motil dengan bentuk yang melengkung dan memiliki flagelum tunggal yang terletak di salah satu ujung (polar) (Oliver, 2005) (Gambar 3a). *Vibrio harveyi* memiliki morfologi berbentuk batang dengan flagelum yang memungkinkannya untuk bergerak secara aktif dalam air, serta mampu menghasilkan bioluminesensi (cahaya) (Gambar 3b) (Kusumaningrum et al., 2017). *Vibrio parahaemolyticus* memiliki

bentuk batang yang sedikit melengkung, dilengkapi dengan flagel tunggal untuk pergerakan (Gambar 3c). *Vibrio alginolyticus* memiliki morfologi berupa batang motil dengan flagelum untuk gerakan aktif dalam air, tampak tidak berwarna, berbentuk pendek atau agak bulat, dan koloni yang tumbuh menyebar serta tampak basah (Zhu et al., 2017) (Gambar 3d). Berikut merupakan gambar dari keempat bakteri di atas:



Gambar 3. Bentuk bakteri vibrio, (a) *Vibrio vulnificus* (CDC PHIL, 2020), (b) *Vibrio harveyi* (Surhone et al., 2010), (c) *Vibrio parahaemolyticus* (Yu, 2022), (d) *Vibrio alginolyticus* (Ye et al., 2019).

Vibrio vulnificus, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, dan *Vibrio alginolyticus* adalah bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia dan hewan laut. Menurut Annisa et al. (2015), *Vibrio vulnificus* dapat menyebabkan infeksi serius pada manusia melalui konsumsi makanan laut yang terkontaminasi. Sementara itu, menurut Newton et al. (2012), *Vibrio parahaemolyticus* berpotensi menyebabkan keracunan makanan yang signifikan melalui konsumsi makanan laut mentah atau kurang matang. Kedua bakteri ini memiliki gejala yang serupa, yaitu muntah, diare, dan sakit perut, yang dapat berpotensi fatal, terutama pada individu dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah.

Bakteri patogen *Vibrio harveyi* menyebabkan Vibriosis pada udang, yang mengakibatkan berbagai masalah serius di sektor perikanan dan akuakultur, seperti kematian total, penurunan hasil produksi, dan penurunan kualitas air (Nurama et al., 2023). Menurut Murtidjo (2003), *Vibrio alginolyticus* adalah bakteri yang sering menyebabkan masalah pada larva udang windu, menimbulkan penyakit yang dikenal sebagai bakteri menyala. Larva yang terinfeksi tampak bercahaya dalam kondisi gelap. Penyakit ini biasanya muncul di musim hujan, ketika salinitas menurun dan terdapat perbedaan suhu yang signifikan antara siang dan malam hari (Amri, 2003).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2024 hingga Mei 2025. Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Oseanografi, Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan. Selain itu, penelitian juga dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan diuraikan pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Alat dan spesifikasi yang digunakan

No	Alat	Spesifikasi	Merk	Keterangan/fungsi
1	Autoklaf	Pressure steam sterilizer YXQ.SG41.280CS	-	Sterilisasi alat dan bahan.
2	Bunsen	-	-	Sterilisasi di dalam <i>laminar air flow</i> .
3	Cawan petri	100x15mm ²	Anumbra	Wadah media tumbuh
4	<i>Erlenmeyer</i>	300ml	Iwaki	Alat membuat media.
5	Gelas ukur	100mL	-	Alat pengukur pelarut saat membuat media.
6	<i>Hot plate</i>	Hot plate magnetic stirrer SH-2	-	Menghomogenkan media
7	Inkubator	BC60	Froilabo	Tempat inkubasi mikroba dengan suhu terkontrol.
8	Jangka sorong	-	-	Mengukur zona bening.
9	Jarum ose	-	-	Menginokulasi mikroba.
10	Jas lab	-	-	Alat pelindung tubuh.
11	<i>Cooler incubator</i>	FOC-215i	-	Menyimpan media kosong.

Tabel 3. Alat dan spesifikasi yang digunakan (lanjutan)

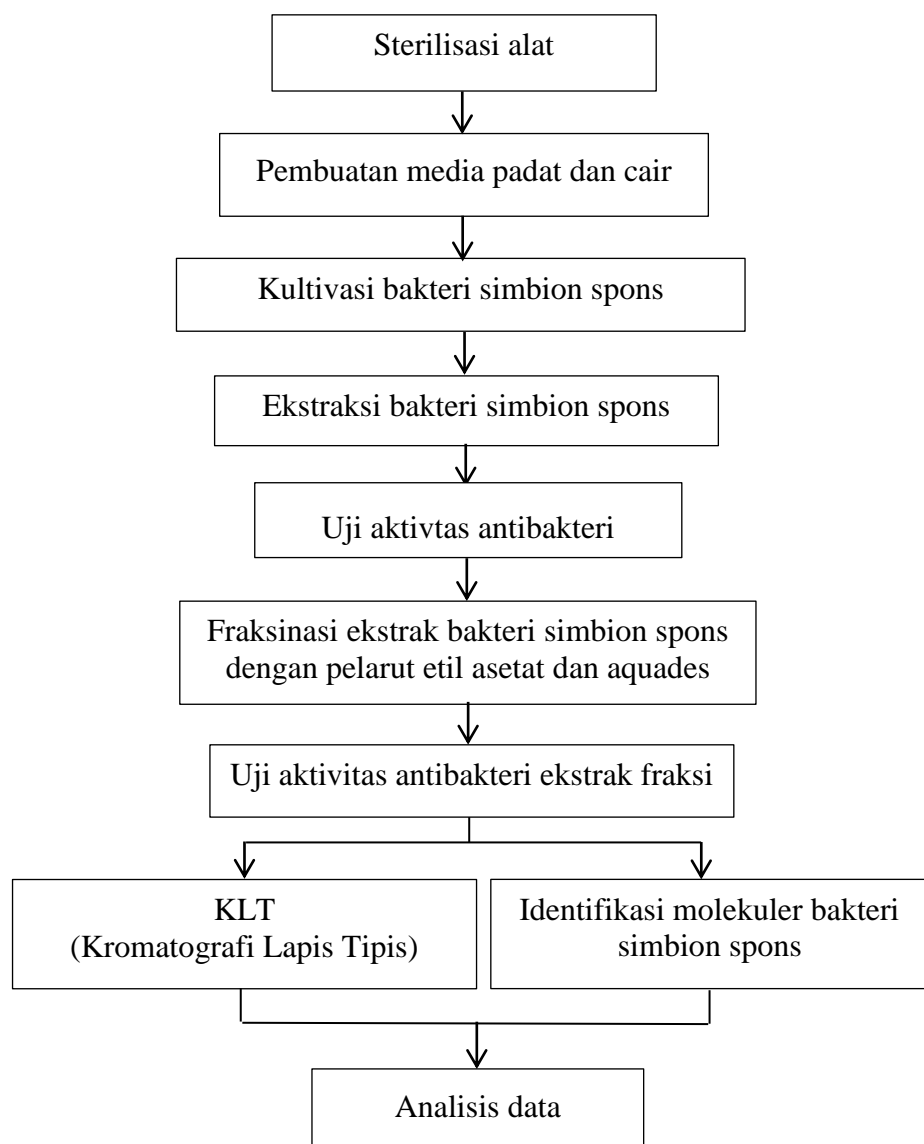
No	Alat	Spesifikasi	Merk	Kegunaan/fungsi
1	<i>Aluminium foil</i>	-	-	Membungkus alat.
2	Kain kasa	-	-	Penutup tabung reaksi dan <i>Erlenmeyer</i> .
3	Masker	-	Onemed	Mencegah terjadinya kontaminasi.
4	Sarung tangan medis	M	Onemed	Melindungi tangan dan mencegah kontaminasi.
5	<i>Paper disc</i>	6 mm	-	Untuk uji antagonis terhadap bakteri patogen.
6	Plastik tahan panas	2 kg	-	Membungkus alat dan bahan saat sterilisasi.
7	Plastik <i>wrap</i>	-	-	Membungkus tepian cawan petri dan mulut tabung.
8	<i>Tissue</i>	-	-	Membersihkan alat.
9	Pelat KLT	TLC Silica gel 60 F254		Memisahkan senyawa berdasarkan polaritas.
10	<i>Separatory funnel</i>	250ml	Phyrex	Pemisahan senyawa berdasarkan larutan.
11	<i>Chamber KLT</i>	6 x 10		Wadah tertutup untuk pemisahan senyawa.
12	Mikropipet kapiler	1,1 – 1,2 mm	-	Untuk mengambil larutan sampel.
13	Lampu UV (254 nm dan 366 nm)	-	-	Visualisasi bercak senyawa pada pelat KLT.
14	Pinset	-	-	Mengambil dan meletakkan kertas cakram.
15	Mikropipet	100-1000µl & 20-200µl	Dragonlab & Dumo	Memindahkan larutan, cairan mikroba dan larutan ekstrak.
16	<i>Shaker</i>			Alat pencegah penggumpalan bakteri patogen.
17	Tabung reaksi	15x150mm	Iwaki	Wadah pertumbuhan bakteri patogen.
18	Timbangan digital	-	-	Menimbang media.

Tabel 4. Bahan dan spesifikasi yang digunakan

No	Bahan	Spesifikasi	Merk	Kegunaan/fungsi
1	Akuades steril	-	-	Sebagai pelarut media, untuk sterilisasi pada autoklaf.
2	Air laut steril	-	-	Sebagai pelarut media, untuk sterilisasi pada autoklaf.
3	Alkohol	70%	OneMed	Mensterilisasi alat dan diri.
4	<i>Chloramphenicol</i>	-	-	Sebagai kontrol (+), menghindari kontaminasi media.
5	<i>Yeast extract</i>	103753 Yeast	Milipore	Bahan media kultur.
6	<i>Peptone</i>	107228 Buffered Peptone	Milipore	Bahan media kultur.
7	Agar	GRM026 Agar powder	Himedia	Bahan media kultur.
8	<i>Nutrient Agar (NA)</i>	105450 Nutrient agar	Milipore	Bahan media kultur.
9	<i>Metanol</i>	70%	-	Pelarut dalam ekstraksi.
10	Etil asetat 95%	109623 <i>Ethyl acetate</i>	Milipore	Sebagai pelarut pemisah senyawa.
11	n-Heksana 95%	104367 <i>n-Hexane</i>	Milipore	Sebagai pelarut pemisah senyawa.
12	Vanilin	818718 Vanillin	Milipore	Bahan pereaksi.
13	Etanol 95%	100983 Ethanol	Milipore	Sebagai larutan untuk pereaksi.
14	Spritus	-	-	Cairan bahan bakar bunsen.
15	Isolat bakteri simbion spons	SB-16, SB-22, SB-25, SB-27, SB-47, SB-51, SB-53, SB-73	-	Isolat yang akan diekstraksi.
16	Bakteri <i>Vibrio</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. alginolyticus</i>	-	Bakteri uji/patogen.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian adalah rangkaian langkah sistematis yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian secara terarah. Tahapan prosedur penelitian meliputi tahapan sterilisasi alat, pembuatan media padat dan cair, kultivasi bakteri, proses ekstraksi, uji aktivitas antibakteri awal, fraksinasi, uji aktivitas antibakteri lanjutan, analisis kromatografi, serta identifikasi molekuler pada isolat terpilih. Diagram alir dari keseluruhan prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Prosedur penelitian.

3.3.1 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan pada penelitian harus dalam keadaan steril dari jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur. Proses sterilisasi terbagi menjadi dua cara, yaitu sterilisasi kering dan sterilisasi basah. Sterilisasi kering dilakukan menggunakan alkohol 70%. Sementara itu, sterilisasi basah dilakukan menggunakan autoklaf untuk alat seperti cawan petri, tabung reaksi, dan *erlenmeyer*.

Berikut merupakan prosedur sterilisasi basah menggunakan autoklaf:

1. Alat yang digunakan dicuci dengan air mengalir dan sabun hingga bersih, kemudian dikeringkan.
2. Selanjutnya, alat-alat tersebut disterilkan kembali dengan alkohol 70%, dikeringkan menggunakan tisu, dan dibungkus dengan kertas serta plastik tahan panas.
3. Semua alat yang telah dibungkus kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk mencegah kontaminasi (Ortez, 2005).
4. Setelah proses sterilisasi selesai, autoklaf dimatikan dan dibiarkan hingga mencapai suhu ruang, kemudian alat dikeluarkan dengan hati-hati.

3.3.2 Pembuatan Media

Pembuatan media dalam penelitian terbagi menjadi dua jenis, yaitu media padat dan media cair. Media padat yang digunakan meliputi *Zobell* laut, yang berfungsi sebagai media pertumbuhan bakteri dan digunakan pada tahap pengujian aktivitas antibakteri. Sementara itu, media cair yang digunakan adalah *Nutrient Broth* (NB), yang dipilih untuk proses peremajaan bakteri spon spon.

Berikut adalah proses pembuatan media padat:

1. Media *Zobell* padat dibuat menggunakan bahan-bahan seperti pepton, yeast, dan agar.
2. Bahan media yang akan digunakan ditimbang menggunakan timbangan analitik.
3. Pembuatan media disesuaikan dengan kebutuhan, perbandingan banyaknya bahan dan pelarut dapat dilihat pada petunjuk di kemasan media.

4. Bahan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* yang dicampur dengan pelarut air laut steril, kemudian *erlenmeyer* ditutup dengan kapas yang dibalut kassa.
5. Media dipanaskan di atas *hotplate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen.
6. Media di autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit untuk disterilkan.
7. Media yang telah disterilkan kemudian dituangkan ke dalam cawan di dalam bilik laminar dan menggunakan api bunsen.
8. Jika sudah selesai, bungkus sekeliling cawan dengan plastik *wrap* dan simpan di kulkas penyimpanan media kosong jika belum digunakan.

Media *Nutrient Broth* (NB) digunakan untuk proses peremajaan bakteri simbion spons. Media NB yang dibuat pada penelitian berjumlah 10 mL per tabung reaksi dan 500 mL per botol jamu. Berikut adalah proses pembuatan media NB:

1. Pembuatan media disesuaikan dengan kebutuhan, perbandingan banyaknya bahan dan pelarut mengacu pada petunjuk yang tertera pada kemasan media.
2. Bahan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan botol jamu yang dicampur dengan pelarut air laut steril, kemudian *erlenmeyer* dan botol jamu ditutup dengan kapas yang dibalut kassa.
3. Campuran media dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate* hingga larut sempurna.
4. Setelah larut, media NB dalam *erlenmeyer* dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL per tabung.
5. Botol jamu dan tabung reaksi kemudian ditutup kembali dengan kapas yang dibaluti kain kassa dan dilapisi *aluminium foil*.
6. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

3.3.3 Kultivasi Bakteri Simbion Spons

Bakteri simbion spons yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi hasil penelitian sebelumnya dan berasal dari beberapa spesies spons laut,

yaitu *Hyrtios erectus* (SB-16 dan SB-27), *Gelliodes fibulata* (SB-22 dan SB-73), *Clathria* sp. (SB-25), *Echinodictyum antrodes* (SB-47), *Spongia matamata* (SB-51), serta *Lendenfeldia dendyi* (SB-53). Seluruh isolat tersebut dilakukan kultivasi untuk mengoleksi dan memperbanyak isolat bakteri yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya, guna memastikan keberlanjutan serta ketersediaan isolat bakteri untuk analisis lebih lanjut. Berikut adalah proses kultivasi di media *Zobell* padat:

1. Media yang akan digunakan disiapkan.
2. Isolat yang telah ada dari penelitian sebelumnya diambil menggunakan ose steril dilakukan di dalam laminar *airflow* dan di dekat api bunsen.
3. Bakteri digoreskan secara zig-zag pada permukaan media padat yang telah disiapkan.
4. Cawan petri kemudian dilapisi plastik *wrap* dan diberi label yang mencantumkan nama isolat serta tanggal inokulasi.
5. Inkubasi dilakukan dengan menempatkan cawan petri yang telah diinokulasi dalam inkubator pada suhu yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri yaitu 37°C selama 24 jam atau hingga koloni bakteri terlihat jelas (Ortez, 2005).
6. Setelah koloni bakteri tumbuh, koloni diambil menggunakan jarum ose steril.
7. Koloni tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL media NB, satu tabung berisi satu isolat.
8. Tabung reaksi ditutup kembali menggunakan kapas dan plastik *wrap*.
9. Kultur kemudian diinkubasi menggunakan shaker selama 24 jam agar bakteri dapat tumbuh dengan optimal.

3.3.4 Ekstraksi Bakteri Symbion Spons

Proses ekstraksi bertujuan untuk memisahkan senyawa bioaktif dari biomassa bakteri yang telah dikultur dalam jumlah besar. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut metanol karena memiliki polaritas tinggi sehingga mampu melarutkan berbagai senyawa bioaktif. Metanol bersifat mudah menguap sehingga

dapat dihilangkan tanpa meruka senyawa target. Berikut merupakan proses ekstraksi bakteri simbion spons menurut Utami et al. (2016):

1. Bakteri simbion spons yang sebelumnya telah ditumbuhkan di tabung reaksi kemudian dipindahkan ke dalam botol jamu yang berisi media NB 500 mL untuk proses kultivasi lanjutan.
2. Selanjutnya, kultur dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 170 rpm, selama 7 x 24 jam pada suhu ruang.
3. Hasil kultur dipanen menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit yang berfungsi untuk memisahkan supernatan dan biomassa (Yati et al., 2018).
4. Biomassa yang diperoleh dari hasil sentrifugasi kemudian dimaserasi dengan pelarut metanol menggunakan perbandingan (1/2 : v/v) dan didiamkan selama 7x24 jam.
5. Lapisan atas (metanol) dituang ke dalam *erlenmeyer* menggunakan kertas saring, sedangkan residu cairan media (lapisan bawah) dilanjutkan ke maserasi selanjutnya.
6. Fase metanol kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 35°C dan diperoleh ekstrak kental yang digunakan untuk uji aktivitas.

3.3.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bakteri Simbion

Uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion dilakukan untuk menilai kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, yang ditunjukkan melalui terbentuknya zona hambat di sekitar area perlakuan. Uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi kertas cakram (Trianto et al., 2019). Ekstrak diuji dengan bakteri patogen *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, dan *V. alginolyticus*. Ekstrak diuji pada berbagai konsentrasi, dan isolat unggul dipilih berdasarkan zona hambat dan konsistensi aktivitas antibakteri untuk analisis lanjutan.

Preparasi uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk memastikan bahwa kultur bakteri patogen dan ekstrak bakteri simbion spons berada dalam kondisi optimal sebelum dilakukan pengujian. Tahapan ini meliputi persiapan kultur bakteri patogen, pengenceran ekstrak bakteri simbion spons dengan berbagai tingkat

konsentrasi, serta pembuatan kontrol positif dan kontrol negatif yang digunakan sebagai pembandingan dalam uji aktivitas antibakteri.

1. Kultur bakteri patogen dilakukan 24 jam sebelum dilakukannya uji aktivitas antibakteri. Bakteri uji (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*) masing-masing diinokulasi ke dalam tabung 10mL yang berisi media *Zobell* laut cair. Media yang telah berisi inokulum kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam hingga bakteri tumbuh optimal dan siap digunakan dalam uji aktivitas antibakteri.
2. Pengenceran ekstrak bakteri simbiosis spons menggunakan konsentrasi 10.000, 5.000, 1.000, 100, dan 10 ppm. Pertama, disiapkan larutan induk ekstrak bakteri simbiosis dengan konsentrasi tertinggi, yaitu 10.000 ppm sebanyak 2 mL, dengan menggunakan metanol sebagai pelarut. Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 1000 \dots \dots \dots (1)$$

3. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat untuk mendapatkan konsentrasi 5.000, 1.000, 100, dan 10 ppm masing-masing sebanyak 1 mL, dengan menggunakan metanol sebagai pelarut. Rumus yang digunakan dalam pengenceran ini adalah:

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2 \dots \dots \dots (2)$$

4. Buat kontrol positif menggunakan larutan aquades yang dicampur dengan *chloramphenicol* dengan konsentrasi 1%, sedangkan kontrol negatif menggunakan larutan metanol.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak bakteri simbiosis spons dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen uji. Pengujian ini dilakukan menggunakan kultur bakteri patogen yang telah dipersiapkan sebelumnya serta ekstrak yang telah diencerkan pada berbagai konsentrasi. Berikut proses uji aktivitas antibakteri:

1. Media padat yang akan digunakan disiapkan.
2. Cawan bagian bawah ditulis terlebih dahulu dengan konsentrasi yang digunakan secara melingkar.

3. Letakkan kertas cakram di dalam cawan kosong, kemudian basahi kertas cakram dengan larutan kontrol positif, kontrol negatif, dan ekstrak yang telah diencerkan sesuai dengan konsentrasi.
4. Ambil sebanyak 70 μL suspensi bakteri uji yang telah diinkubasi dan sebarkan secara merata di permukaan media agar menggunakan *spreader*.
5. Biarkan cawan petri diinokulasi selama beberapa menit agar bakteri melekat dengan baik pada permukaan agar.
6. Selanjutnya, letakkan kertas cakram yang telah dibasahi sesuai dengan konsentrasi yang telah ditulis di bagian bawah cawan media.
7. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 – 48 jam. Cawan petri diletakkan dalam posisi terbalik untuk mencegah kondensasi yang dapat mengganggu hasil pengujian.
8. Setelah masa inkubasi selesai, cawan petri diamati dan ukur diameter zona hambat di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong. Diameter diukur secara horizontal, vertikal, dan diagonal. Selanjutnya, dihitung dengan rumus:

$$\text{rata - rata} = \frac{D_h + D_v + D_d}{3} \dots \dots \dots (3)$$

Di mana:

D_h = Diameter yang diukur secara horizontal

D_v = Diameter yang diukur secara vertikal

D_d = Diameter yang diukur secara diagonal

9. Zona hambat terbentuk untuk setiap konsentrasi ekstrak dan bakteri uji dibandingkan kemudian ditentukan konsentrasi minimal ekstrak yang menghasilkan zona hambat terbesar untuk penelitian lebih lanjut.

3.3.6 Fraksinisasi Ekstrak

Pada penelitian ini digunakan metode fraksinisasi dengan bantuan alat *separatory funnel* untuk memisahkan dua fase cair yang tidak saling bercampur. Proses ini menggunakan dua jenis pelarut, yaitu aquades (fase polar) dan etil asetat (fase semi-polar), guna memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan po-

laritasnya. Menurut Mentari et al. (2019), metode prinsip kerja *separatory funnel* adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak bakteri simbion spons dimasukkan ke dalam *separatory funnel* atau corong pemisah.
2. Ekstrak dicampur dengan aquades untuk memisahkan fraksi berdasarkan perbedaan kepolaran senyawa.
3. Setelah aquades, pelarut etil asetat ditambahkan untuk mengekstraksi senyawa non-polar dari larutan ekstrak.
4. Corong ditutup dengan rapat dan digoyangkan secara perlahan untuk mencampur dua fase cair. Setiap beberapa kali goyangan, tutup corong dibuka untuk melepaskan tekanan gas yang mungkin terbentuk.
5. Corong dibiarkan dalam posisi diam hingga dua lapisan cairan (fase aquades dan fase etil asetat) terpisah dengan jelas. Lapisan yang lebih padat, seperti air, biasanya berada di bawah, sementara lapisan yang lebih ringan, seperti eter, berada di atas.
6. Lapisan dikeluarkan perlahan melalui keran corong dan ditampung dalam *erlenmeyer* terpisah dan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*.
7. Setelah selesai, corong dibersihkan dengan pelarut yang sesuai untuk memastikan tidak ada kontaminasi pada proses berikutnya.

3.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fraksi Terhadap Bakteri *Vibrio*

Hasil dari pemisahan menggunakan *separatory funnel* berupa dua fraksi, yaitu fraksi etil asetat dan fraksi aquades, yang kemudian diuji kembali aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Vibrio* untuk mengetahui fraksi yang paling berpotensi sebagai antibakteri. Metode yang digunakan sama seperti uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri simbion dengan konsentrasi yang digunakan, yaitu 150 µg/disk, serta penambahan kontrol positif dan negatif. Pengenceran konsentrasi dilakukan menggunakan pelarut yang sesuai untuk masing-masing fraksi.

3.3.8 Analisis Senyawa Ekstrak

Analisis senyawa ekstrak akteri simbion spons dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode ini digunakan untuk memeriksa senyawa dalam campuran dengan cepat, menyaring apakah senyawa yang dicari ada, memantau perubahan senyawa selama reaksi dan mengidentifikasi senyawa berdasarkan pola yang muncul. Metode KLT yang digunakan pada penelitian berdasarkan Pratiwi et al. (2023) yang disesuaikan dan dimodifikasi:

1. Plat silika gel GF₂₅₄ dipotong dengan ukuran 2 x 4 cm.
2. Ekstrak etil asetat bakteri simbion spons terpilih ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat menggunakan pipa kapiler. Titik dikeringkan sebelum pengembangan.
3. Plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah berisi fase gerak, yaitu pelarut etil asetat dan n-Heksana menggunakan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. *Chamber* ditutup dan dibiarkan eluen naik hingga mendekati batas atas plat.
4. Setelah eluen naik hingga batas plat KLT, plat tersebut diangkat dan dikeringkan, kemudian bercak atau noda yang terbentuk pada silika gel diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.
5. Pola bercak yang muncul kemudian dihitung nilai Rf-nya.
6. Plat KLT disemprot dengan reagen yang mengandung 1 gram vanilin, 2 ml asam sulfat, dan 100 ml etanol 95%, lalu dipanaskan pada suhu 110°C selama 5 menit untuk mengamati perubahan warna yang dihasilkan.

Perhitungan Nilai Rf

Nilai Rf (*Retention factor*) dihitung untuk menentukan jarak relatif pergerakan senyawa pada plat KLT terhadap jarak yang ditempuh oleh pelarut (fase gerak).

Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa} \dots\dots\dots(4)}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Jarak senyawa diukur dari titik awal penotolan hingga pusat bercak senyawa, sedangkan jarak pelarut diukur dari titik awal penotolan hingga batas akhir pergerakan pelarut pada plat. Nilai Rf tidak memiliki satuan karena merupakan

hasil perbandingan antara dua jarak yang memiliki satuan sama (cm). Nilai Rf diperoleh dalam rentang 0 – 1, di mana semakin kecil nilai Rf menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat lebih polar dan memiliki interaksi yang kuat dengan fase diam (silika gel). Sebaliknya, semakin besar nilai Rf mengindikasikan bahwa senyawa bersifat lebih nonpolar sehingga lebih mudah terbawa oleh fase gerak.

3.3.9 Identifikasi Molekuler Bakteri Symbion Spons

Identifikasi molekuler dilakukan untuk menentukan spesies bakteri symbion spons secara tepat dengan memanfaatkan perbandingan sekuens DNA terhadap database genetik yang tersedia. Metode identifikasi molekuler yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Bibi et al. (2020) dan dimodifikasi sesuai dengan kondisi dan kebutuhan penelitian.

1. *Data forward* dan *reverse* masing-masing isolat bakteri symbion spons, yang diperoleh dari hasil amplifikasi gen target melalui PCR, dianalisis menggunakan BioEdit untuk disusun menjadi *consensus sequence*, yaitu sekuens tunggal yang merepresentasikan hasil gabungan dari kedua pembacaan.
2. *Consensus sequence* yang telah diperoleh dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs NCBI, untuk membandingkan sekuens isolat dengan database genetik global dan menentukan identitas spesies atau kerabat dekat bakteri symbion spons.
3. Berdasarkan hasil BLAST, identitas bakteri symbion ditentukan dengan mengacu pada persentase kesamaan sekuens tertinggi dengan spesies referensi. Informasi ini digunakan untuk mengidentifikasi spesies atau kerabat dekat dari bakteri symbion yang diteliti.

3.4 Pengolahan Data dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari berbagai metode penelitian, diolah untuk menyiapkan informasi yang siap dianalisis lebih lanjut. Hasil ekstraksi berupa volume atau massa ekstrak bakteri symbion spons dicatat sebagai data dasar untuk melanjutkan ke tahap pemisahan fraksi dan uji aktivitas antibakteri. Pada uji anti-

bakteri, data yang dikumpulkan meliputi ukuran zona hambat yang terbentuk, kemudian dianalisis menggunakan statistik deskriptif seperti rata-rata dan standar deviasi untuk menilai potensi antibakteri. Data dari pemisahan dengan KLT terdiri dari pola bercak senyawa pada plat, yang dievaluasi berdasarkan nilai Rf dan dibandingkan dengan standar untuk mengidentifikasi senyawa aktif.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil yang telah dipaparkan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak bakteri simbiosis spons menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, dan *V. alginolyticus*. Isolat SB-16, SB-22, dan SB-47 merupakan isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri paling tinggi.
2. Hasil fraksinasi menunjukkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri lebih tinggi dibanding fraksi air terhadap *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, dan *V. alginolyticus*.
3. Karakterisasi senyawa pada isolat SB-47 menunjukkan golongan terpenoid. Hasil identifikasi molekuler isolat SB-16, SB-22, dan SB-47 memiliki kemiripan dengan bakteri dari genus *Vibrio* yang menghasilkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Vibrio* patogen.

5.2 Saran

Disarankan untuk memperdalam analisis senyawa bioaktif dengan menggunakan metode Kromatografi Kinerja Tinggi (KKT) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) agar dapat memurnikan serta mengkarakterisasi senyawa aktif secara lebih detail dan akurat. Dengan pemurnian yang lebih baik, identifikasi komponen penyusun senyawa bioaktif dapat dilakukan secara lebih spesifik sehingga mendukung pengembangan senyawa tersebut sebagai antibakteri potensial.

DAFTAR PUSTAKA

- Amri, K. (2003). *Budidaya udang windu secara intensif*. Agro Media Pustaka.
- Annisa, Nur. (2018). Analisa bakteri *Vibrio* sp. pada kerang rebus yang diperdagangkan di Kecamatan Tanjung Morawa. *Jurnal perikanan*, 1(48).
- Annisa, N., & Prayitno, S. B. (2015). Pengaruh perendaman ekstrak daun sirih (Piper betle) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap gejala klinis, kelulushidupan, histologi dan pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 4(3), 54-60.
<https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/jamt/article/view/9463>
- Anwar, M. A., Nurjanah, S. N., & Rahayu, W. P. (2022). Aplikasi *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) NCBI pada penelitian molekuler *Salmonella* spp. *Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia*, 7(11), 15446–15464.
<https://doi.org/10.36418/syntax-literate.v7i11.9037>
- Astro, M., Yusnaini & Halili. (2013). Pertumbuhan spons (*Stylotella aurantium*) yang ditransplantasi pada berbagai kedalaman. *Jurnal Mina Laut Indonesia*, 1(1), 133-144.
<https://adoc.pub/pertumbuhan-spons-stylotella-aurantium-yang-ditransplantasi>
- Austin, B. & Austin, D. A. (2007). *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish* (Dobbins, P., Ed). Praxis Publishing.
<http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6069-4>
- Ayini, U., Bintari S.H., & Dewi, T. C. (2014). Efek antibakteri ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* secara *in vitro*. *Journal of Biology & Biology Education*, 6(1), 67-75.
<http://dx.doi.org/10.15294/biosaintifika.v6i1.3787>

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5762448/>
- Bashari, M. H., Huda, F., Tartila, T. S., Shabrina, S., Putri, T., Qomarilla, N., Atmaja, H., Subhan, B., Sudji, I. R., & Meiyanto, E. (2019). Bioactive compounds in the ethanol extract of marine sponge *Stylissa carteri* demonstrates potential anti-cancer activity in breast cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 20(4), 1199–1206.
<http://dx.doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.4.1199>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Bhakuni, D. S. & Rawat, D. S. (2005). *Bioactive marine natural product*. Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3484-9_8
- Bibi, F., Yasir, M., Al-Sofyani, A., Naseer, M. I., & Azhar, E. I. (2020). Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1139–1147.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.002>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). *Vibrio vulnificus* [Micrograph]. Public Health Image Library. Retrieved from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vibrio_vulnificus_01.png
- Cita, Y. P., Radjasa, O. K., & Sudharmono, P. (2017). Aktivitas antibakteri isolat bakteri X2 yang berasosiasi spons *Xestospongia testudinaria* dari pantai pasir putih Situbondo terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal lmu Kefarmasian Indonesia*, 14(2), 206-211.
<http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/32>
- Clarridge, J. E. III. (2004). Impact of 16S Rrna gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862.
<https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
<https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>

- Dwivedi, S., Jyoti, A., & Shukla, S. (2015). Antibacterial potential of medicinal plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(6), 2349.
- Faisal, M. R., Kawaroe, M., & Satria, F. (2014). Potensi senyawa bioaktif ekstrak kasar bakteri simbiosis spons sebagai anthelmintika: sebuah uji pendahuluan. *Omni-Akuatika*, 13(19), 77-84.
<https://ojs.omniakuatika.net/index.php/joa/article/download/23/24>
- Fajrina, A., Bakhtra, D. D. A., & Irenda, Y. (2018). uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat spons *Aplysina aerophoba* pada *Helicobacter pylori* dan *Shigella dysenteriae*. *Jurnal Farmasi Higea*, 10(2), 134-142.
<https://doi.org/10.52689/HIGE.A.V10I2.188>
- Farmer, J. J., III. (1980). Revival of the name *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 656.
<https://doi.org/10.1099/00207713-30-4-656>
- Febrina, L., Rusli, R., & Muflihah, F. (2015). Optimalisasi ekstraksi dan uji metabolit sekunder tumbuhan lili (*Ficus variegata* B.). *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 3(2), 74-81.
<http://dx.doi.org/10.25026/jtpc.v3i2.153>
- Firdiyani, F., Agustini, T. R., & Ma'ruf, W. F. (2015). Ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antioksidan alami *Spirulina platensis* segar dengan pelarut yang berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1), 28-37.
<http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.2015.18.1>
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., & Ueho, T. (1953). On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*, 4, 299-304.
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1570291225968352256>
- Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 2: The Proteobacteria). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-28022-6>
- Ginting, E. L., Warouw, V., & Suleman, R. W. (2010). Aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar bakteri yang berasosiasi dengan sponge *Acanthostrongylophora* sp. *Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis*, 6(3), 160-163.
<http://dx.doi.org/10.35800/jpkt.6.3.2010.162>
- Graça, A. P., Rodrigues, A., Rocha, R. J. M., Reis, M., & Calado, R. (2013). Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial communities from the marine sponge *Erylus discophorus* (Astrophorida, Geodiidae). *PLoS ONE*, 8(7), e69364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069364>

- Handayani, D. (2012). Potensi senyawa bioaktiv spon laut *Axinella carteri* asal sumatra barat. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi.*, 17(1), 73-79.
<https://www.academia.edu/114169075>
- Hardiningtyas, S. D. (2009). Aktivitas antibakteri ekstrak karang lunak *Sarcophyton* sp. yang difragmentasi dan tidak difragmentasi di perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu (No Publikasi 19486) [Thesis, Institut Pertanian Bogor]. Repository IPB.
- Haris, I. A. & Jompa, I. J. (2021). *Spons*. LILY Publisher.
- Hayati, E. K., Akyunul J. & Rachmawati N. (2012). Identifikasi senyawa dan aktivitas antimalaria in vivo ekstrak etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L). *Jurnal Molekuler*, 7(1), 20 – 32.
<http://dx.doi.org/10.20884/1.jm.2012.7.1.103>
- Hudayah, T., Taib, M., Ismail, N. & Muhammad, T. S. T. (2017). Methanol extracts of four selected marine sponges induce apoptosis in human breast cancer cell line, MCF-7. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 667-675.
<https://ijrps.com/home/article/view/4636>
- Ihsan, B. & Retnaningrum, E. (2020). The numerical phenetic of taxonomy *Vibrio* in shellfish (*Meretrix meretrix*) at edu-tourism mangrove cengkong beach Trenggalek. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 12(2), 296-301.
<https://doi.org/10.20473/jipk.v12i2.17846>
- Isarangkura, A. & Sae-Hae, S. (2002). A Review of the economic impacts of aquatic animal disease. *FAO Fisheries Technical Paper*: 253-286.
<https://www.fao.org/4/y3610e/y3610E00.pdf>
- Ismet, M. S., Soedharma, D., & Effendi, H. (2011). Morfologi dan biomassa sel spons *Aaptos aaptos* dan *Petrosia* sp. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 3(2), 153-161.
<http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/57135>
- Jandu, J. J. B., da Silva, L. C. N., da Silva, M. V., & dos Santos Correia, M. T. (2015). Antimicrobial activity and synergistic effects of an ethyl acetate fraction from methanol extract of *Myracrodruon urundeuva* bark. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(21), 641-646.
<http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2015.5807>
- Johnson, F. H., & Shunk, I. V. (1936). An interesting new species of luminous bacteria. *Journal of Bacteriology*, 31, 585–593.
<https://doi.org/10.1128/JB.31.6.585-593.1936>

- Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagata, K., & Nagata, S. (2005). Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and environments*, 20(3), 178-185.
<http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.20.178>
- Kusumaningrum, P. D., & Thessiana, L. (2017). Sistem sterilisasi bakteri *Vibrio harveyi* menggunakan radioisotop cobalt-60 untuk budidaya udang. *Jurnal Kelautan Nasional*, 10(3), 125-137.
<http://dx.doi.org/10.15578/jkn.v10i3.6187>
- Lee, T. H., Kim, Y. R., Rhee, J. H., Kim, J. H., Woo, H. R., & Chung, K. M. (2011). Characterization of monoclonal antibodies targeting the RtxA1 toxin of *Vibrio vulnificus*. *Process Biochemistry*, 46(7), 1500-1508.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.04.004>
- Lee, Y. K., Jung H.L., & Hong K. L. (2001). Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *The Journal of Microbiology*, 39(4), 254-264.
<https://www.jmicrobiol.or.kr/journal/view.php?number=353>
- Madigan, M.T., Marthinko., Stahl., & Clark. (2012). *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. San Francisco. Hal 1-44.
- Mangurana, W. O. I., Yusnaini, Y., & Sahidin, S. (2019). Analisis LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) dan metabolit sekunder serta potensi antibakteri ekstrak n-heksana spons *Callyspongia aerizusa* yang diambil pada kondisi tutupan terumbu karang yang berbeda di perairan teluk staring. *Jurnal biologi tropis*, 19(2), 131-141.
<http://dx.doi.org/10.29303/jbt.v19i2.1126>
- Mariottini, G.L., Grice, I. D. (2016). Antimicrobials from cnidarians: a new perspective for anti-infective therapy. *Marine Drugs*, 14(48), 1-19.
<http://dx.doi.org/10.3390/md14030048>
- Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), 1137-1147.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.012>
- Marzuki, Ismail., Noor, Alfian., La Nafie, Nursiah., Djide, M. Natsir. (2015). Molecular characterization of gene 16S rRNA micro symbionts in sponge at Melawai Beach, East Kalimantan. *International Journal Marina Chimica Acta*, 16(1), 38-46.
<http://dx.doi.org/10.31219/osf.io/xkp9b>
- Marzuki, I. (2018). Eksplorasi Spons Indonesia: Seputar Kepulauan Spermonde. *Nas Media Pustaka*.

- Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C. & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, 12(8), 4539 - 4577.
<http://dx.doi.org/10.3390/md12084539>
- Mentari, D., Naima, M., Wulansari, R., Widada, J., Nuringtyas, T. R., Wibawa, T., & Wijayanti, N. (2019). Pengaruh perbedaan metode ekstraksi metabolit sekunder *Streptomyces* sp. GMR22 terhadap toksisitas pada sel BHK-21. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 16(1), 1-10.
<http://dx.doi.org/10.23917/pharmacon.v16i1.8032>
- Miyamoto, Y., Nakamura, K., & Takizawa, K. (1961). Pathogenic halophilic bacteria. *Japanese Journal of Microbiology*, 5, 477–486.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1961.tb00225.x>
- Murtidjo, B. 2003. Benih Udang Windu Sekala Kecil. Kanisus.
- Muthiyan, R., Nambikkairaj, B., Mahanta, N., Immanuel, T., Mandal, R. S., Kumaran, K., & De, A. K. (2017). Antiproliferative and proapoptotic activities of marine sponge *Hyrtios erectus* extract on breast carcinoma cell line (MCF-7). *Pharmacognosy magazine*. 13(Suppl 1): S41–S47.
<http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.203983>
- Muttaqin, F. Z., Yuliantini, A., Fitriwati, A., & Asnawi, A. (2016). Penetapan kadar senyawa dan diazepam dalam sediaan kombinasi obat menggunakan metode KLT video densitometri. *Pharmacy*, 13(2), 127-136.
<http://jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/PHARMACY/article/view/1249>
- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L., & Mahon, B. E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: Review of surveillance data from 2 systems. *Clinical Infectious Diseases*, 54(suppl.5), 391–395.
<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis243>
- Ngazizah, F. N., Ekowati, N., & Septiana, A. T. (2017). Potensi daun trembilungan (*Begonia hirtella* L) sebagai antibakteri dan antifungi. *Biosfera*, 33(3), 126-133.
<http://dx.doi.org/10.20884/1.mib.2016.33.3.309>
- Nurama, D. F., Maisaroh, D. S., Munir, M., Kartika, A. G. D., Susanti, O., & Joesidawati, M. I. (2023). Antibacterial potential marine sponge extract and bacteria symbionts *Callyspongia vaginalis* from Kendit Waters Against the bacteria *Vibrio harveyi*. *IOP Publishing*, 1251(1), 1-7.
<http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/1251/1/012028>

- Oliver, J. D. (2005). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. In *Infectious Diseases of Bacteria* (pp. 1–15). NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554404/>
- Ortez, J. (2005). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Marie B. Coyle, Coord. Ed. American society for Microbiology.
- Pawarti, N., Iqbal, M., Ramdini, D. A., & Yuliyanda, C. (2023). Pengaruh metode ekstraksi terhadap persen rendemen dan kadar fenolik ekstrak tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan. *Medical Profession Journal of Lampung*, 13(4), 590-593.
<https://mail.journalofmedula.com/index.php/medula/article/download/774/547/4050>
- Pratiwi, S. A., Februyani, N., & Basith, A. (2023). Skrining dan uji penggolongan fitokimia dengan metode KLT pada ekstrak etanol kemangi (*Ocimum basilicum L*) dan sereh dapur (*Cymbopogon ciratus*). *Pharmacy Medical Journal*, 6(2), 140-147.
<https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/pmj/article/view/50782>
- Priyanto, A. (2013). *Isolasi senyawa aktif antioksidan dari fraksi etil asetat tumbuhan paku Nephrolepis falcata (Cav.) C. Chr.* Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Proksch, P., R. Ebel., R.A., Edrada., P., Schuup., W.H. Lin., Sudarsono. V. Wray., & K. Steube. (2003). Detection of pharmacologically active natural products using ecology selected example from indopacific. marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure and Applied Chemistry*, 75(3), 343-352.
<http://dx.doi.org/10.1351/pac200375020343>
- Rahmadeni, Y., Febria, F. A., & Bakhtiar, A. (2019). Potensi pakih sipasan (*Blechnum orientale*) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Sciences.*,6(2), 224-229.
<http://dx.doi.org/10.24843/metamorfosa.2019.v06.i02.p12>
- Ravn, H. W., Kristensen, C. V., Christensen, T. F., Diedrichsen, B., & Brandt, K. (2002). *A new phytochemical screening programme used for crops grown with organic and conventional methods*. Organic Eprints.
<http://orgprints.org/1490/>
- Reichelt, J. L., Baumann, P., & Baumann, L. (1979). Study of genetic relationships among marine species of the genera Beneckea and Photobacterium by means of in vitro DNA/DNA hybridization. *Archives of Microbiology*, 121, 101–108.
<https://doi.org/10.1007/BF00416975>

- Rita, W. S. (2010). Isolasi, identifikasi, dan uji aktivitas antibakteri senyawa golongan triterpenoid pada rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 4(1), 20–26.
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/jchem/article/view/2771>
- Rivai, H., Putra, R. Y., dan Krisyanella., (2012). Penentuan pengaruh jenis pelarut pengestrak terhadap perolehan kadar senyawa fenolat dan aktifitas antioksidan dari daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). *Jurnal Farmasi Higea*, 4(1), 16-23.
<https://doi.org/10.52689/higea.v4i1.57>
- Rollins, D.M. and S.W. Joseph. (2000). List of bacterial pathogen. BSCL 424 Pathogenic Microbiology. University of Maryland.
http://www.life.umd.edu/classroom/bci_434/index.html.
- Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 509–523.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3496>
- Sakazaki, R. (1968). Proposal of *Vibrio alginolyticus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 18, 109–110.
<https://doi.org/10.1099/00207713-18-1-109>
- Sakazaki, R., Iwanami, S., & Fukumi, H. (1963). Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 16, 161–188.
<https://doi.org/10.7883/yoken1952.16.161>
- Salamah, N. & Widyasari, E. (2015). Aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kelengkeng (*Euphoria longan* (L) Steud.) dengan metode penangkapan radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil penangkapan radikal. *Pharmaciana*, 5(1), 25-34.
<http://dx.doi.org/10.12928/pharmaciana.v5i1.2283>
- Sarida, M., T. Tarsim., & Faizal, I. (2010). Pengaruh ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara in vitro. *Jurnal Penelitian Sains*, 13(3), 59-63.
<https://ejurnal.mipa.unsri.ac.id/index.php/jps/article/download/141/134>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- Satiadarma, K., Mulja, M., Tjahjono, D. H., & Kartasasmita, R. E. (2004). *Asas Pengembangan Prosedur Analisis*. Airlangga University Press.

- Seraspe, E. B., Ticar, B. F., Formacion, M. J., Pahila, I. G., de la Pena, M. R. & Amar, E. C. (2012). Antibacterial properties of the microalgae *Chaetoceros calcitrans*. *Asian Fisheries Science*, 25(4), 343–356.
<http://dx.doi.org/10.33997/j.afs.2012.25.4.006>
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3), 219–243.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- Suharni T. T., Nastiti S. J., & Soetarto A. E. S. (2008). *Mikrobiologi Umum*. Universitas Atma Jaya.
- Surhone, L. M., Tennoe, M. T., & Henssonow, S. F. (2010). *Vibrio harveyi*.
<https://uk.bookshop.org/p/books/the-parrot-s-theorem-lambert-m-surhone/1263703>
- Talaro, K. P., & Chess, B. (2008). *Foundations in microbiology* (6th ed.). McGraw-Hill.
- 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/membr.00040-06>
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403–431.
<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.
<https://www.researchgate.net/publication/284051834>
- Trianto, A., Nirwani, Susanti, O., Maesaroh, D., & 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>
- Tukan, O. B., Salosso, Y., & Djonu, A. (2023). Pencegahan infeksi bakteri *vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp.) menggunakan rebusan daun kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Perikanan Unram*, 13(3), 634–646.
<http://doi.org/10.29303/jp.v13i3.553>

- Urquhart, E.A., Jones, S. H., Yu, J. W., Schuster, B. M., Marcinkiewicz, A. L., Whistler, C. A., & Cooper, V. S. (2016). Environmental conditions associated with elevated *Vibrio parahaemolyticus* concentrations in Great Bay Estuary, New Hampshire. *Plos One*, *11*(5), 1-15.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155018>
- Utami, N. K. T., Trianto, A., & Radjasa, O. K. (2016). Skrining Senyawa Antibakteri Ekstrak Spons dari Perairan Kupang, Nusa Tenggara Timur. *Prosiding Seminar nasional Tahunan Ke-V Hasil-Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*.
<https://eprints.undip.ac.id/51348/>
- Varijakzhan, D., Loh, J. Y., Yap, W. S., Yusoff, K., Seboussi, R., Lim, S. H. E., & Chong, C. M. (2021). Bioactive compounds from marine sponges: Fundamentals and applications. *Marine drugs*, *19*(5), 1-38.
<https://doi.org/10.3390/md19050246>
- Wagner, H., & Blatt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Wardany, R., & Nirmala, D. (2023). Effect of antibacterial activity and analysis of active compounds of *Hyrtios erecta* sponge ethanol extract using maceration method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1273*(1), 1-6.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/1273/1/012011>
- Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental Microbiology*, *14*(2), 335–346.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460>
- Wewengkang, D. S., Sumilat, D. A., & Rotinsulu, H. (2014). Karakterisasi dan bioaktif antibakteri senyawa spons *Haliclona* sp. dari Teluk Manado. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, *1*(1), 71-85.
<https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/lppmsains/article/download/7203/6707>
- Wibowo, R. H., Sipriyadi., Darwis, W., Kamilah, S. N., Pertiwi, H. P., & Pertiwi R. (2020). Potensi isolat *Bacillus* sp. Eng-4 yang berasosiasi dengan spons *Aplysina* sp. penghasil senyawa antimikrob asal pulau Enggano. *Jurnal Enggano*, *5*(1), 1-10. <https://doi.org/10.31186/jenggano.5.1.1-10>
- Widyaningrum, W., Saptuti, S., Agustina, V. T., & Sulistiyah, W. (2019). Identifikasi kromatografi lapis tipis dan efektivitas ekstrak etilasetat daun talok (*Muntingia calabura L*) sebagai analgetik. *Avicenna: Journal of Health Research*, *2*(1), 84-94.
<https://doi.org/10.36419/avicenna.v2i1.263>

- Wijaya, A., & Satriawan, B. (2023). Pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap nilai rendemen ekstrak daun pepaya (*Carica papaya. L.*). *Jurnal Ilmiah JOPHUS: Journal Of Pharmacy UMUS*, 5(1), 10-17.
<http://dx.doi.org/10.46772/jophus.v5i1.728>
- Wijaya, H., Novitasari, N., & Jubaidah, S. (2018). Perbandingan metode ekstraksi terhadap rendemen ekstrak daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris L. Engl.*). *Jurnal ilmiah manuntung*, 4(1), 79-83.
<http://jurnal.stiksam.ac.id/index.php/jim/article/view/148>
- Yanty, Y. N., Sopianti, D. S., & Veronica, C. (2019). Fraksinasi dan skринing fraksi biji kebiul (*Caesalpinia bonduc (L) Roxb*) dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). *Borneo Journal Phamascientech*, 3(1), 56–64.
<http://dx.doi.org/10.51817/bjp.v3i1.209>
- 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>
- Ye, X. S., Chen, M. X., Li, H. Y., He, X. Y., & Zhao, Y. (2019). *Halobacteriovorax vibriovivans* sp. nov., a novel prokaryotic predator isolated from coastal seawater of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3917-3923.
<http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003703>
- Yu, R. (2022). Antibacterial effect of plant extracts against *Vibrio parahaemolyticus*. *PlusVet Animal Health*.
<https://plusvet.eu/2022/04/18/antibacterial-effect-of-plant-extracts-against-vibrio-parahaemolyticus/>
- Yuliantari, N. W. A., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2017). Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan daun sirsak (*Annona muricata L.*) menggunakan ultrasonik. *Media Ilmiah Teknologi Pangan*, 4(1), 35-42.
<https://jurnal.harianregional.com/pangan/id-29815>
- Zhu, S., Nishikino, T., Hu, B., Kojima, S., Homma, M., & Liu, J. (2017). Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(41), 10966–10971.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1712489114>