

ISOLASI, IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA, DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERI SIMBION ENDOFIT YANG DIISOLASI DARI ALGA *Halimeda opuntia*

Castly Herny Rau¹⁾, Adithya Yudistira¹⁾, Herny E. I. Simbala¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Algae is one of the primary producers in marine ecosystem whose existence in Indonesia is quite abundant. Algae is the living place of various microorganisms that are symbiotic with it, included bacteria. Endophytic symbiont bacteria of algae has potential as a candidate of antibiotic producing agent, because it is able to produce bioactive metabolite that can inhibit the growth of pathogenic bacteria. The objective of this study is to isolate and test the antibacterial activity of endophytic symbiont bacteria of Halimeda opuntia, and to carry out molecular identification using 16S rRNA gene to identify the endophytic bacteria isolate that showing the greatest antibacterial power. A total of 3 isolates of endophytic symbiont bacteria were obtained through the purification process. The results of antibacterial activity test showed that all the supernatants of endophytic symbiont bacteria isolates had inhibitory activity against the growth of pathogenic bacteria. The mean diameter of the inhibitory zone against Escherichia coli were: Ho-B1 (6.86 mm) and Ho-B2 (8.53 mm) classified as intermediet, and Ho-B3 (4.36 mm) classified as weak. While the antibacterial activity against Staphylococcus aureus bacteria were: Ho-B1 (6,15 mm) and Ho-B2 (6,84 mm) classified as intermediet, and Ho-B3 (3,84 mm) classified as weak. The Ho-B2 isolate which had the highest inhibitory index in the antibacterial activity test was identified molecularly as Bacillus sp.

Keywords : *Halimeda opuntia, endophytic symbiont bacteria, isolation, antibacterial activity, molecular identification, 16S rRNA gene*

ABSTRAK

Alga merupakan salah satu produsen primer di ekosistem perairan laut yang keberadaannya di Indonesia cukup melimpah. Alga merupakan tempat hidup berbagai mikroorganisme yang bersimbiosis dengannya, salah satunya ialah bakteri. Bakteri simbiosis endofit alga berpotensi sebagai kandidat agensia penghasil antibiotik, karena mampu menghasilkan metabolit bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan pengujian aktivitas antibakteri dari bakteri simbiosis endofit alga *Halimeda opuntia*, serta melakukan identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA terhadap isolat bakteri simbiosis yang menunjukkan daya antibakteri terbesar. Sebanyak 3 isolat bakteri simbiosis endofit berhasil diperoleh melalui tahap purifikasi. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa supernatan ketiga isolat bakteri simbiosis endofit memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Diameter rata-rata zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu: Ho-B1 (6,86 mm) dan Ho-B2 (8,53 mm) tergolong kategori sedang, dan Ho-B3 (4,36 mm) tergolong kategori lemah. Sedangkan daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu: Ho-B1 (6,15 mm) dan Ho-B2 (6,84 mm) tergolong kategori sedang, dan Ho-B3 (3,84 mm) tergolong kategori lemah. Isolat Ho-B2 yang memiliki indeks penghambatan tertinggi dalam pengujian aktivitas antibakteri teridentifikasi secara molekuler sebagai *Bacillus* sp.

Kata kunci : *Halimeda opuntia, bakteri simbiosis endofit, isolasi, aktivitas antibakteri, identifikasi molekuler, gen 16S rRNA*

PENDAHULUAN

Alga/rumput laut merupakan sejenis tumbuhan tingkat rendah yang keberadaannya di Indonesia cukup melimpah. Pemanfaatan alga dalam bidang farmasi selama ini masih terbatas, sedangkan potensi alga laut di Indonesia lebih khusus di Sulawesi Utara sangat besar. Potensi alga laut Indonesia sangat besar untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat karena mengandung senyawa bioaktif yang memiliki banyak manfaat. Salah satu contoh alga laut ialah *Halimeda opuntia* (Purnama *et al.*, 2011; Widiastuti, 2003).

Mikroba memiliki jumlah yang sangat banyak dibandingkan dengan jumlah makhluk hidup lain di bumi. Pertumbuhan mikroba, khususnya bakteri, banyak dijumpai dengan cara hidup berasosiasi dengan berbagai organisme laut, salah satunya ialah alga (Wantania *et al.*, 2016). Untuk mengambil senyawa bioaktif secara langsung dari tanamannya dibutuhkan sangat banyak biomassa atau bagian dari tanaman tersebut. Untuk mengefisienkan cara memperoleh senyawa bioaktif tersebut, maka digunakan mikroba endofit spesifik yang diperoleh dari bagian dalam tanaman yang diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang dibutuhkan tanpa harus mengekstrak dari tanamannya. Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis yang hidup di dalam jaringan tanaman (xilem dan floem), daun, akar, buah, dan batang. Senyawa yang dihasilkan oleh mikroba

endofit mirip dengan inangnya dan diduga sebagai hasil koevolusi atau transfer genetik dari inang (Tan dan Zou, 2001).

Pencarian bakteri endofit yang banyak terdapat pada tumbuhan dilakukan untuk menambah atau memperkaya koleksi mikroba. Selanjutnya mikroba tersebut perlu diidentifikasi untuk mengetahui sifat pertumbuhan dan jenisnya, sehingga lebih lanjut dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan (Noverita *et al.*, 2009). Dengan berkembangnya identifikasi mikroorganisme, maka saat ini identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan metode berbasis molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari mikroba endofit yang diisolasi dari alga *Halimeda opuntia*. Untuk mengetahui jenis bakteri endofit yang memiliki daya antibakteri terbesar, maka dilakukan analisis secara molekuler terhadap gen 16S rRNA.

METODE PENELITIAN

Alat

Masker, sarung tangan, snorkel, fins, *cooling box*, *zipper bag*, erlenmeyer (*Iwaki ST Pyrex*), gelas ukur mL (*Iwaki ST Pyrex*), tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik (*ADAM*), lumpang dan alu, pisau, cawan petri (*Iwaki ST Pyrex*), jarum ose, pinset, *rotary shaker incubator (Infors HT)*, bunsen, lemari pendingin, cetakan sumur diameter 7

mm, *laminar air flow* (Biotek), autoklaf (ALP), mikropipet (*Ecopipette*), tip, *L-Glass*, jangka sorong, kertas label, plastik *wrap*, *aluminium foil*, tisu, kapas, kasa, mikroskop cahaya, kaca objek, seperangkat alat PCR (*Biometra T-Personal*) dan elektroforesis (*Biometra T-Personal*), alat fotografi.

Bahan

Sampel alga *Halimeda opuntia*, bakteri uji *Escherichia coli* (ATCC 25922) dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), aquades, etanol 70%, etanol 95%, NaCl 0.9%, Natrium Hipoklorit (NaOCl) 5,25%, media *Nutrient Agar*, media *Nutrient Broth*, antibiotik amoksisilin 0,1 mg/mL, kristal violet, lugol, larutan safranin, kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), primer set (untuk bakteri), *Master Mix* untuk amplifikasi DNA (Bioline), ddH₂O, gel agarosa, TBE *buffer* 0.5x, dan etidium bromida.

Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel alga *Halimeda opuntia* diambil dari perairan pantai Malalayang menggunakan alat bantu (masker, snorkel dan fins). Sampel dimasukkan ke dalam *zipper bag* dan disimpan dalam *cooling box* berisi es batu untuk dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi. Sampel diidentifikasi (secara morfologi) kemudian dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan dilakukan sterilisasi permukaan untuk menghilangkan pengotor maupun

mikroorganisme epifit lain yang dapat mengontaminasi.

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Symbion Endofit

Penanaman bakteri endofit yang bersimbiosis dengan alga dilakukan dengan metode sebaran menurut Madigan (2012). 1 gram sampel alga yang telah disterilisasi permukaannya dihancurkan dengan cara digerus dengan lumpang dan alu sampai halus. Selanjutnya, 1 gram sampel yang telah halus tersebut dimasukkan ke dalam 9 mL aquades steril sehingga diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Pengenceran bertingkat selanjutnya dilakukan untuk seri 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Dari masing-masing seri kemudian diambil 100 μ L dan disebarkan ke dalam cawan petri steril yang berisi media NA dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 27-29°C selama 1x24 jam. Koloni bakteri endofit yang tumbuh diamati warna, bentuk, elevasi, tepian dan ukurannya. Koloni-koloni bakteri dipisahkan dengan jarum ose berdasarkan perbedaan karakteristik makroskopik dan mikroskopiknya pada media NA baru dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 27-29°C selama 24 jam. Isolat yang telah murni kemudian dipindahkan dan disimpan pada media NA miring.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Bakteri symbion endofit disiapkan dengan cara satu ose isolat bakteri endofit alga diinokulasikan ke dalam 5 mL media cair NB dan diinkubasi selama 24 jam dalam *rotary shaker* dengan suhu 27-29°C. Masing-

masing koloni bakteri simbion endofit dalam media cair kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terbentuk diambil.

Pengujian dilakukan dengan metode difusi sumuran, yaitu dengan menuangkan 20 mL media NA ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Pada permukaan lapisan media pertama tersebut kemudian diletakkan cetakan sumur secara aseptis, kemudian dituangkan 20 mL media NA yang telah dicampurkan dengan suspensi bakteri uji ke atas permukaan lapisan media pertama dan didiamkan hingga memadat. Selanjutnya, cetakan sumur diangkat dan ke dalam tiap sumur dimasukkan supernatan bakteri simbion endofit, kontrol positif, dan kontrol negatif masing-masing sebanyak 50 µL. Pengamatan dilakukan terhadap zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0.05 mm (Ortez, 2005). Diameter zona hambat yang terukur kemudian dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan kekuatan daya antibakteri menurut Davis dan Stout (1971).

Identifikasi Bakteri Endofit Secara Molekuler

Isolasi dan Pemurnian DNA

Isolasi DNA Genomik dari kultur bakteri dilakukan dengan *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid) yang telah dimodifikasi.

Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *combi block* (whatman biometra Germany). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan primer BKXF (*forward*) dan BKXR (*reverse*). Cetakan yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA yaitu DNA genomik bakteri yang telah diisolasi. Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR yang telah dimodifikasi.

Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi

DNA yang telah diamplifikasi kemudian diseparasi dengan *elektroforesis gel agarosa* 1%. Gel direndam dalam campuran larutan Tris-Borat-EDTA *buffer* dan etidium bromida. Visualisasi dilakukan dengan sinar UV pada UV-transiluminator. Hasil deteksi didokumentasikan.

Sekuensing Gen 16S rRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin *autosequencing*. Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim sampel ke *First Base Pte. Malaysia*.

Pengolahan Data Sekuens DNA

Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan perangkat lunak Geneious. Hasil sekuensing DNA kemudian dianalisis

menggunakan program BLAST melalui media *online* NCBI untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan jenis isolat bakteri endofit dari alga *Halimeda opuntia* yang memiliki daya antibakteri terbesar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Sampel yang diperoleh dilakukan sterilisasi permukaan yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan mikroorganisme epifit yang menempel pada permukaan sampel, sehingga koloni yang tumbuh pada media isolasi merupakan koloni endofit (Strobel dan Daisy, 2003).

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Symbion Endofit

Sampel yang telah disterilisasi permukaan kemudian dihancurkan dengan cara digerus sampai halus, dengan tujuan untuk memperbesar luas permukaan jaringan dalam alga yang terbuka dan mengoptimalkan proses penanaman bakteri symbion endofit dari

alga. Pengenceran menggunakan aquades dilakukan agar bakteri yang dihasilkan tidak terlalu pekat. Pemurnian (purifikasi) koloni-koloni bakteri yang tumbuh dilakukan untuk memisahkan koloni-koloni bakteri agar mendapatkan isolat bakteri yang murni, yaitu kultur koloni bakteri murni yang hanya mengandung satu karakteristik morfologi yang sama.

Dari hasil pemurnian diperoleh 3 (tiga) isolat bakteri murni. Masing-masing isolat diberi kode Ho-B1, Ho-B2, dan Ho-B3. Setiap isolat dibuat duplo sebagai *working culture* dan *stock culture* (Noverita *et al.*, 2009).

Karakterisasi biakan bakteri endofit dilakukan terhadap ketiga isolat. Karakterisasi dilakukan melalui pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan karakteristik makroskopik dilakukan pada ketiga isolat bakteri dengan menentukan perbedaan sifat-sifat koloni dalam media padat meliputi bentuk, elevasi, tepian, warna, dan ukuran koloni. Untuk pengamatan karakteristik secara mikroskopik dilakukan dengan metode pewarnaan Gram.

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Makroskopik Isolat Bakteri Symbion Endofit

<i>Kode Isolat</i>	<i>Karakteristik Morfologi Koloni</i>				
	Bentuk	Elevasi	Tepian	Warna	Ukuran
<i>Ho-B1</i>	Bulat	Serupa kawah	Berombak	Bening	Kecil
<i>Ho-B2</i>	Tak-teratur	Mendatar	Berbenang	Putih	Sedang
<i>Ho-B3</i>	Bulat	Mencembung	Utuh	Putih-Kekuningan	Sedang

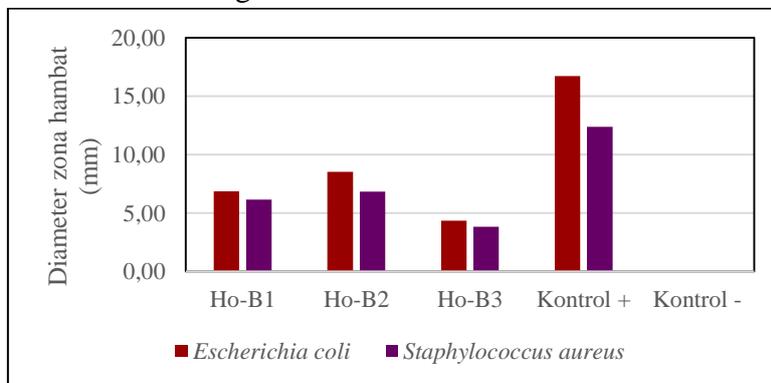
Tabel 2. Hasil Karakterisasi Mikroskopik Isolat Bakteri Simbion Endofit

Kode Isolat	Karakteristik Bakteri	
	Bentuk Sel	Gram
Ho-B1	Basil	Positif
Ho-B2	Basil	Positif
Ho-B3	Basil	Negatif

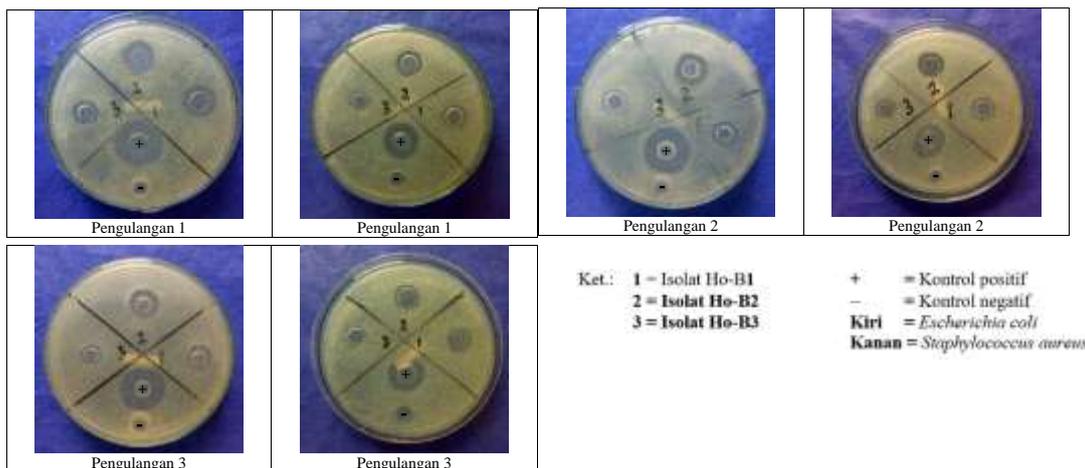
Pengujian Aktivitas Antibakteri

Dalam pengujian ini, hasil yang diperoleh yaitu terbentuknya zona hambat yang ditandai dengan area bening di sekeliling lubang sumuran berukuran 7 mm. Hal ini menunjukkan adanya kepekaan bakteri uji terhadap cairan supernatan hasil sentrifugasi dari

masing-masing isolat bakteri endofit yang diisolasi dari alga *Halimeda opuntia* serta sumuran berisi antibiotik Amoksisilin (kontrol positif). Pengujian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 (tiga) kali dengan tujuan untuk lebih mengakuratkan hasil pengujian yang diperoleh.



Gambar 1. Diagram Perbandingan Rata-rata Diameter Zona Hambat Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri



Gambar 2. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri

Kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri uji yang direpresentasikan oleh terbentuknya zona bening pada pengujian aktivitas

antibakteri dari supernatan bakteri simbion endofit alga *Halimeda opuntia* disebabkan oleh kemampuan dari bakteri simbion endofit untuk

menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif dan dapat berfungsi untuk menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen. Bakteri simbion endofit mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, terpen, steroid, flavonoid, kuinon, fenol, dan lain sebagainya. Senyawa-senyawa ini sebagian besar mempunyai potensi sebagai senyawa bioaktif (Tan dan Zou, 2001).

Berdasarkan penggolongan kekuatan daya antibakteri menurut Davis dan Stout (1971), maka diameter rata-rata daya antibakteri supernatan bakteri simbion endofit dari alga *Halimeda opuntia* terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu: Ho-B1 (6,86 mm) dan Ho-B2 (8,53 mm) tergolong kategori sedang, dan Ho-B3 (4,36 mm) tergolong kategori lemah. Daya antibakteri supernatan bakteri simbion endofit dari alga *Halimeda opuntia* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu: Ho-B1 (6,15 mm) dan Ho-B2 (6,84 mm) tergolong kategori sedang, dan Ho-B3 (3,84 mm) tergolong kategori lemah.

Identifikasi Bakteri Endofit dengan Analisis Gen 16S rRNA

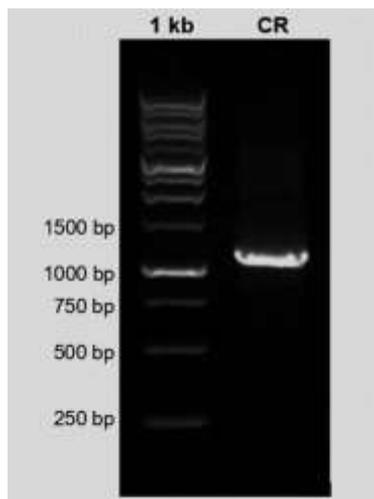
Identifikasi secara molekuler dilakukan pada isolat bakteri simbion endofit dari alga *Halimeda opuntia* yang memiliki daya hambat terbesar pada pertumbuhan kedua bakteri uji, yaitu isolat Ho-B2.

Identifikasi bakteri diawali dengan ekstraksi DNA dengan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid). Proses lisis (perusakkan atau

penghancuran membran dan dinding sel) dilakukan menggunakan *buffer* GP1. Suhu pemanasan yang dilakukan ialah 60°C selama 15 menit. *Buffer* GP2 berfungsi sebagai *buffer* penetral, dan *buffer* GP3 berfungsi mengikat DNA ke *buffer* serta *spin column*. Proses pencucian dilakukan secara berturut-turut menggunakan *buffer* W1 (untuk menghilangkan sisa-sisa protein yang menempel pada DNA), *Wash Buffer* (untuk mencuci garam-garam *buffer* sebelumnya), dan terakhir DNA dilarutkan dalam *elution buffer* (untuk melepaskan DNA dari membran).

Hasil ekstraksi DNA kemudian diamplifikasi dengan PCR (*Polimerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer untuk gen 16S rRNA BKXF (*forward*) dan BKXR (*reverse*) yang dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA sepanjang 1.200 bp (Kolondam, *in press*). Pada proses amplifikasi ini, terjadi perbanyakan DNA pada daerah tertentu yang dibatasi oleh primer. Hasil PCR ini yang kemudian digunakan untuk tahap sekuensing DNA (Rahayu dan Nugroho, 2015).

Produk PCR berupa DNA yang telah teramplifikasi kemudian dielektroforesis sebagai uji kualitatif untuk mengukur konsentrasi DNA yang diperoleh dari proses PCR. Dari hasil elektroforesis diketahui terdapat fragmen DNA yang berukuran berkisar 1.200 bp yang terseparasi dibandingkan dengan marka DNA yang merupakan fragmen DNA standar yang digunakan.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Produk PCR

Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim produk PCR DNA ke *First Base Pte.* Malaysia. Data hasil sekuensing yang diperoleh selanjutnya dibuka dan disunting dengan menggunakan perangkat lunak *Geneious*. Berdasarkan hasil visualisasi dalam perangkat lunak *Geneious*, dipilihlah segmen DNA dengan kualitas pembacaan terbaik. Urutan nukleotida tersebut (sekuens *query*) 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>). Hasil analisis BLAST menunjukkan nama bakteri dan tingkat kesamaan urutan nukleotida dari DNA isolat dengan urutan nukleotida dari spesies bakteri yang sesuai dalam *database* GeneBank. Berdasarkan hasil analisis BLAST yang diperoleh dari sekuens DNA isolat Ho-B2, diketahui bahwa isolat Ho-B2 dengan nilai *score* 725, *query coverage* 100%, *maximum identity* 97%, dan *e-value* 0.0 merupakan bakteri *Bacillus* sp.

KESIMPULAN

1. Terdapat 3 (tiga) jenis bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari alga *Halimeda opuntia*. Masing-masing isolat diberi kode Ho-B1, Ho-B2, dan Ho-B3.
2. Ketiga isolat bakteri simbiosis endofit dari alga *Halimeda opuntia* menunjukkan adanya kemampuan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Diameter rata-rata zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu: Ho-B1 (6,86 mm), Ho-B2 (8,53 mm), dan Ho-B3 (4,36 mm). Sedangkan daya antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu: Ho-B1 (6,15 mm), Ho-B2 (6,84 mm), dan Ho-B3 (3,84 mm).
3. Bakteri endofit yang memiliki daya antibakteri terbesar ialah isolat Ho-B2 yang berdasarkan analisis secara molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi dan purifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis endofit alga *Halimeda opuntia*, serta pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri uji yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Davis, W. W. dan Stout, T. R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology*. **22**(4): 659-665.
- Kolondam, B. J. *Primer BKXF dan BKXR*, (siap terbit).

- Madigan, J., David, A. S., David, P. C. 2012. *Biology of Microorganism 13th Edition*. Benjamin Cummings, USA.
- Noverita, Fitria, D., Sinaga, E. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4(4)**: 171-176.
- Ortez, J. H. 2005. *Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society For Microbiology, USA.
- Purnama, R., Melki, Wike, A. E. P., Rozirwan. 2011. Potensi Ekstrak Rumput Laut *Halimeda rencii* dan *Euchema cottonii* sebagai Antibakteri *Vibrio* sp. *Maspari Journal*. **2**: 82-88.
- Rahayu, D. A. dan Nugroho, E. D. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi. Plataxia, Yogyakarta*.
- Strobel, G. A. dan Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Review*. **67(4)**: 491-502.
- Tan, R. X. dan Zou, W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Product Reports*. **18**: 448-459.
- Wantania, L. L., Ginting, E. L., Wullur, S. 2016. Isolasi Bakteri Simbion dengan Spons dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. **1(3)**: 57-65.
- Widiastuti, H. N. 2003. Uji Aktivitas Metabolit Sekunder dari Rumput Laut *Halimeda macroloba* sebagai Senyawa Bioaktif Antijamur *Candida albicans* dan *Torula histolutica*. *Ilmu Kelautan*. **8(2)**: 114-118.