



Biopotensi Tumbuhan Mangrove untuk Pencegahan Penyakit Vibrosis pada Udang Windu

Melki^{a)}, Dedi Soedharma^{b)}, Hefni Effendi^{c)}, A. Zaenal Mustopa^{d)}

^a Program Studi Ilmu Kelautan, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan 30662, Indonesia

^b Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

^c Pusat Pengelolaan Lingkungan Hidup, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

^d Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Bogor 16911, Indonesia

Received 27 December 2010

ABSTRAK

Ekstrak tiga jenis tumbuhan mangrove (daun, buah, batang dan akar) meliputi tumbuhan mangrove *Ceriops tagal*, *Rhizophora apiculata*, dan *Sonneratia alba* yang diambil dari Sadai, Bangka Selatan, Bangka Belitung dimana telah diekstraksi dengan pelarut methanol, ethyl acetate dan n-hexane serta telah diuji sebagai antibakteri pada bakteri *Vibrio harveyi* yaitu patogen udang windu dan uji toksisitas BSLT. Hasil uji antibakteri dari semua bagian tumbuhan mangrove didapatkan bahwa daun dan batang *S. alba* dengan pelarut metanol lebih potensi yaitu dengan zona hambat yang terbentuk $24 \pm 3,78$ mm dan $23 \pm 3,78$ mm. Hasil uji BSLT didapatkan untuk daun *S. alba* dengan pelarut metanol bersifat toksik sedangkan batang *S. alba* dengan pelarut metanol bersifat tidak toksik terhadap artemia. Selanjutnya bagian tumbuhan mangrove dianalisa komponen kimianya dengan menggunakan kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor PDA. Hasil identifikasi dengan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen chloroform: methanol (9:1 sampai 1:9) memberikan hasil pemisahan terbaik, identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen chloroform: methanol (9:1 sampai 1:9) memberikan hasil pemisahan terbaik dan identifikasi dengan kromatografi cair kinerja tinggi pada panjang gelombang 200-400 nm menghasilkan bahwa ekstrak tumbuhan mangrove yang berperan sebagai antibakteri dan untuk selanjutnya ekstrak tumbuhan mangrove ini dapat dikembangkan sebagai antibakteri dan biofarmatika.

Kata kunci: ekstrak mangrove, antibakteri, BSLT, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi cair kinerja tinggi

ABSTRACT

Crude extracts of three mangrove species (leaf, fruit, bark and root), i.e. *Ceriops tagal*, *Rhizophora apiculata*, and *Sonneratia alba* collected from Sadai, South Bangka, Bangka Belitung was extracted in methanol, ethyl acetate, n-hexane and tested for different range of biological activities including antimicrobial activity of shrimp *Vibrio harveyi* pathogen and brine shrimp cytotoxic. The overall bioactivity profile showed that, leaf and bark of *S. alba* methanolic ($24 \pm 3,78$ mm and $23 \pm 3,78$ mm) exhibited more biopotency. Result by using Brine Shrimp Lethality Test showed that leaf of *S. alba* methanolic was toxic and bark of *S. alba* methanolic was not toxic to Artemia. The highly active mangrove was evaluated further to analyze the chemical compounds using column chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography with detector photodiode array (PDA). The identification with column chromatography using chloroform: methanol (9:1 to 1:9) gave the best separation, identification results using thin layer chromatography using chloroform: methanol (9:1 to 1:9) gave the best separation and chromatographic identification results high performance liquid at a wavelength of 200-400 nm showed mangrove extracts might have functional role in bioactivity and can be used for the development of antibacterial and biopharmaceuticals.

Keywords: Mangrove extract, antibacterial activity, brine shrimp cytotoxicity, column chromatography, TLC, and HPLC

I. PENDAHULUAN

Serangan penyakit bakterial pada tingkat pembenihan yang paling serius dan sering menyebabkan terjadinya kematian massal pada larva udang windu adalah serangan bakteri berpendar yang diidentifikasi sebagai *Vibrio harveyi* (Lavilla-Pitogo et al. 1990; Pedersen et al. 1998). Bakteri ini pada umumnya menyerang larva udang pada stadia zoea, mysis dan awal post larva (Rukyani et al. 1992) sehingga merupakan kendala dalam penyediaan benih udang yang sehat dalam jumlah besar yang diperlukan untuk produksi udang.

Upaya untuk menanggulangi penyakit tersebut dengan menggunakan antibiotik dan bahan kimia, namun dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan perairan dan menimbulkan resistensi patogen. Salah satu bahan alami yang bersifat antibakterial adalah tumbuhan mangrove. Beberapa penelitian tentang antibakterial mangrove dalam membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp (Manilal et al. 2009; Haque et al. 2007; Feliatra 2000). Hasil identifikasi isolat bioaktif mangrove antara lain jenis *Acanthus ilicifolius* ditemukan pada ekstrak daun mengandung mirisil alkohol, stigmasterol dan stigmasterol- β -D-glukopiranosid dan ekstrak akar mengandung oktakosil alkohol, benzoksazolin-2-one, stigmasterol- β -D-glukopiranosid, saponin dan flavonoid (Nursal et al. 1998). *Exoecaria agalocha* yaitu Cyclohexasiloxane, *Acanthus ilicifolius* yaitu 2-methyl piperazin, *Osbornia octodonta* yaitu 2 heptanamin-6 methyl-amino-6 methylen, *Avicenia alba* yaitu Cyclopentasiloxane, *Eupatorium inulifolium* yaitu n-decane/isodecane, *Carbera manghas* yaitu Furanon gamma-Crotonolactone dan *Sonneratia caseolaris* yaitu L-galactopyranosida (Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau Maros 2001).

Kawasan mangrove Sadai, Provinsi Bangka Belitung mempunyai ekosistem mangrove yang dominan *Ceriops tagal*, *Rhizophora apiculata*, dan *Sonneratia alba* diharapkan dari jenis-jenis mangrove ini dapat diketahui potensi komponen bioaktif tumbuhan ini dan sangat perlu dilakukan penelitian untuk mengendalikan infeksi bakteri *Vibrio* sp patogen pada larva udang windu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi mangrove sebagai antibakterial dan mengetahui senyawa kimia komponen bioaktif. Hasil dari penelitian diharapkan memberikan informasi tentang kemampuan komponen bioaktif yang terdapat pada mangrove dalam mengatasi penyakit pada udang windu.

II. METODOLOGI

Penyediaan Sampel

Jenis mangrove yang diambil adalah *Ceriops tagal*, *Rhizophora apiculata*, dan *Sonneratia alba* pada kawasan hutan mangrove Sadai, Bangka Selatan (03°00'02,1" - 03°00'15,2" N and 106°43'45,2" - 106°43'43,2" E) (Gambar 1) meliputi daun, buah, batang dan akar. Kemudian dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan akuades dan dikeringkan. Sebelum dilakukan proses pengeringan, sampel mangrove segar tersebut ditimbang sebagai data perbandingan berat setelah sampel kering. Proses pengeringan dilakukan pada oven dengan suhu 60 °C selama 3 – 7 hari. Selanjutnya dijadikan serbuk halus dan disaring.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Mangrove

Ekstraksi

Sampel mangrove yang telah ditimbang sebanyak 100 gr dimaserasi 3x24 jam dengan pelarut MeOH 80%, EtOAc 80% dan n-heksane 80% sebanyak 250 ml. Hasil maserasi disaring dengan kertas millipore untuk memisahkan filtrat dan residunya. Selanjutnya filtrat dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator (Eyela) pada suhu 40 – 50 °C sehingga didapatkan ekstrak MeOH, EtOAc dan n-heksane mangrove dan ditimbang untuk mengetahui konsentrasinya.

Uji Antibakteri

Uji *in vitro* antibakteri ekstrak mangrove dilakukan merujuk pada modifikasi penelitian Manilal *et al.* (2009) terhadap bakteri *V. harveyi* pada media agar SWC (*sea water complete*) dengan melihat zona hambat (inhibisi) yang terbentuk, yaitu sebanyak 20 µl (5 µg) ekstrak mangrove ditetaskan pada paper disc dengan suhu inkubasi 28 °C kemudian setelah 16 jam diamati zona hambat yang terbentuk. Uji *in vitro* antibakteri ini juga dilakukan untuk fraksi hasil kromatografi kolom dan KLT.

Uji Toksisitas *Brine Shrimp Lethal Toxicity* (BSLT)

Tahapan uji BSLT dilakukan modifikasi pada tahapan kerja oleh Nurhayati *et al.* (2006) dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach dimasukkan sebanyak 10 ekor ke dalam tabung reaksi yang telah diberi larutan ekstrak mangrove dengan konsentrasi 0 (kontrol), 10, 100, 200, 500 dan 1000 ppm dan ditambahkan air laut sampai 3 ml. Setiap perlakuan dibuat 3 kali ulangan. Semua tabung reaksi diinkubasi pada suhu kamar dibawah penerangan lampu TL 40 watt. Pengamatan dilakukan setelah 48 jam dengan menghitung jumlah *A. salina* yang mati pada tiap konsentrasi kemudian dihitung nilai LC₅₀ dengan memasukkan angka probit (50%

kematian larva uji).

Purifikasi Senyawa Bahan Aktif Ekstrak Mangrove

Tahapan dalam purifikasi senyawa bahan aktif ekstrak mangrove meliputi kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis (KLT), dan Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Ekstrak mangrove yang telah diketahui sebagai antibakteri tertinggi selanjutnya dipurifikasi dengan kromatografi kolom pada silica gel 60F₂₅₆ produksi Merck sebagai fase diam dan eluen chloroform: methanol (9:1 sampai 1:9) sebagai fase gerak. Selanjutnya fraksi hasil kolom yang telah diketahui sebagai antibakteri tertinggi selanjutnya dipurifikasi dengan KLT pada plat 25 TLC Aluminium sheets Silica Gel 60F₂₅₆ produksi Merck pada eluen pengembang chloroform: methanol (9:1 sampai 1:9). Kemudian fraksi hasil KLT yang diketahui sebagai antibakteri selanjutnya dipurifikasi dengan KCKT/HPLC model Knauer, kolom Eurospher100-5C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 µm), volume injeksi 20 µl, PDA detektor dengan panjang gelombang 200-400 nm, laju alir 1 ml/menit, fase gerak gradien metanol dan air (v/v) (pada 0 mnt 0% air, pada 22 mnt 100% metanol, pada 30 mnt 100% metanol, pada 33 mnt 100% air, pada 40 mnt 100% air).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Senyawa Ekstrak Mangrove

Hasil perhitungan rendemen (Tabel 1) menunjukkan bahwa pelarut metanol memiliki nilai prosentase rendemen tertinggi dibanding pelarut etil asetat dan heksana, dimana pelarut heksana yang paling rendah nilai rendemennya.

Tabel 1. Nilai Rendemen Mangrove

Jenis Mangrove	Bagian	Bobot awal (g)	Bobot ekstrak (g)			Rendemen (% b/v)		
			MeOH	EtOAc	Heksane	MeOH	EtOAc	Heksane
<i>C. tagal</i>	Daun	100	6.75	6.21	2.34	6.75	6.21	2.34
	Batang	100	7.56	6.78	3.23	7.56	6.78	3.23
	Akar	100	11.19	10.12	2.45	11.19	10.12	2.54
<i>R. apiculata</i>	Daun	100	7.46	7.09	4.32	7.46	7.09	4.32
	Batang	100	5.1	4.78	2.54	5.1	4.78	2.54
	Akar	100	4.11	4.07	3.24	4.11	4.07	3.24
<i>S. alba</i>	Daun	100	11.8	10.87	4.56	11.8	10.87	4.56
	Batang	100	12.9	10.89	4.35	12.9	10.89	4.35
	Buah	100	8.71	7.78	3.24	8.71	7.78	3.24
	Akar	100	7.56	6.89	2.56	7.56	6.89	2.56

Rendemen yang dihasilkan dari tiap jenis mangrove dan tiap bagian yang di maserasi memiliki nilai rendemen yang bervariasi pada habitat dan lokasi yang berbeda. Perbedaan ini diduga disebabkan karena tiap jenis mangrove ini mempunyai pola adaptasi fisiologi yang berbeda terhadap lingkungannya, sesuai pernyataan Murniasih (2005), bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh organisme laut dipengaruhi beberapa faktor diantaranya salinitas, intensitas cahaya matahari, arus dan kompetisi sehingga mendorong organisme laut menghasilkan metabolit sekunder.

Perbedaan rendemen yang dihasilkan juga diduga karena pada saat proses penyaringan (filtrasi) sampel hasil maserasi terdapat bagian yang menguap, karena pelarut yang digunakan bersifat volatile sehingga

volume filtrat yang dihasilkan berbeda-beda. Sesuai dengan pernyataan Ismet (2007), menyatakan bahwa faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu dan jenis pelarut yang digunakan.

Bioaktivitas Senyawa Ekstrak Mangrove

Ekstrak kasar tiap bagian mangrove (daun, buah, batang dan akar) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* beragam baik jenis mangrove, pelarut maupun bagiannya. Namun dapat dilihat dari Tabel 2 bahwa yang tertinggi zona hambatnya adalah berturut-turut daun *S. alba* dengan pelarut metanol sebesar 24±3.78 mm dan batang *S. alba* pelarut metanol sebesar 23±3.78 mm.

Tabel 2. Diameter zona hambat ekstrak kasar mangrove terhadap bakteri *V. harveyi*

Jenis Mangrove	Bagian	Diameter zona hambat (mm)*							
		MeOH (20µl/5µg)	EtOAc (20µl/5µg)	n-heksane (20µl/5µg)	A (-)	B (-)	C (-)	D (+)	E (+)
<i>C. tagal</i>	Daun	12±1.52	14±2.08	7	0	0	0	10	25
	Batang	15±2.64	14±1.73	7	0	0	0	10	25
	Akar	13±0.57	12±0.57	7	0	0	0	10	25
<i>R. apiculata</i>	Daun	15±1.52	11	7	0	0	0	10	25
	Batang	14	11	7	0	0	0	10	25
	Akar	8±0.57	8	8	0	0	0	10	25
<i>S. alba</i>	Daun	24±3.78	19±2.16	7	0	0	0	10	25
	Batang	23±3.78	19±3.05	7	0	0	0	10	25
	Buah	19	18	8	0	0	0	10	25
	Akar	17	15	8	0	0	0	10	25

Ket: * Optimasi pengamatan pada jam ke 16, A (-) Pelarut MeOH, B (-) Pelarut EtOAc, C (-) Pelarut n-heksane, D (+) Penicillin 10 µg, E (+) Chloramphenicol 30 µg

Maka hasil uji bioaktivitas menunjukkan bahwa senyawa bioaktif ekstrak mangrove mempunyai kekuatan sangat kuat bila dibandingkan dengan hasil penelitian Manilal *et al.* (2009) mendapatkan ekstrak daun mangrove *A. marina* dengan pelarut metanol dengan zona hambat sebesar 14 mm terhadap bakteri *V. harveyi*. Menurut Davidstout (1971), bahwa ketentuan kekuatan antibiotik/antibakteri adalah zona hambat >20 berarti sangat kuat, zona hambat 10 – 20 mm berarti kuat, zona hambat 5 – 10 berarti sedang dan zona hambat <5 mm berarti lemah.

Sebagai kontrol positif yang digunakan adalah Penicillin 10 µg dan Chloramphenicol 30 µg dengan zona hambat berturut-turut 10 mm dan 25 mm. Serta sebagai kontrol negatifnya adalah masing-masing pelarut (MeOH, EtOAc dan n-Heksane) tetapi tidak terbentuk zona hambat.

Ekstrak mangrove dengan pelarut metanol umumnya mempunyai aktivitas

penghambatan terhadap bakteri *V. harveyi* yang paling besar, sedangkan pelarut heksana yang paling kecil, diduga karena pelarut heksana bersifat volatile (mudah menguap). Sesuai penelitian Manilal *et al.* (2009) bahwa ekstrak mangrove dengan pelarut metanol mempunyai kemampuan dalam penghambatan bakteri *Vibrio*. Menurut Satari (1997), bahwa ekstrak yang kecil bahkan tidak ada aktivitas senyawa bioaktif belumlah berarti ekstraknya tidak aktif, tetapi kemungkinan tidak terdeteksi pada konsentrasi yang di uji atau konsentrasi yang digunakan umumnya belum tercapai.

Uji Toksisitas *Brine Shrimp Lethal Toxicity* (BSLT)

Hasil pengamatan kematian *Artemia* setelah 48 jam pada ekstrak mangrove yang mempunyai potensi sebagai antibakteri terlihat dalam Tabel 3 berikut :

Tabel 3. Nilai LC₅₀ (µg/ml) ekstrak mangrove

Konsentrasi µg/ml	Persentase Mortalitas	
	Daun <i>S. alba</i>	Batang <i>S. alba</i>
0 (kontrol)	0.00	0.00
10	3.33	3.33
100	10.00	6.67
200	13.33	30.00
500	43.33	30.00
1000	53.33	36.67
LC ₅₀ (µg/ml)	743.019	6714.288
Kategori Toksisitas (Meyer et al. 1982)	Toksik	Tidak Toksik

Hasil analisis uji BSLT terhadap ekstrak kasar mangrove memperlihatkan semakin tinggi konsentrasi yang diujikan maka cenderung semakin banyak *A. salina* yang mati. Sesuai dengan pernyataan Harborne (1987) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka sifat toksiknya akan semakin tinggi.

Purifikasi dengan Kromatografi Kolom

Tahapan awal dalam identifikasi senyawa aktif dari tumbuhan mangrove yaitu dengan menggunakan kromatografi kolom sebagai eluennya adalah larutan chloroform: methanol (9:1 sampai 1:9), dimana untuk ekstrak batang *S. alba* senyawa fraksi (*yield extract*) yang dihasilkan sebanyak 15 fraksi. Selanjutnya semua senyawa fraksi di uji antibakteri (*V. harveyi*) dengan zona hambat yang terbesar sebesar 13 mm untuk fraksi no 9.

Purifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa fraksi yang zona hambatnya tinggi untuk selanjutnya dipurifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT), noda yang dihasilkan terbentuk satu spot/band dan dianggap satu senyawa serta diukur nilai Rf (*Retardaction fraction*). Untuk ekstrak batang *S. alba* fraksi senyawa no 9 dengan eluen chloroform: methanol (9:1 sampai 1:9) nilai Rf 0,7 (Gambar 2). Noda yang ditunjukkan pada KLT selanjutnya diambil dan diuji antibakteri dengan zona hambat yang terbentuk sebesar

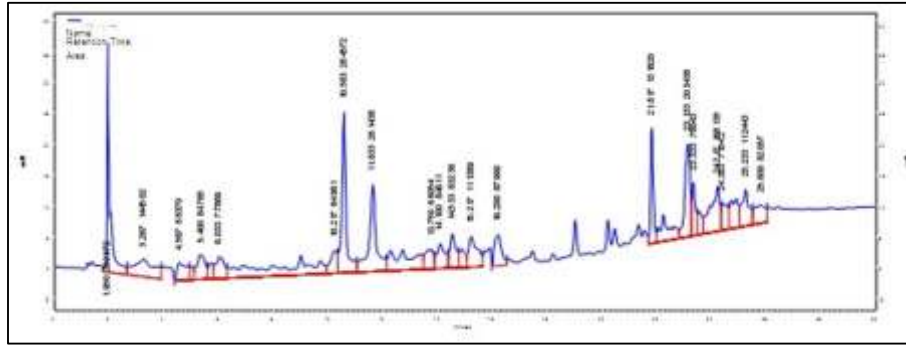
10 mm.



Gambar 2. Profil fraksi aktif ekstrak batang *S. alba* fraksi senyawa no 9

Purifikasi dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Analisis kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dengan detektor *photodiode array* (PDA) ($\lambda = 200 - 400$ nm) menunjukkan bahwa profil puncak (*peak*) ekstrak batang *S. alba* fraksi senyawa no 9 menunjukkan ada kurang lebih 5 puncak yang kelimpahannya tinggi pada waktu retensi menit ke 1.95 ($\lambda = 234$ nm), 10.58 ($\lambda = 240$ nm), 11.63 ($\lambda = 226$ nm), 21.82 ($\lambda = 257$ nm), dan 23.13 ($\lambda = 223$ nm dan 277 nm) (Gambar 3). Tumbuhan mangrove terpilih memiliki waktu retensi dan serapan panjang gelombang berbeda-beda serta termasuk golongan senyawa flavonoid turunan senyawa flavanon (Harborne 1987).



Gambar 3. Analisis KCKT ekstrak batang *S. alba* fraksi senyawa no 9

IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Rendeman ekstrak pelarut metanol lebih besar dibandingkan dengan pelarut etil asetat dan n-heksane.
2. Hasil uji bioaktivitas senyawa bioaktif ekstrak mangrove yang mempunyai kekuatan sangat kuat adalah berturut-turut daun *S. alba* dengan pelarut metanol ($24 \pm 3,78$ mm) dan batang *S. alba* pelarut metanol ($23 \pm 3,78$ mm).
3. Kematian *Artemia salina* 50% (LC_{50}) untuk ekstrak daun *S. alba* termasuk kategori toksik dan kategori tidak toksik adalah ekstrak batang *S. alba*.
4. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh ekstrak tumbuhan mangrove berpotensi sebagai antibakteri dan obat-obatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeysinghe PD, Wanigatunge RP. 2006. Evaluation of antibacterial activity of different mangrove plant extracts. *Ruhuna Journal of Science* 1:104–112.
- Bandaranayake, W.M., 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*, 2: 133-148.

[BRPPU] Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau Maros. 2001. *Pemanfaatan Bioaktif Tanaman Mangrove Untuk Mereduksi Penyakit Pada Budidaya Udang Windu*. Sulawesi Selatan.

Calderon, J.S., C.L. Cespedes, R. Rosas, G.G. Federico, J. R. Salazar, L. Laura, A. Eduardo, K. Isao, 2001. Acetylcholinesterase and insect growth inhibitory activities of *Gutierrezia microcephala* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith *Zeitschrift fuer Naturforschung, Journal of Biosciences*, 56: 382-394.

Davidstout. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Journal of Microbiology* 4: 659-665.

Feliatra. 2000. Studi awal tumbuhan Mangrove sebagai antimikroba. *Lembaga Penelitian Universitas Riau*. Pekanbaru: Universitas Riau.

Gritter RJ, Bobbit JM, Schwarting AE. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Ed ke-2. Bandung: ITB.

Haque ME, Islam MN, Rahman MH, Mohamad AU. 2007. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Crude Extracts and Isolated Compounds of

- Xylocarpus mollucensis*. Dhaka Univ. J. Pharm. Sci. 2: 109-112.
- Han, L., X.S. Huang, I. Sattler, H.Z. Fu, S. Grabley and W.H.J. Lin, 2007. Two new constituents from mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. *Journal of Asian Natural Product Research*, 9: 327.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-2. Terjemahan Padmawinata K dan Soediro I. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Ismet MS. 2007. Penapisan Senyawa Bioaktif Spons *Aaptos aaptos* dan *Petrosia* sp dari Lokasi yang Berbeda [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Kitamura S, Anwar C, Chaniago A, Baba S. 1997. *Handbook of Mangrove in Indonesia*. ISME. Japan.
- Kolehmainen S, Morgan T, Castro R. 1974. Mangrove Root Communities in A Thermally altered area in Guayanilla Bay. In Gibbons, J.W and R.R. Sharitz (Eds) *Thermal Ecology*. US atomic energy Commission.
- Lavilla-Pitogo CR, Baticados LL, Cruz Lacierda ER, de la Pena LD. 1990. Occurrence of luminous bacterial diseases of *Penaeus monodon* larvae in the Philipines. *Aquaculture* 91:1-13.
- Manilal A, Sujith S, Kiran GS, Selvin J, Shakir C. 2009. Biopotentials of Mangroves Collected from the Southwest Coast of India. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 4 : 59-65.
- Meyer BN et al. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Medica* 45: 31-34.
- Murniasih T. 2005. Potensi Mikroorganisme sebagai Sumber Bahan Obat-obatan dari Laut yang dapat dibudidayakan. *Oseana* 29:1-7.
- Nurhayati APD, Abdulgani N, Febrianto R. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo* 2: 41- 46
- Nursal M, Sutisna, Ngaro NR. 1998. Pengaruh Ekstrak Mangrove *Acanthus ilicifolius* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio* sp. Di dalam: Prosiding Seminar Nasional VI Ekosistem Mangrove, Pekanbaru, 15 – 18 Sept 1998. 14 hal.
- Pedersen KL et al. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk, 1936), Baumann et al. 1981, *Int. J. Sys. Bacteriol.* 48:749-758.
- Rouf, R., S.J. Uddin, J.A. Shilpi and M. Alamgir, 2007. Assessment of antidiarrhoeal activity of the methanol extract of *Xylocarpus granatum* bark in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 539.
- Rukyani A, Taufik P, Taukhid. 1992. Penyakit kunang-kunang (*luminescence vibrios*) di hatchery udang windu dan cara penanggulangan penyakit benur di hatchery udang. *J. Litbang Pert.* 2:1 -17.
- Satari RR. 1997. Penelitian Produk Alam Laut Skreening Substansi Bioaktif. Laporan Penelitian Tahun Anggaran 1996/1997. Jakarta: Lembaga Penelitian Indonesia. Puslitbang Oseanologi.
- Wardlaw, A.C., 1985. *Practical statistics for experimental biologists*, John Wiley and Sons, Chichester.
- Wu, J., Q. Xiao, J. Xu, M.Y. Li, J.Y. Pana and M. Yang, 2008 Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities, *Natural Product Report*, 25: 955-981.

Zandi, K., M. Taherzadeh, S. Tajbakhsh, R. Yaghoubi, Z. Rastian and K. Sartavi, 2008. Antiviral activity of *Avicennia marina* leaf extract on HSV-1 and Vaccine strain of polio virus in vero cells, *International Journal of Infectious Diseases*, 12(1): 298.