



Penapisan Aktivitas Antibakteri dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Lunak *Sarcophyton* sp

Chairul Huda, Salni, Melki

Program Studi Ilmu Kelautan FMIPA, Universitas Sriwijaya, Indralaya, Indonesia

Received 10 October 2011; received in revised form 29 October 2011;
accepted 23 November 2011

ABSTRACT

A screening of antibacterial activity from bacteria associating with soft coral *Sarcophyton* sp from Tegal island, Lampung, was conducted. The purpose of this screening was to get bacterial isolates that have antibacterial activity with *Escherichia coli* and *Stapilococcus aureus* and also to determine the biochemical characters from the bacteria that have the antibacterial activity. The sample of soft coral was taken by snorkeling at 1,5 meters depth. The bacteria that associated with soft coral were isolated by dilution and pour plate method on NA media. The test of antibacterial activity was done by using agar diffusion method with paper discs. Isolates that have antibacterial activity were tested to check their biochemical characters. From 10 bacteria isolates that have associated with soft coral *Sarcophyton* sp were obtained, there were two isolates had antibacterial activity (D1.1 to *E. coli* and D2.2 to *S. Aureus*). Both bacteria isolates were gram negative and motil. In catalyst test, oxidation, urea, citrate, and carbohydrate fermentation both bacteria isolates showed positive reaction. With VP test, D1.1 isolate showed positive reaction but D2.2 showed negative reaction. In contrary, with gelatin isolate test, isolate D1.1 showed negative reaction but D2.2 positive.

Keywords: Bacteria associations, soft corals, *Sarcophyton* sp, antibacterial, biochemical tests

ABSTRAK

Telah dilakukan penapisan aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sarcophyton* sp dari perairan Pulau Tegal, Lampung. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* serta mengetahui sifat biokimia dari bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri tersebut. Pengambilan sampel karang lunak dilakukan dengan teknik *snorkeling* pada kedalaman 1,5 meter. Bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak diisolasi dengan metode pengenceran bertingkat dan *pour plate* pada media NA. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan paper disk. Isolat yang memiliki aktivitas antibakteri diuji sifat biokimianya. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan 10 isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sarcophyton* sp, dan dari 10 isolat tersebut didapat 2 isolat yang memiliki aktivitas antibakteri (D1.1 terhadap *E. coli* dan D2.2 terhadap *S. aureus*). Kedua isolat bakteri ini merupakan bakteri gram negatif dan motil. Pada uji katalase, oksidase, urea, sitrat dan fermentasi karbohidrat, kedua isolat bakteri baik D1.1 maupun D2.2 sama-sama menunjukkan reaksi yang positif. Uji MR kedua isolat sama-sama menunjukkan reaksi negatif. Sedangkan pada uji VP isolat bakteri D1.1 menunjukkan reaksi positif dan D2.2 negatif. Sebaliknya, pada uji gelatin isolat D1.1 menunjukkan reaksi negatif dan D2.2 positif.

Kata Kunci: Bakteri asosiasi, karang lunak, *Sarcophyton* sp, antibakteri, uji biokimia

I. PENDAHULUAN

Terumbu karang adalah ekosistem dengan keanekaragaman jenis biota yang tinggi. Dalam ekosistem terumbu karang, biota yang paling dominan ialah karang batu. Dengan kerangka yang keras dan bentuk serta ukurannya yang beraneka ragam, karang batu digunakan sebagai tempat hidup, berlindung, berkembang biak dan mencari makan bagi biota laut lainnya seperti anggota dari crustacea, echinodermata, porifera, moluska, ikan, bahkan jenis coelenterata lainnya. Salah satu biota penyusun terumbu karang yang juga memiliki bentuk dan koloni yang bervariasi adalah karang lunak (*Soft Coral*).

Sesuai dengan namanya, karang lunak memiliki bentuk tubuh yang lunak dan lentur. Jaringan tubuhnya disokong oleh sekumpulan duri-duri kecil yang kokoh dan tersusun sedemikian rupa sehingga tubuhnya yang lentur tidak mudah putus dan sobek. Duri-duri ini disebut spikula dan mengandung kalsium karbonat. Karang lunak juga merupakan hewan yang bersifat allelopatik, dengan mengeluarkan zat tertentu dari tubuhnya maka hewan lain ataupun predator tidak akan mendekatinya.

Zat yang dikeluarkan oleh karang lunak sebagai alat pertahanan diri tersebut merupakan jenis senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif ini berupa terpenoid, steroid dan steroid glikosida yang dapat dijadikan sebagai antibakteri patogen (antimikroba). Dari hasil penelitian menyebutkan bahwa sekitar 50% ekstrak karang lunak menunjukkan sifat racun pada ikan, selain itu banyak metabolit sekunder yang dihasilkan oleh karang lunak memiliki aktivitas biologi, seperti antifungal, sitotoksik, antineoplastik, antimikroba, inhibitor HIV dan anti-inflamatori (Radhika 2006 dalam Gunawan, 2007).

Sarcophyton sp adalah salah satu jenis karang lunak yang mampu

menghasilkan bahan bioaktif. Menurut Tursch *et al* (1978) dalam Manuputty (1998), bahan bioaktif yang terdapat pada *Sarcophyton* sp adalah sarcophine. Namun masalah serius dalam pengembangan senyawa bioaktif dari karang lunak adalah masalah suplai, karena untuk mendapatkan sejumlah relatif kecil senyawa bioaktif, diperlukan sejumlah besar karang lunak. Sehingga, apabila terjadi pemanfaatan secara berkesinambungan maka, kerusakan ekosistem terumbu karang akan menjadi masalah besar kedepannya.

Penelitian tentang asosiasi antara bakteri dan karang lunak penghasil senyawa bioaktif telah dilakukan oleh Harpeni & Hasani (2005), dari penelitian tersebut diketahui bahwa bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri. Untuk mengurangi kerusakan ekosistem terumbu karang dalam pemanfaatan senyawa bioaktif yang terkandung dalam karang lunak, maka pengisolasian jenis bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak penghasil senyawa bioaktif merupakan penelitian yang tepat untuk mengatasi masalah suplai karang lunak dalam pembuatan senyawa bioaktif sebagai antibakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sarcophyton* sp yang mempunyai aktivitas antibakteri yang dapat membunuh ataupun menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus*, serta mengetahui sifat biokimia bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba tersebut.

II. METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – Desember 2010. Pengambilan sampel karang lunak dilakukan di Pulau Tegal Perairan

Lampung dan dilanjutkan uji laboratorium di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, Inderalaya dan Laboratorium Karantina Ikan, Kementerian Kelautan Dan Perikanan Balai Karantina Ikan Kelas I Sultan Mahmud Badaruddin II, Palembang.

Alat yang digunakan meliputi kantong plastic, ice box, kapas, petri disk, hotplate, inkubator, jarum ose, jangka sorong, paper disk, blender, timbangan, autoklaf, tabung reaksi, pipet serologis, pipet volumetri, Erlenmeyer. Bahan yang digunakan adalah Sampel karang lunak, air Laut, aquades, NB, NA, *S. aureus*, *E. coli*, gelatin, MR-PV broth, Simmon's citrate agar, urea broth, alcohol, KOH 3%, H₂O₂ 3%, larutan karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, galaktosa, maltosa, dan fruktosa)

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel karang lunak dilakukan di Pulau Tegal Perairan Lampung dengan teknik *snorkling*. Sampel karang lunak diambil sebanyak \pm 200 gram dan kemudian dimasukkan dalam kantong plastik dan disimpan dalam icebox agar sampel tetap segar dan tidak rusak.

Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Lunak

Sampel karang lunak dihaluskan dengan menggunakan blender. Sampel yang telah halus diambil sebanyak 1 gr dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air laut. Untuk mendapatkan sampel koloni bakteri yang baik, maka sebelum dilakukan isolasi dilakukan pengenceran terhadap suspensi sampel bakteri. Pengenceran yang dilakukan adalah dengan menggunakan teknik pengenceran bertingkat (Irianto, 2008). Kemudian sampel diambil sebanyak 1 ml untuk diinokulasi pada

media nutrient agar dalam cawan petri \pm 15-20 ml secara aseptik (dengan menggunakan api Bunsen). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator selama 2 x 24 jam.

Pemurnian Isolat Bakteri

Pemurnian isolat bakteri bertujuan untuk memisahkan hasil inokulasi yang terdiri dari banyak koloni yang berlainan jenis sehingga didapat koloni murni pada setiap cawan petri. Koloni bakteri yang diambil untuk dimurnikan adalah koloni yang dominan. Metode pemurnian yang digunakan adalah cawan gores (Hadioetomo, 1995) dengan modifikasi.

Penggunaan cawan petri biasanya rawan terkontaminasi bakteri dari udara sehingga pada penelitian ini pemurnian dilakukan dengan menggoreskan bakteri yang akan dimurnikan pada permukaan media miring dalam tabung reaksi dengan jarum ose. Tabung reaksi dapat ditutup dengan kapas steril sehingga resiko terkontaminasi oleh bakteri dari udara dapat di minimalisir. Hal ini dilakukan terus sampai diperoleh koloni murni. Koloni murni adalah koloni yang memiliki morfologi sama karena berasal dari pembelahan satu sel (Waluyo, 2005, dalam Mayasari, 2010).

Koloni bakteri dapat dikatakan murni jika koloni-koloni pada ujung strek berbentuk sama. Jika masih terdapat koloni yang berbeda pada ujung strek maka dilakukan strek ulang pada setiap koloni-koloni yang berbeda tersebut sampai diperoleh koloni murni

Uji Aktivitas Antibakteri

Setelah diperoleh isolat murni kemudian dilakukan uji aktivitas terhadap bakteri patogen *E. coli* untuk mewakili bakteri gram negatif dan *S. aureus* sebagai perwakilan bakteri gram positif. Untuk melakukan uji aktivitas terlebih dahulu harus disiapkan suspensi biakan bakteri penguji *E. coli* dan *S. aureus* dalam media

NB. Selain itu isolat bakteri murni juga ditumbuhkan pada media NB. Kemudian pada isolat bakteri uji yang telah homogen tersebut dimasukkan masing-masing dua kertas uji (paper disk) pada setiap suspensi isolat.

Metode uji aktivitas antimikroba yang digunakan adalah metode difusi agar (BAUER *et al*, 1996 dalam Murniasih & Rasyid, 2009) dengan modifikasi. Uji aktivitas dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri pengujian (*E. coli* dan *S. aureus*) kedalam media NA. Sebanyak 200 µl suspensi bakteri pengujian dinokulasikan ke dalam 20 ml media NA yang masih hangat (masih cair) dan diratakan dengan sedikit menggoyangkan seperti angka delapan agar suspensi bakteri pengujian tercampur merata. Kemudian biarkan beberapa saat agar suspensi bakteri pengujian membeku. Setelah itu masukan paper disk yang telah direndam dalam isolat bakteri uji pada masing-masing cawan yang telah diinokulasikan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Karakterisasi

Isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri dikarakterisasi melalui dua tahap yaitu (1) pengamatan (a) gram dan (b) motilitas dan (2) uji biokimia. Pengamatan gram dilakukan dengan menggunakan 3% KOH dan uji motilitas dengan menggunakan *water pepton*. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji katalase, oksidase, hidrolisis urea, hidrolisis gelatin, sitrat, fermentasi karbohidrat dan MR/VP.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penginokulasian berdasarkan metode pengenceran bertingkat, pengenceran 10^2 dan 10^3 merupakan sampel isolat yang cukup

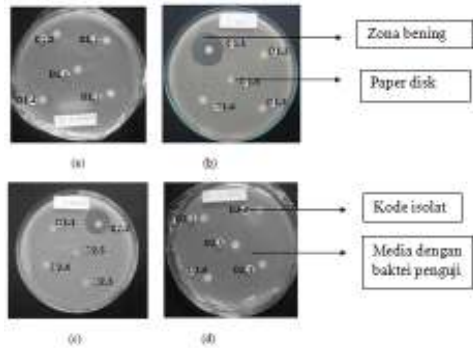
untuk mewakili semua koloni bakteri yang tumbuh karena jumlah koloni yang tumbuh tidak terlalu padat namun bervariasi. Dari pengenceran 10^2 dan 10^3 diambil masing-masing lima isolat koloni bakteri yang berbeda untuk diisolasi. Sepuluh isolat tersebut diisolasi berdasarkan warna dan bentuk koloni serta jumlahnya yang representatif. Bakteri yang diisolasi tersebut ditumbuhkan pada media agar miring dan diinkubasi selama 24 jam. Seperti yang dijelaskan pada penelitian Nofiani *et al* (2009) juga mengisolasi bakteri berasosiasi spons dari pengenceran 10^2 . Pemilihan hasil pengenceran 10^2 untuk isolasi bakteri disebabkan jumlah koloni representatif untuk dilakukan isolasi. Berikut adalah tabel morfologi kesepuluh isolat bakteri yang diisolasi berdasarkan warna dan bentuk koloni.

Tabel 1. Morfologi bakteri berdasarkan warna dan bentuk koloni

Kode Bakteri	Warna Koloni	Bentuk Koloni
D1.1	Putih	Mata jarum
D1.2	Kuning	Bundar tapi tak rata
D1.3	Kuning	Melebar tak beraturan
D1.4	Abu-abu	Bulat
D1.5	Krem	Bulat
D2.1	Abu-abu	Bundar tipis
D2.2	Putih keabu-abuan	Bulat besar
D2.3	Abu-abu	Bundar Tebal
D2.4	Krem	Bulat kecil
D2.5	Abu-abu	Melebar tak beraturan

Uji Aktivitas Antibakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi karang lunak dengan *Sarcophyton* sp yang ditunjukkan dengan ada atau tidaknya zona bening disekitar paper disk (Gambar 1). Adanya zona bening disekitar paper disk mengindikasikan adanya aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi karang lunak *Sarcophyton* sp.



Gambar 1. Uji aktivitas (a) D1 terhadap bakteri *S. aureus* (b) D1 terhadap bakteri *E. coli* dan (c) D2 terhadap bakteri *S. aureus*. (d) D2 terhadap bakteri *E. coli*

Dari hasil pengukuran kode isolat D₁¹ terhadap *E. coli* besar zona bening yang terbentuk adalah 24 mm, sedangkan kode isolat D₂² terhadap *S. aureus* besar zona bening yang terbentuk adalah 20 mm.

Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas antimikroba

Kode Bakteri	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
D1.1	+	-
D1.2	-	-
D1.3	-	-
D1.4	-	-
D1.5	-	-
D2.1	-	-
D2.2	-	+
D2.3	-	-
D2.4	-	-
D2.5	-	-

Keterangan. + : terbentuk zona bening, -: tidak terbentuk zona bening

Dari Tabel 2 dapat dilihat isolat bakteri dengan kode D1.1 menunjukkan adanya aktivitas antibakteri (+) terhadap *E. coli* dan isolat bakteri dengan kode D2.2 menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, sedangkan isolat bakteri dengan kode D1.2, D1.3, D1.4, D1.5, D2.1, D2.3, D2.4, dan D2.5 tidak

menunjukkan adanya aktivitas antibakteri (-). Aktivitas antibakteri ini ditunjukkan dengan adanya zona bening (+) disekitar paper disk (Gambar 1). Menurut Nofiani *et al* (2009) bakteri yang menunjukkan aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri.

Hasil Karakterisasi Bakteri yang memiliki Aktivitas Antibakteri

Dari hasil uji gram positif atau negatif, kedua isolat bakteri baik D1.1 maupun D2.2 adalah bakteri gram negatif. Hal ini diketahui dari adanya lendir yang terbentuk setelah satu ose bakteri yang diletakkan diatas kaca objek ditetesi dengan menggunakan 3% KOH. Menurut Suwanda (2008) apabila suspensi berubah menjadi berlendir, lengket dan terangkat seperti benang bersama jarum ose, berarti bakteri gram negatif (-). Apabila suspensi tetap encer, tidak terangkat dengan jarum ose, berarti bakteri Gram positif (+).

Uji katalase, semua isolat bakteri bereaksi positif setelah ditetesi H₂O₂ 3%, hal ini di tandai dengan adanya pembentukan gelembung udara pada kedua isolat (D1.1 dan D2.2). Hal ini menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki enzim katalase yang dapat mendegradasi hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air dan O₂. Menurut Capuchino & Sherman (1992: 171) selama respirasi aerobik mikroorganisme aerob, anaerob fakultatif, dan mikroaerofil menghasilkan hidrogen peroksida. Penumpukkan hidrogen peroksida ini akan mengakibatkan kematian pada mikroorganisme kecuali mereka dapat mendegradasi hidrogen peroksida secara enzimatik. Organisme yang menghasilkan enzim katalase dengan cepat mendegradasi hidrogen peroksida. Lay (1994: 87), menyatakan bahwa katalase adalah enzim yang mengkatalisasikan penguraian hidrogen peroksida (H₂O₂)

menjadi air dan O₂. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktivasi enzim dalam sel, oleh sebab itu mikroorganisme yang hidup dalam sel harus menguraikannya.

Uji fermentasi menggunakan enam jenis karbohidrat yaitu glukosa, galaktosa, sakarosa, laktosa, fruktosa dan maltosa. Hasil dari fermentasi karbohidrat (galaktosa, sakarosa, laktosa, fruktosa dan maltosa) ini menunjukkan reaksi yang positif untuk kedua isolat (D1.1 dan D2.2). Uji positif ini ditandai dengan adanya perubahan warna pada masing-masing media cair yang mengandung karbohidrat (glukosa, galaktosa, sakarosa, laktosa, fruktosa dan maltosa) dari merah menjadi kuning. Menurut Lay (1994 : 82) dalam proses fermentasi, bakteri yang ditumbuhkan dalam media cair yang mengandung karbohidrat, maka hasil fermentasi berupa asam.

Uji oksidase, kedua isolat D1.1 dan D2.2 mampu memberikan perubahan warna pada kertas tetrametil dari putih menjadi ungu pada saat isolat bakteri dioleskan pada kertas tersebut. Perubahan warna ini terjadi karena bakteri D1.1 dan D2.2 mensekresikan enzim oksidase sehingga mampu menguraikan zat tetrametil yang ada pada kertas. Menurut Lay (1994), bakteri yang bersifat positif pada uji oksidasi ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim oksidase.

Uji Methyl Red, kedua isolat (D1.1 dan D2.2) yang telah diuji menunjukkan hasil yang negatif, hal ini mengindikasikan bahwa seluruh isolat bakteri dalam fermentasi glukosa tidak menghasilkan asam dengan konsentrasi tinggi karena pada uji ini tidak terbentuk warna merah pada medium setelah ditetesi methyl red. Penambahan indikator pH methyl red dapat menunjukkan adanya perubahan pH menjadi asam. Methyl red berwarna merah pada lingkungan dengan pH 4,4 dan berwarna kuning dalam lingkungan

dengan pH 6,2. Menurut Lay (1994: 83) beberapa bakteri memfermentasikan glukosa dan menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam dengan konsentrasi yang besar sehingga akan menurunkan pH media pertumbuhannya menjadi 5,0 atau lebih rendah.

Uji Voges Proskauer isolat D2.2 yang telah diuji menunjukkan hasil yang negatif, dimana pada uji tidak terbentuk warna merah pada medium setelah ditetesi reagen barrit A dan barrit B. Sebaliknya, isolat D1.1 menunjukkan hasil yang positif, dimana pada uji terbentuk warna merah pada medium setelah ditetesi reagen barrit A dan barrit B. Menurut Lay (1994: 85) uji ini digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melaksanakan fermentasi 2,3 butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama, akan terjadi penumpukkan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Dari hasil uji yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa isolat bakteri D2.2 tidak memfermentasikan karbohidrat 2,3 butanadiol hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya warna merah pada medium melainkan terbentuk warna kuning pada medium.

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan, kedua isolat (D1.1 dan D2.2) mampu menghidrolisis urea. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua isolat tersebut memiliki enzim urease. Sejalan dengan pendapat Lay (1994:101) bahwa beberapa mikroorganisme menghasilkan enzim urease yang menguraikan urea menjadi ammonium dan CO₂. Aktivitas enzim urease ini dapat diamati dengan menumbuhkan mikroorganisme kedalam media biakan yang mengandung urea dan pH indikator *phenol red*. Urease adalah enzim yang memecah nitrogen dan ikatan karbon dalam senyawa amida seperti urea dan

membentuk akhir ammonia. Adanya ammonia membentuk lingkungan menjadi alkali yang menyebabkan pH media menjadi basa sehingga terjadi perubahan warna dari warna kuning menjadi merah keunguan (Cappuccino & Sherman, 1987: 157).

Uji sitrat, semua isolat (D1.1 dan D2.2) menunjukkan reaksi yang positif. Adanya perubahan warna dari hijau menjadi biru, hal ini menandakan bahwa semua isolat mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Perubahan warna ini terjadi karena di dalam media *Simon's Citrat* terdapat pH indikator *brom thymol blue*. Menurut Lay (1994) bila mikroorganisme mampu menguraikan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.

Uji gelatin, isolat D1.1 tidak mampu untuk menguraikan gelatin sehingga media gelatin tetap membentuk gel setelah didinginkan dalam lemari es. Sedangkan isolat D2.2 mampu menguraikan media gelatin, hal ini terjadi karena bakteri isolat D2.2 mempunyai enzim gelatinase (Lay, 1994), sehingga media gelatin tetap cair meskipun telah didinginkan.

IV. KESIMPULAN

Dari sepuluh isolat bakteri yang diisolasi dari karang lunak *Sarcophyton* sp, hanya dua isolat bakteri yaitu D1.1 dan D2.2 yang terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Dimana isolat bakteri D1.1 bersifat antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan D2.2 bersifat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Kedua isolat bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang dan motil. Pada uji katalase, oksidase, urea, sitrat dan fermentasi karbohidrat, kedua isolat bakteri baik D1.1 maupun D2.2 sama-sama

menunjukkan reaksi yang positif. Dalam uji Methyl Red kedua isolat juga sama-sama menunjukkan reaksi negatif. Sedangkan pada uji Voges Proskauer isolat bakteri D1.1 menunjukkan reaksi positif dan D2.2 negatif. Sebaliknya, pada uji gelatin isolat D1.1 menunjukkan reaksi negatif dan D2.2 positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Cappucino, J.G. dan Sherman, N. 1992. *Microbiology a Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing. USA: 485 hlm.
- Gunawan, I. 2007. *Penapisan Awal Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antibakteri serta Uji Toksisitas dan Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dari Karang Lunak Asal Perairan Pulau Panggang, Kepulauan seribu* [skripsi]. Fakultas perikanan dan Ilmu kelautan, IPB. Bogor.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT. Gramedia. Jakarta. xi + 163 hlm.
- Harpeni, E dan Hasani, Q. 2005. *Eksplorasi Bakteri yang Bersimbiosis yengan Karang Lunak yebagai Alternatif Sumber Senyawa Bioaktif (Uji Bioassay Antibakteri)*. Bandar Lampung. Universitas Lampung.
- Irianto. 2008. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Jendral Soedirman Purwokerto. Purwokerto
- Lay B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 167 hlm.
- Lalitha. 2004. *Manual an Antimicrobial Suspectibility Testing*. Indian Association of Medical Microbiologist. India.
- Manuputty. 1998. *Beberapa Karang lunak (Alcyonacea) Penghasil Substansi*

- Bioaktif*. Pusat Penelitian Oseanografi-LIPI, Jakarta.
- Mayasari, D. 2010. *Inventarisasi Bakteri Pada Kawasan Mangrove Nipah (Nypa fruticans Wurmb) Di kecamatan Pulau rimau Banyuasin sumatera selatan*. Universitas Sriwijaya. Inderalaya. (Skripsi).
- Nofiani, R, Siti Nurbetty, dan Ajuk Sapar. 2009. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Bakteri Berasosiasi Spons Dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat*. Pontianak. Universitas Tanjung Pura.
- Suwanda. 2008. *Pedoman Diagnosis Golongan Bakteri OPTK*. Jakarta. Departemen Pertanian badan Karantina Pertanian.