

***ISOLATION OF SYMBIONT ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Stylissa sp.* AND
ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST WITH MOLECULAR IDENTIFICATION USING THE
16S rRNA GENE***

**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT SIMBION DARI SPONS *Stylissa sp.* DAN UJI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI SERTA IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER
MENGUNAKAN GEN 16S rRNA**

Engjinia Frenny Kandio¹⁾, Adithya Yudistira¹⁾, John M.R Runtuwene¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi Fakultas FMIPA UNSRAT Manado, 95115

*enjikandio21@gmail.com

ABSTRACT

*Sponges are porous animals that are filter feeders and they become a habitat for microorganisms to nest in their bodies. The result of the symbiosis between sponges and microorganisms, especially in bacteria is the ability of the sponge to produce bioactive compounds. One of the potentials derived from these bioactive compounds is antibacterial. This study aims to isolate and test the antibacterial activity of the endophytic symbiont bacteria *Stylissa sp.*, as well as to carry out molecular identification using the 16S rRNA gene of symbiont bacteria isolates that show the greatest antibacterial power. Three isolates of endophytic symbiont bacteria were successfully obtained through the purification stage. Each isolate was coded E1, E2, and E3. With the average inhibition zone against *Escherichia coli* bacteria, E1 (7.26 mm) is in the moderate category, E2 (5.42 mm) is in the moderate category and E3 (0.96 mm) is in the weak category. While the antibacterial power against *Staphylococcus aureus* bacteria, E1 (10.26 mm) in the moderate category, E2 (2.10 mm) in the moderate category, and E3 (0.17 mm) in the weak category. The endophytic bacteria that have the greatest antibacterial power is in isolate E1 which is based on molecular analysis using the 16S rRNA gene identified as *Bacillus cereus* bacteria.*

Keywords: *Stylissa sp.* Sponge, endophytic symbiont bacteria, antibacterial activity, molecular identification, 16S rRNA Gene

ABSTRAK

Spons adalah hewan berpori yang bersifat *filter feeder* sehingga menjadi habitat bagi mikroorganisme untuk bersarang di dalam tubuhnya. Hasil dari simbiosis antara spons dan mikroorganisme dalam hal ini bakteri yaitu kemampuan spons dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Salah satu potensi yang berasal dari senyawa bioaktif tersebut adalah antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan pengujian aktivitas antibakteri dari bakteri simbion endofit spons *Stylissa sp.*, serta melakukan identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA terhadap isolat bakteri simbion yang menunjukkan daya antibakteri terbesar. Sebanyak 3 isolat bakteri simbion endofit berhasil diperoleh melalui tahap purifikasi. Masing-masing isolat diberi kode E1, E2, dan E3. Dengan rata-rata zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu, E1 (7,26 mm) termasuk kategori sedang, E2 (5,42 mm) termasuk kategori sedang, E3 (0,96 mm) dengan kategori lemah. Sedangkan daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu, E1 (10,26 mm) dengan kategori sedang, E2 (2,10 mm) termasuk kategori sedang, dan E3 (0,17 mm) pada kategori lemah. Bakteri endofit yang memiliki daya antibakteri terbesar yaitu isolat E1 yang berdasarkan analisis secara molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*.

Kata kunci: Spons *Stylissa sp.*, bakteri simbion endofit, aktivitas antibakteri, identifikasi molekuler, gen 16S rRNA.

PENDAHULUAN

Spons adalah hewan berpori yang bersifat *filter feeder* sehingga menjadi habitat bagi mikroorganisme untuk bersarang di dalam tubuhnya. Mikroorganisme mempunyai dua peran yang penting dalam sistem biologi spons, yaitu sebagai sumber makanan dan hidup bersimbiosis baik secara inter maupun intra selular (Taylor *et al.* 2007).

Hasil dari simbiosis antara spons dan mikroorganisme dalam hal ini bakteri yaitu kemampuan spons dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Bakteri yang bersimbiosis dengan spons diduga memiliki peranan yang besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang telah di isolasi dari spon. Potensi ini memungkinkan bakteri simbiosis pada spons mampu memproduksi senyawa bioaktif dan menggantikan spons yang selama ini menghasilkan senyawa bioaktif. Salah satu potensi yang berasal dari senyawa bioaktif tersebut adalah antibakteri. Beberapa jenis bakteri yang bersimbiosis dengan spons diperkirakan dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai bahan antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* (Dajoh, 2004).

Dengan berkembangnya identifikasi mikroorganisme saat ini identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan metode berbasis molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Analisis molekuler dapat menjawab berbagai permasalahan yang berkaitan dengan identifikasi yang berbasis mikrobiologi, antara lain digunakan pada mikroorganisme yang sulit untuk di kultur dan secara fenotipik membingungkan atau belum pernah ditemukan sebelumnya.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari mikroba endofit yang diisolasi dari spons *Stylissa sp.* Untuk mengetahui spesies bakteri endofit yang memiliki daya antibakteri terbesar, maka dilakukan analisis secara molekuler terhadap gen 16S rRNA.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2018 sampai Agustus 2018, di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi dan

Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

Pengambilan Dan Penyiapan Sampel

Sampel spons *Stylissa sp.* di ambil dari perairan pantai Malalayang menggunakan alat bantu (masker, snorkel dan fins). Pada saat sampel diambil, terlebih dahulu sampel di foto. Selanjutnya di masukan ke dalam plastik sampel yang berisi air laut secukupnya kemudian disimpan dalam kotak pendingin yang berisi es batu untuk menjaga agar bakteri yang hidup dalam spons *Stylissa sp.* tetap hidup dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Samratulangi. Setelah itu sampel di identifikasi (secara morfologi) kemudian dibersihkan dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel dan dilakukan sterilisasi permukaan untuk menghilangkan kotoran maupun mikroorganisme epifit lain.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pada pengujian ini ada beberapa proses yang harus dilakukan untuk mendapatkan hasil pengujian aktivitas antibakteri. Seperti pembuatan larutan Mec Farland 0.5, pembuatan suspense dan bakteri uji, penyiapan bakteri simbiosis endofit, pengujian aktivitas antibakteri, serta pengamatan dan pengukuran zona hambat. Proses pengujian ini menggunakan metode difusi sumuran Kirby dan Bauer.

Larutan Mec Farland merupakan penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan $BaCl_2$ 1% dan H_2SO_4 1%. Standar kekeruhan Mec Farland ini untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada pengujian antibakteri.

Setelah dilakukan pembuatan larutan Mac Farland 0.5, selanjutnya dilakukan pembuatan suspense dan penyiapan bakteri uji. Isolat bakteri endofit spons *Stylissa sp.* Diambil sebanyak satu ose untuk diinokulasi ke dalam 5 mL media cair NA dan diinokubasi selama 24 jam dalam alat pengocok.

Sumuran yang sudah steril di letakan secara aseptis pada 10 mL media yang sudah mengeras, kemudian dituangkan kembali 10 mL media

berikutnya. 70 µL kultur isolat bakteri endofit ditetaskan kedalam sumuran dan di inkubasi selama 18-24 jam. Untuk membandingkan aktivitas isolat digunakan antibiotik amoxicilin sebagai kontrol positif (+) dan aquades sebagai kontrol negatif (-). Yang bertujuan untuk membandingkan ukuran daya hambat isolat bakteri yang akan terbentuk.

Setelah diinkubasi selama 18-24 jam, kemudian disekitar sumuran diamati zona bening yang terbentuk. Daerah bening disekitar sumuran menunjukkan kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan diameter zona hambat. Kemudian diukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat yang terukur kemudian di kategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan pedoman *Clinical and Laboratory Standar Institute (CLSI)*.

Identifikasi Bakteri Endofit Secara Molekuler

Prinsip isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya seperti protein dan karbohidrat. Setelah dilakukan proses isolasi DNA Genomik, selanjutnya sampel isolat di amplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Dalam tahap ini DNA yang sudah di amplifikasi kemudian diseparasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Gel direndam dalam campuran larutan etidium bromide dan TBE buffer. Kemudian dilakukan visualisasi dengan sinar UV pada UV-transiluminator. Hasil yang terdeteksi kemudian di dokumentasikan.

Hasil dari sekuensing DNA, dianalisis menggunakan program BLAST melalui media online NCBI yang bertujuan untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA untuk menentukan spesies isolat bakteri endofit dari spons *Stylissa sp.* yang memiliki daya antibakteri terbesar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Symbion Endofit Dari Spons

Berdasarkan identifikasi secara morfologi di dapati jenis sampel yang di ambil dari perairan Malalayang merupakan jenis spons *Syllisa sp.* Jenis spons ini dipilih pada saat pengambilan sampel, karena spons ini merupakan yang paling dominan dan nampak berwarna cerah di dalam air. Juga spons ini banyak ditemukan pada perairan Malalayang yang terdapat pada kedalaman laut ± 2,5 m. Adapun ciri-ciri morfologi yang di amati dari spons yang menyerupai spons *Styllisa sp.* yaitu berwarna oranye dan memiliki tekstur yang lunak. Spesies spons ini hidup menempel pada substrat berbatu atau karang di perairan.

Dari hasil pengenceran secara bertingkat 10^{-1} - 10^{-7} yang telah di tumbuhkan pada cawan yang berisi media NA, hanya didapati 3 dari 7 cawan yang berhasil ditumbuhkan bakteri endofit dari spons *Styllisa sp.* yang pantas untuk diinokulasi untuk mendapatkan bakteri murni. Hal ini dikarenakan pada saat penyebaran atau pemerataan sampel digunakan *L glass* yang masih panas, sehingga sampel dari hasil pengenceran tidak dapat tumbuh pada media.

Bakteri yang bersimbiosis dengan spons dari perairan Malalayang berhasil ditumbuhkan pada media NA. Keberhasilan pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni pada media setelah media yang diinokulasi dengan sampel diinkubasi pada suhu 29°C selama 18-24 jam. Setiap koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan berdasarkan warna, ukuran dan bentuk koloni, serta diisolasi dengan menumbuhkannya pada media yang sama. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi, diperoleh 3 isolat bakteri symbion spons *Styllisa sp.* yang berbeda.

Karakteristik Morfologi Bakteri Symbion Endofit Spons *Styllisa sp.*

Morfologi bakteri symbion pada spons *Styllisa sp.* telah diamati secara makroskopis dengan mengacu pada Cappucino dan Sherman (1998).

Tabel 1. Pengamatan secara Makroskopis Karakteristik Isolat Bakteri dari Spons *Styllisa sp*

Kode Isolat	Karakteristik		Koloni	
	Warna	Tepi	Elevasi	Bentuk
E1	Krem	Bergerigi	Datar	Tak beraturan
E2	Putih	Rata	Datar	Bulat
E3	Oranye	Rata	Cembung	Bulat

Berdasarkan tabel diatas, isolat E1 memiliki bentuk koloni yang tidak beraturan, terlihat elevasi yang datar dan tepian koloni yang bergerigi, dengan warna dominan adalah krem. Selanjutnya

untuk isolat E2 berwarna putih, berbentuk bulat, dengan elevasi datar dan pada tepian koloni rata. Sedangkan untuk isolat E3 memiliki bentuk yang dominan bulat, terlihat elevasi cembung,

memiliki tepian yang rata dan dominan warna adalah oranye. Hal ini disebabkan kerapatan isolat dan ketersediaan nutrisi dalam media.

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan secara mikroskopik pada ketiga bakteri isolat. Untuk pengamatan karakteristik secara mikroskopik dilakukan dengan metode pewarnaan Gram. Hasil yang didapat ditunjukkan pada tabel berikut ini:

Tabel 2. Hasil Karakterisasi Mikroskopik Isolat Bakteri Symbion Endofit

Kode Isolat	Karakteristik Bakteri	
	Bentuk sel	Gram
E1	Basil	Positif
E2	Basil	Positif
E3	Kokus	Negatif

Pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan jenis bakteri berdasarkan dinding selnya. Dari hasil pewarnaan gram pada tabel 2, isolat dengan kode E1 dan E2 memiliki karakteristik yang sama baik bentuk sel dan gram. Dimana bentuk kedua sel isolat E1 dan E2 yaitu Basil dengan gram positif. Hal ini disebabkan karena kedua isolat tersebut mempertahankan warna kristal violet, sedangkan untuk isolat dengan kode E3 memiliki bentuk sel Kokus dengan gram negatif. Gram negatif merupakan Gram yang dominan karena kemampuan bakteri dalam mengikat safranin sangat kuat. Dinding sel dari bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan tipis yang dibungkus oleh lipoprotein atau lipopolisakarida. Bakteri gram negatif memiliki tiga lapisan dinding sel. Lapisan

terluar yaitu lipopolisakarida (lipid) kemungkinan terbilas oleh alkohol, sehingga pada saat diwarnai dengan safranin akan berwarna merah (Kumala *et al.*, 2010).

Pengukuran Zona Hambat Aktivitas Antibakteri

Isolat bakteri yang memiliki aktifitas antibakteri, diuji untuk mendeteksi kemampuan menghasilkan antibakteri dengan mengukur besar zona hambat yang dihasilkan oleh setiap isolat bakteri terhadap bakteri uji dan dibandingkan dengan kontrol positif (amoxicilin). Kemampuan menghasilkan antibakteri dari setiap isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Diameter Zona Hambat (mm) Bakteri Symbion Spons Terhadap Jenis Bakteri Uji.

No.	Kode Isolat	Rata-rata Diameter Zona Bening dari Bakteri Symbion Endofit (mm)	
		<i>Escherchia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	E1	7,26	10,26
2	E2	5,42	2,10
3	E3	0,96	0,17
4	Kontrol Positif	12,41	9,98
5	Kontrol Negatif	0,00	0,00

Berdasarkan hasil yang ditampilkan pada tabel 3, dapat dilihat bahwa setelah dilakukan pengujian terhadap kedua bakteri uji, rata-rata isolat bakteri yang bersimbiosis dengan spons memiliki diameter zona bening yang cukup

berbeda. Zona bening yang paling besar didapat pada isolat E1. Dapat dilihat diantara isolat-isolat yang ada bahwa isolat dengan kode E1 memiliki aktivitas antibakteri yang cukup besar dibandingkan dengan isolat dengan kode E2 dan

E3. Dari setiap isolat dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah amoxicillin, dan didapati hasil zona bening yang terbentuk dari kontrol positif dengan rata-rata adalah 11,15 mm. Dari salah satu isolat yang memiliki zona bening yang paling besar, akan digunakan untuk identifikasi molekuler gen 16S rRNA. Perbedaan kemampuan daya hambat pada setiap isolat ini juga kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh masing-masing isolat yang telah berdifusi terlebih dahulu ke dalam agar, sehingga pertumbuhan bakteri patogen menjadi terhambat (Lee *et al.*, 2001).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa jenis bakteri yang bersimbiosis dengan spons memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji yang dapat digunakan sebagai bahan antibakteri. Dari hasil pengujian antibakteri isolat bakteri simbiosis spons dapat membentuk zona hambat pada bakteri uji. Terbentuknya zona hambat pada koloni bakteri yang diuji menandakan bahwa isolat bakteri yang diuji melakukan aktifitas antibakteri. Hal ini menunjukkan adanya suatu hubungan antagonisme dimana satu bakteri tidak dapat hidup berdampingan dengan bakteri lain. Spesies yang lain akan menghasilkan sesuatu yang dapat meracuni spesies lainnya, sehingga pertumbuhan spesies terakhir akan terganggu karena zat yang dihasilkan oleh spesies yang antagonis mungkin berupa ekskret, maupun zat sisa makanan yang menentang kehidupan organisme lain. Oleh karena itu maka zat penentang disebut zat antibiotik (Sri Sumarsih, 2003).

Identifikasi Bakteri Endofit Secara Molekuler

Isolat bakteri dengan kode E1 yang memiliki daya hambat tertinggi diidentifikasi secara molekuler. Proses ini diawali dengan tahap ekstraksi DNA yang menggunakan *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid). Pada hasil visualisasi gel elektroforesis diperoleh pita DNA yang menunjukkan keberhasilan ekstraksi total DNA genom pada sampel dalam penelitian ini. Pita DNA yang muncul pada lintasan gel menunjukkan bahwa DNA berhasil diisolasi dan dapat digunakan pada tahap identifikasi molekuler selanjutnya (Surzycki, 2000).

Hasil ekstraksi DNA bakteri E1 digunakan sebagai DNA *template* dalam proses amplifikasi gen menggunakan rancangan primer *forward* BKXF (5'- GCY TAA YAC ATG CAA GTCG-

3') dan primer *reverse* BKYR (5'-TTG ACG TCA TCC CCA CCT TCC-3'). Hasil amplifikasi menunjukkan adanya pita DNA yang jelas pada posisi panjang *base phare* sekitar 1200 bp dengan menggunakan 1 kb DNA *ladder* sebagai pembanding.

Sampel yang berhasil di amplifikasi kemudian di kirim ke 1st BASE Malaysia untuk disekuens. Dari data hasil sekuensing yang diperoleh disunting dengan menggunakan perangkat lunak *Geneious*. Kemudian hasil yang didapat dipilih segmen DNA dengan kualitas terbaik. Urutan nukleotida kemudian disalin untuk dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses secara *online* melalui website NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Berdasarkan hasil analisis BLAST yang diperoleh dari sekuens DNA isolat E1, diketahui bahwa nilai *Total score* 673, *query coverage* 100%, *e-value* 0.0, *identity* 99% dengan hasil berupa bakteri *Bacillus cereus*.

Bakteri *Bacillus cereus*

Bakteri *Bacillus* adalah bakteri gram positif berbentuk batang (basilus) dan anggota dari filum Firmicutes. Spesies *Bacillus* dapat aerob obligat (bergantung pada oksigen), atau anaerob fakultatif (memiliki kemampuan untuk menjadi aerobik atau anaerobik). Bakteri *Bacillus* akan teruji positif untuk enzim katalase ketika ada oksigen yang digunakan. *Bacillus* meliputi spesies yang hidup bebas (nonparasitik) dan patogen parasitik. Dalam kondisi lingkungan stres, bakteri ini dapat menghasilkan endospora oval yang bukan spora sejati, tetapi bakteri dapat mengurangi diri mereka sendiri dan tetap dalam keadaan tidak aktif untuk jangka waktu yang lama. Bakteri *Bacillus* telah banyak diidentifikasi, salah satu bakteri *Bacillus* yang sudah teridentifikasi spesies yaitu bakteri *Bacillus cereus* (Madigan *et al.*, 2012).

Bakteri *Bacillus cereus* merupakan golongan bakteri Gram-positif (bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram), berbentuk batang kecil dengan ukuran 0,3-2,2 x 1,2-7,0 µm, tumbuh secara aerob fakultatif (dapat menggunakan oksigen tetapi dapat juga menghasilkan energi secara anaerobik), dan dapat membentuk spora (endospora). Spora *Bacillus cereus* lebih tahan pada panas kering daripada pada panas lembab dan dapat bertahan lama pada produk yang kering (Dwidjoseputro, 2005).

Beberapa jaringan yang terdapat dalam bakteri *Bacillus cereus* berbahaya bagi manusia dan menyebabkan penyakit bawaan dari makanan, sementara jaringan lainnya dapat bermanfaat sebagai probiotik untuk hewan (Turnbull PCB. 1996).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Diperoleh 3 (tiga) jenis bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari spons *Stylissa sp.* Masing-masing isolat diberi kode E1, E2, dan E3.
2. Pada pengujian aktivitas antibakteri bakteri simbiosis endofit yang diisolasi dari spons *Stylissa sp.*, ketiga isolat memiliki aktivitas. Jumlah rata-rata zona hambat terhadap bakteri *Escherchia coli* yaitu, E1 (7,26 mm) termasuk kategori sedang, E2 (5,42 mm) termasuk kategori sedang, E3 (0,96 mm) dengan kategori lemah. Sedangkan daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu, E1 (10,26 mm) dengan kategori sedang, E2 (2,10 mm) termasuk kategori sedang, dan E3 (0,17 mm) pada kategori lemah.
3. Bakteri endofit yang memiliki daya antibakteri terbesar ialah isolat E1 yang berdasarkan analisis secara molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi dan purifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis endofit spons *Stylissa sp.* serta pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri uji yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Cappucino, J.G., dan Sherman, N. 1992. *Microbiology a Laboratory Manual*. The Benjamin Cummings Publishing, USA.
- Dajoh, O. P. P. L. 2004. *Pengujian Aktifitas Antibakteri dari Sponge di Perairan Selat Lembeh*. [Skripsi], FPIK. Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Dwijoseputro. D. 2005. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Djambatan: Jakarta

Lee, Y.K., Jung H.L., and Hong K.L., 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges, *The Journal of Microbiology*, 39(4): 254-264.

Madigan, Marthinko., Stahl., and Clark. 2012. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. San Francisco.

Peloa, A. 2015. *Amplifikasi Gen Cythrome Oxidase Subunit I (COI) dari Sampel Sirip Ikan Hiu dengan Menggunakan Beberapa Pasangan Primer*. [Skripsi]. FPIK. Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Sri Sumarsih. 2003. *Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian UPN, Yogyakarta.

Surzycki, S. 2000. *Basic techniques in molecular biology*. Springer. Berlin.

Turnbull PCB. 1996. *Bacillus*. In: *Barron's Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch, Galveston.

Taylor, M. W., Radax R., Steger D., and Wagner M., 2007. Sponge-Associated microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotecnological Potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 295-347.