

**KORELASI KEANEKARAGAMAN BAKTERI TERHADAP
METABOLIT SEKUNDER *NEPHTHEA SPP.* DARI PERAIRAN TAMAN
NASIONAL KEPULAUAN SERIBU**

***CORRELATION DIVERSITY OF BACTERIA TO SECONDARY
METABOLITES NEPHTHEA SPP. FROM SERIBU ISLANDS NATIONAL
PARKS WATERS***

Ginting Patantis, Hedi Indra Januar, dan Ekowati Chasanah

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
Jln. K.S. Tubun, Petamburan VI, Jakarta
Pos-el: ginting_p@yahoo.com

ABSTRACT

*Bioactive compounds from biota on coral reef is potentially of plasma nutfah that has high economic value. Their existence was influenced by the microbes which associated with them and the environmental conditions. The aim of the research was to analyze the correlation between the diversity of bacteria and secondary metabolites *Nephthea spp.* collected from Seribu Islands National Parks (TNKpS). The analysis of bacteria diversity performed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and secondary metabolites used High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results of study showed that the range of diversity index (H), richness (R), and evenness index (E) of bacteria were 1,47–0,88; 13–3; 0,84–0,43. And the for the secondary metabolites the range were 2,21–1,12; 20–5; 0,95–0,63. Further study showed that there was a significant correlation ($R = 0.96$ at $p < 0.01$) between bacteria and secondary metabolites group richness. The area which high diversity of bacteria and secondary metabolites were within central and southern TNKpS waters. This results were in line with the best water quality in these areas.*

Keywords: Diversity, Bacteria, Secondary metabolites, *Nephthea spp.*

ABSTRAK

Senyawa bioaktif dari biota terumbu karang merupakan biopotensi hasil plasma nutfah yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Keberadaannya dipengaruhi oleh mikroba yang berasosiasi dan kondisi lingkungan sekitarnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan keanekaragaman bakteri terhadap metabolit sekunder *Nephthea spp.* dari wilayah perairan Taman Nasional Kepulauan Seribu (TNKpS). Analisis keanekaragaman bakteri dilakukan menggunakan Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) dan metabolit sekunder dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri di wilayah ini memiliki rentang indeks keragaman (H), kekayaan (R), dan rata-rata (E) sebesar 1,47-0,88; 13-3; 0,84-0,43. Sementara rentang dari senyawa metabolit sekunder adalah 2,21-1,12; 20-5; 0,95-0,63. Analisis lanjutan menunjukkan korelasi yang kuat antara indeks kekayaan bakteri dan indeks kekayaan metabolit sekunder ($R = 0,96$ pada $p < 0,01$). Wilayah yang memiliki keragaman bakteri dan metabolit sekunder terbanyak adalah di perairan tengah dan paling selatan TNKpS. Hal ini selaras dengan kualitas perairan terbaik di wilayah perairan tersebut.

Kata kunci: Keanekaragaman, Bakteri, Metabolit sekunder, *Nephthea spp.*

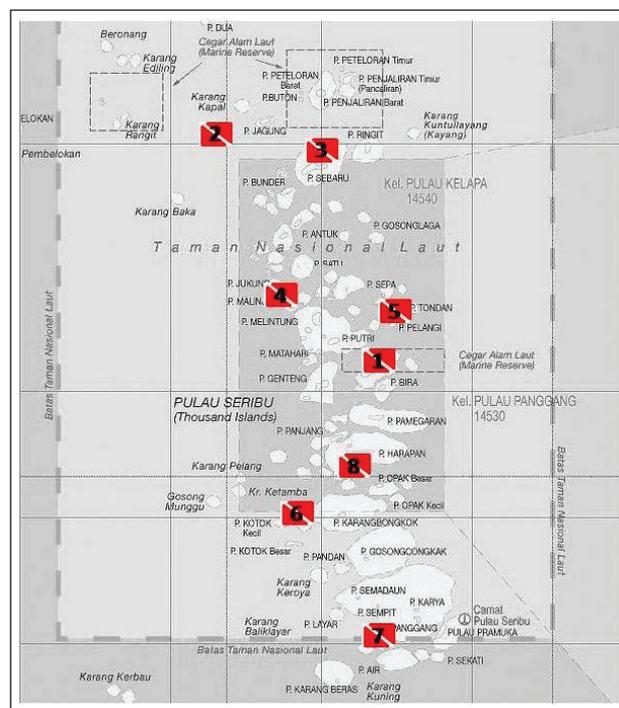
PENDAHULUAN

Senyawa bioaktif dari biota terumbu karang, seperti spons dan karang lunak merupakan biopotensi hasil *plasma nutfah* yang memiliki nilai ekonomi tinggi sebagai model struktur bahan farmakologis. Sebagai hewan *sessile*, biota karang tersebut menghasilkan beragam senyawa-senyawa bioaktif sebagai respons pertahanan diri dari kondisi lingkungannya, misalnya sebagai anti predator ikan atau memenangi persaingan wilayah pertumbuhan sesama biota karang.^{1,2}

Pada lingkungan terumbu karang, beragam mikroba mampu hidup dalam kolom air,³ sedimen,⁴ organisme yang hidup di laut seperti spons,^{5,6} dan karang lunak.⁷ Selain diproduksi oleh dirinya sendiri metabolit sekunder yang dihasilkan oleh biota laut memiliki keterkaitan dengan keberadaan diversitas mikroba dalam lingkungan ataupun yang menjadi simbiosis biota karang tersebut.⁸ Menurut Pringault,⁹ mikroba dapat berperan penting sebagai mediator dan pengatur transformasi dari berbagai senyawa dalam siklus biogeokimia sehingga mampu

menjadi sumber penghasil senyawa bioaktif untuk dapat hidup di dalam inang biota karang atau sebaliknya. Inang biota karang juga menghasilkan senyawa bioaktif sebagai respons pertahanan diri terhadap mikroba tersebut.¹⁰ Hal inilah yang mendasari dilaksanakannya penelitian ini.

Riset dilakukan untuk mengetahui keterkaitan antara diversitas senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu biota karang dan diversitas bakteri dari lingkungannya. Sebagai objek penelitian, dipilih biota karang lunak *Nephthea spp.* dari Taman Nasional Kepulauan Seribu yang telah diketahui menghasilkan beragam senyawa bioaktif *cembranoid*.¹¹ Kadar sitotoksitas ekstrak kasar metanol dan kuantitas senyawa bioaktif 15-hidroksi *cembranoid* dan 3,4 epoksi *nephtthenol* asetat dari *Nephthea spp.* ditemukan selaras dengan kualitas perairannya tersebut,¹² sehingga diperkirakan adanya asosiasi antara produksi senyawa bioaktif dari *Nephthea spp.* dan kondisi lingkungannya.¹³ Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keterkaitan ekologis lebih jauh antara



(Keterangan: 1. Pulau Kayu Angin Bira; 2. Jagung; 3. Sebaru Besar; 4. Melinjo; 5. Pelangi; 6. Kotok; 7. Gosong Panggang, dan 8. Kelapa)

Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel *Nephthea spp.* di TNKpS (Holtrof¹⁴)

kondisi lingkungan habitat *Nephthea spp.* yaitu keanekaragaman bakteri dan keanekaragaman metabolit sekundernya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkuat justifikasi pentingnya peninjauan lingkungan terumbu karang yang baik dalam menjaga biopotensi produksi *plasma nuftah* terumbu karang melalui konservasi laut yang efektif.

METODE PENELITIAN

Sampel

Sampel *Nephthea spp.* diambil dari perairan TNKpS mulai dari sisi selatan hingga utara seperti pada Gambar 1. Sebanyak 15 gr *Nephthea spp.* diambil dengan menggunakan SCUBA diving dari kedalaman 5 m. 10 gr sampel dimasukkan tabung steril untuk analisis keragaman bakteri, sementara 5 gr sampel diekstrak dengan 15 mL metanol *HPLC grade* untuk analisis keragaman senyawa metabolit sekunder dalam *Nephthea spp.* Keseluruhan sampel dipreservasi dalam suhu rendah.

Analisis Diversitas Bakteri

Analisis perbandingan diversitas bakteri di tiap lokasi dilakukan menggunakan metode *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP). Pada tahapan awal dilakukan ekstrak *deoxyribonucleic acid* (DNA) total dengan metode menurut Zhou¹⁵ dan amplifikasi gen 16S *ribosom deoxyribonucleic acid* (rDNA) menggunakan primer 27F-FAM (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') yang telah diberi label *phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescein* (FAM) diposisi 5'- dan 1387R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) selanjutnya dilakukan dengan campuran: 12.5 µL GoTaq (Promega, Madison, WI, USA), 1µl primer 27F dan 1387R primer (25 pmol/µl), 9.5 µL ddH₂O, dan 1µl of the DNA total sebagai *templet*. Perlakuan temperatur yang digunakan adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, kemudian 30 siklus (denaturasi pada 94°C selama 60 detik, *annealing* pada 56°C selama 75 detik, ekstensi pada 72°C selama 90 detik), dan ekstensi akhir 72°C selama 7 menit dan terakhir 4°C~. Produk PCR dielektrofo-

resis menggunakan gel agarose 1%. Produk PCR terlabel yang dihasilkan dipotong dengan enzim restriksi *RsaI* selama 4 jam pada suhu 37 °C. Total reaksi adalah 30 µl yang terdiri dari 3µl enzim restriksi, 3µl 10x bufer restriksi, dan 24µl produk PCR. DNA hasil restriksi dijalankan pada alat sekuensing DNA ABI Prism Avant 3100 Geentic Analyser (Applied Biosystem, AS) menggunakan program GenScan dan menggunakan GS 500 ROX (Applied Biosystem, AS) sebagai marker. Analisis GenScan dilakukan di laboratorium 1st Base, Singapura.

Data hasil sekuensing berupa grafik yang menggambarkan ukuran *Terminal restriction fragments* (T-RFs) dengan satuan *base pair* (bp) dan area (luasan) grafik dengan satuan *fluorescence units*. Fragmen T-RFs yang berukuran 50–500 bp dan mempunyai persentase area lebih dari 0,5% digunakan dalam analisis data.

Analisis Metabolit Sekunder dalam Eks-trak Metanol *Nephthea spp.*

Ekstrak metanol sampel dikeluarkan dari dalam vial, lalu di-*sentrifuge* pada kecepatan 9.600 rpm selama 15 menit. Setelah itu, 20 uL dari ekstrak diinjeksikan ke sistem KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) Shimadzu 2010A. Kondisi analisis KCKT dilakukan dengan menggunakan sistem fasa gerak gradien dari 10% asetonitril dalam air hingga 100% asetonitril dalam waktu 50 menit dengan laju alir 0,2 mL/min. Keseluruhan fasa gerak yang dipergunakan ini merupakan *HPLC grade* yang ditambahkan dengan 0,1% asam formiat. Fasa diam yang dipergunakan adalah silika balik Shimadzu ODS C₁₈ dengan ukuran 150 x 2.0 mm. UV-Vis DAD (*Diode Array Detector*) dipergunakan sebagai detektor hasil kromatografi untuk mendapatkan waktu retensi dari bioindikator. Kromatogram hasil KCKT lalu diproses mempergunakan rentang waktu di atas 5–50 menit, lebar puncak minimal 20, dan kemiringan puncak minimal 50.000. Data hasil berupa puncak yang menyatakan kelompok senyawa beserta dengan luas areanya.

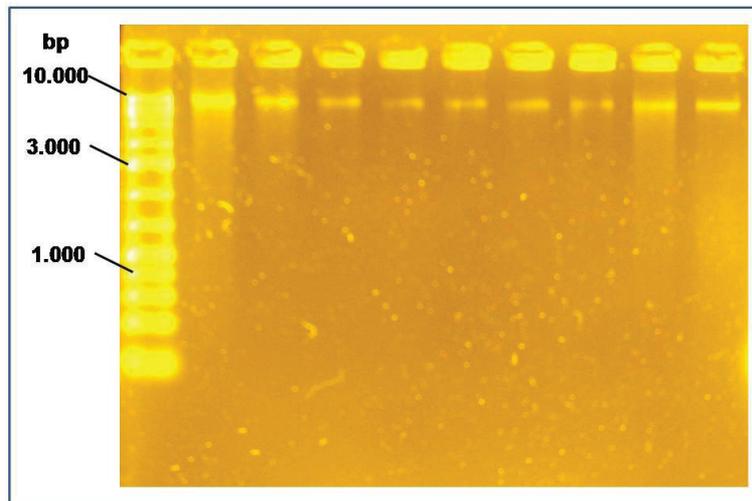
Perhitungan Indeks Keragaman (H), Kekayaan (R), dan Kerataan (E)

Variabel kekayaan (R) dari diversitas bakteri dan kelompok senyawa dalam *Nephthea spp.* dihitung berdasarkan jumlah T-RFs dan jumlah puncak pada kromatogram KCKT dari tiap sampel. Indeks keragaman dianalisis menggunakan Shannon-Weiner (H), dan indeks kemerataan (E). Indeks Shannon-Weiner dihitung berdasarkan persamaan $H = -\sum(pi)(\ln pi)$. p pada diversitas bakteri adalah perbandingan dari area T-RFs sampel dengan keseluruhan area T-RFs. Sementara p pada kelompok senyawa *Nephthea spp.* adalah perbandingan dari area puncak pada KCKT sampel dengan keseluruhan area puncak pada KCKT. Indeks kemerataan dihitung dari

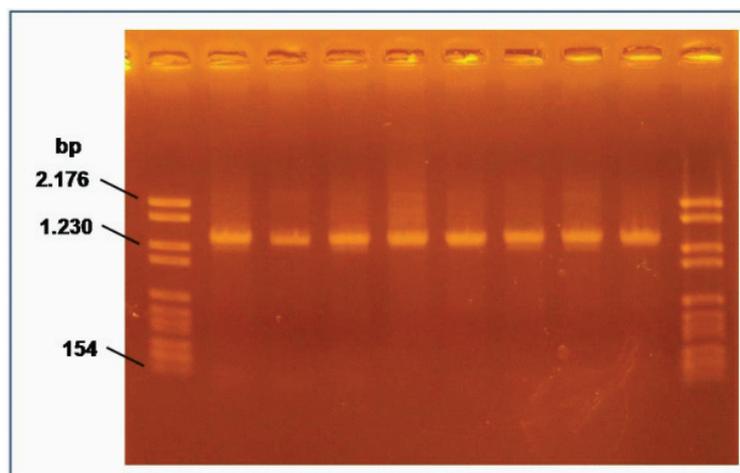
persamaan $E = H/\ln R$.¹⁶ Setelah ketiga nilai indeks diketahui, dilakukan analisis non-parametrik Spearman untuk mengetahui korelasi antara tiap nilai indeks.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tahapan awal, sampel *Nephthea spp.* diblender agar dapat menjadi partikel-partikel yang lebih kecil sehingga bakteri-bakteri yang menempel pada partikel tersebut dapat mudah dipisahkan pada saat tahapan pemisahan dan ekstraksi DNA. Hasil ekstraksi DNA dari sampel *Nephthea spp.* terdapat pada Gambar 2, yang memperlihatkan bahwa DNA yang diperoleh adalah berkisar pada 10.000 bp.



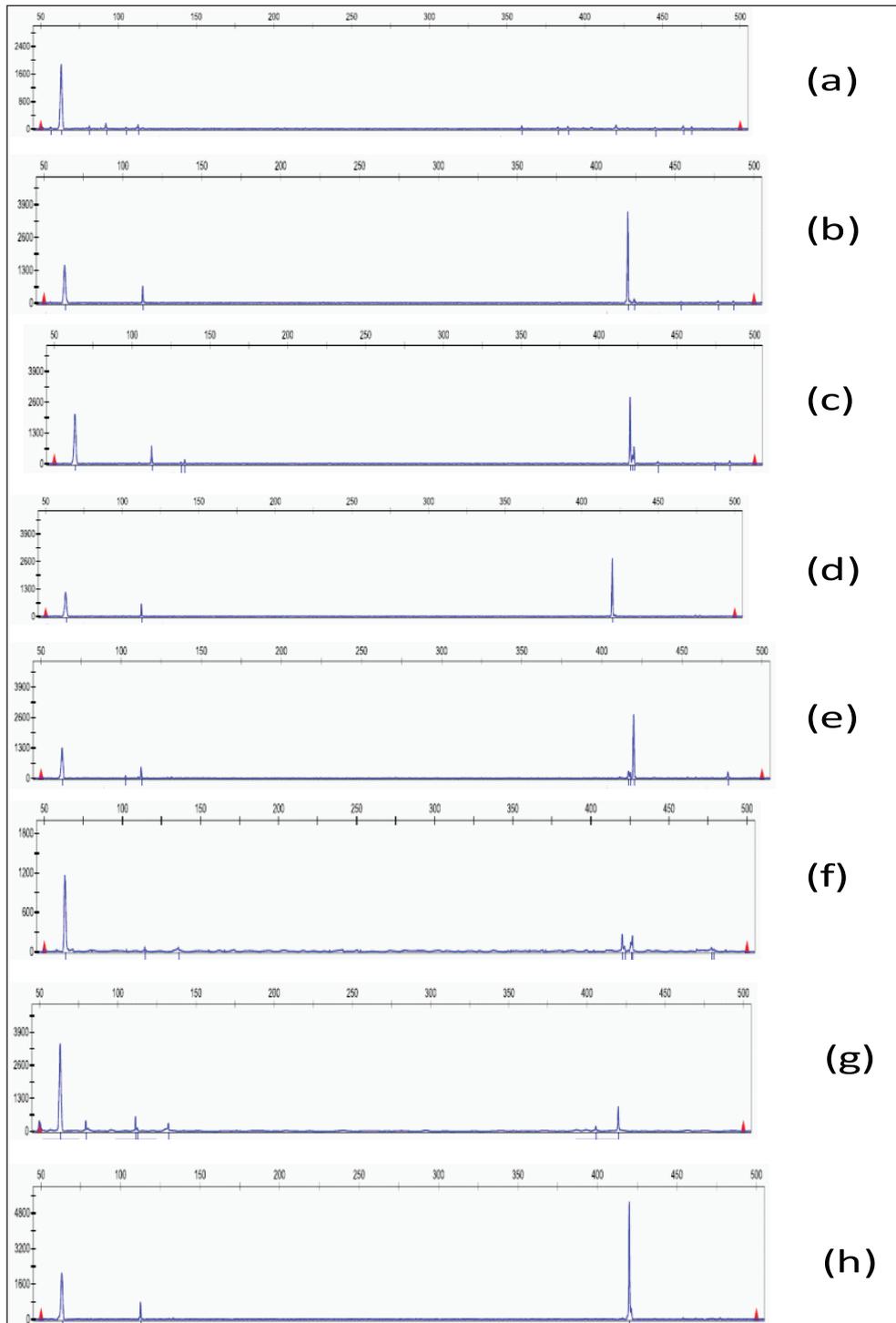
Gambar 2. Ekstraksi DNA sampel *Nephthea spp.* dari TNKpS



Gambar 3. Amplifikasi gen 16s rDNA

Hasil analisis amplifikasi terdapat pada Gambar 3. Primer yang digunakan dalam amplifikasi adalah primer pada posisi 27F dan 1.387 (posisi pada gen 16S rDNA pada *Escherichia coli*) sehingga produk amplifikasi yang dihasilkan berukuran 1.350 bp (pengurangan posisi 1.387

dengan 27). Pada Gambar 3 terlihat bahwa produk amplifikasi mempunyai ukuran sekitar 1.300 bp sehingga produk amplifikasi dapat dikatakan sesuai dengan target. Besarnya ukuran hasil amplifikasi gen 16S rDNA bergantung pada posisi primer yang digunakan. Felske¹⁷ menggunakan



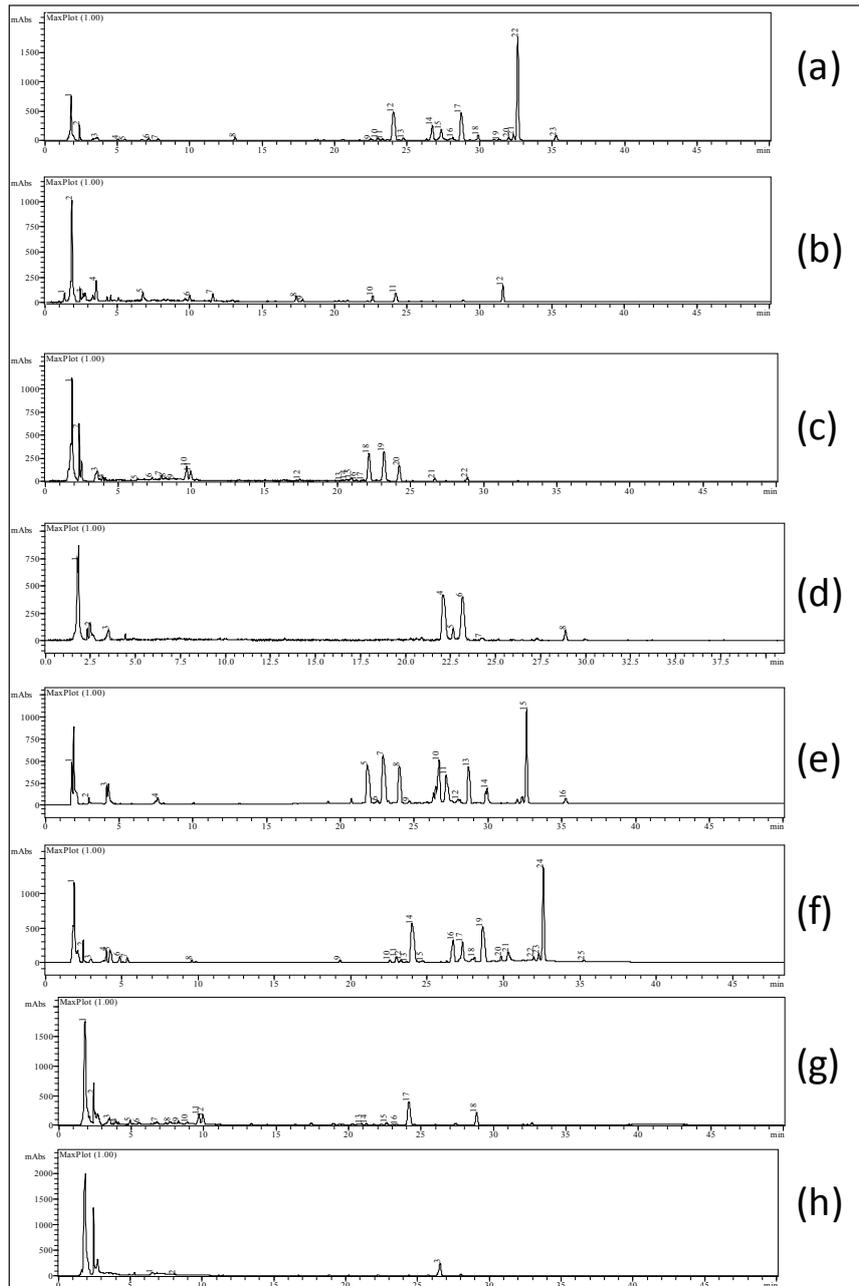
(Keterangan: a. Pulau Kayu Angin Bira; b. Jagung; c. Sebaru Besar; d. Melinjo; e. Pelangi; f. Kotok; g. Gosong Panggang; dan h. Kelapa)

Gambar 4. Profil T-RFs bakteri dalam *Nephthea spp.* dari perairan TNKpS

primer pada posisi 8F dan 907R maka produk amplifikasi yang dihasilkan sebesar 899 bp, sedangkan Isenbarger¹⁸ menggunakan primer 27F dan 1.505R sehingga produk yang dihasilkan sebesar 1.478 bp.

Perbedaan pada kelimpahan, keanekaragaman, dan keragaman populasi bakteri ditentukan oleh profil T-RFs dari tiap sampel. Gambar 4 menunjukkan hasil analisis profil T-RFs dari tiap lokasi pengambilan sampel.

Seperti yang terlihat pada Gambar 4, secara umum ukuran T-RFs yang diperoleh dari tiap lokasi sampel antara 54–486, dengan pola dari tiap lokasi berbeda. Untuk mengetahui apakah pola diversitas bakteri ini memiliki keselarasan dengan kelompok senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol *Nephthea spp.* dilakukan analisis KCKT pada sampel tersebut, yang menghasilkan kromatogram pada Gambar 5.



(Keterangan: a. Pulau Kayu Angin Bira; b. Jagung; c. Sebaru Besar; d. Melinjo; e. Pelangi; f. Kotak; g. Gosong Panggang; dan h. Kelapa)

Gambar 5. Profil metabolit sekunder *Nephthea spp.* dari perairan TNKpS

Selaras dengan profil T-RFs pada Gambar 4, Gambar 5 juga memperlihatkan pola yang beragam dari metabolit sekunder *Nephthea spp.* yang terekstrak dalam metanol. Angka pada kromatogram menunjukkan penomoran tiap puncak. Puncak yang diambil untuk analisis adalah yang di atas 5 menit, agar puncak pelarut dan senyawa-senyawa sangat polar lainnya tidak dimasukkan ke pengolahan data. Selain itu, senyawa-senyawa bioaktif jenis *cembranoid* dari biota ini diketahui memiliki nilai kepolaran menengah hingga non-polar.¹¹ Untuk mengetahui keselarasan antara keanekaragaman bakteri dan kelompok senyawa yang terekstrak di *Nephthea spp.* dilakukan transformasi nilai-nilai jumlah puncak dan luas areanya dari profil T-RFs dan kromatogram KCKT menjadi indeks keragaman Shannon-Weiner (H), kekayaan (R), dan kerataan (E). Pengolahan data menjadi ketiga indeks tersebut dapat terlihat pada Tabel 1.

Secara umum, variabel R, H, dan E digunakan dalam studi biologi makroorganisme dalam melihat keanekaragaman, kekayaan, dan pemerataan tiap-tiap lokasi ekosistem tertentu. Namun, Moran¹⁹ menerangkan bahwa ketiga variabel tersebut juga dapat menggambarkan keragaman dalam teknik kultur independen dari mikroorganisme. Nilai indeks R yang semakin besar menerangkan tingkat kekayaan yang semakin tinggi. Menurut Santosa,²⁰ indeks H menyatakan keanekaragaman tiap jenis yang diamati (nilai H di bawah 1,5 maka keanekaragaman

rendah, di antara 1,5 dan 3,5 adalah sedang, sementara di atas 3,5 adalah tinggi), indeks E menyatakan pemerataan atau dominasi jenis tertentu (nilai antara 0–1, dengan 1 menyatakan tidak ada dominasi jenis tertentu). Sementara R menerangkan jumlah puncak pada profil T-RFs dan kromatogram KCKT.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa keanekaragaman bakteri berdasarkan TRFs-nya di perairan ini secara umum adalah rendah, dengan rentang nilai indeks H 1,47–0,88. Lokasi dengan indeks keanekaragaman di atas atau sama dengan 1 adalah pada perairan Kayu Angin Bira, Jagung, Sebaru Besar, Pelangi, Kotok, dan Gosong Panggang. Pada kelima lokasi ini, indeks kekayaan (R) yang relatif tinggi (di atas 1,0) terletak di wilayah Sebaru Besar dan Kayu Angin Bira. Sehingga dapat diperkirakan bahwa wilayah tengah antara Kayu Angin Bira dan Sebaru Besar menjadi pusat keanekaragaman bakteri di TNKpS. Walaupun demikian, terlihat dari nilai pemerataan (E), kedua lokasi ini labil dengan nilai yang jauh dari 1, memperlihatkan adanya jenis TRFs tertentu yang mendominasi. Sumber antropogenik padat di wilayah tengah, yaitu Pulau Kelapa, diperkirakan menjadi penyebab berkurangnya keanekaragaman bakteri di area tersebut.

Pada indeks keanekaragaman kromatogram KCKT juga memperlihatkan hal yang selaras. Secara umum, melalui indeks keragaman (H) dan kekayaan (R), kelompok senyawa dalam

Tabel 1. Indeks kekayaan (R), indeks keragaman Shannon-Weiner (H), dan pemerataan (E) dari T-RFs dan ekstrak kasar metanol sampel *Nephthea spp.* dari tiap lokasi pengambilan sampel di TNKpS

No	Lokasi	Keanekaragaman bakteri			Keanekaragaman senyawa ekstrak <i>Nephthea spp.</i>		
		H	R	E	H	R	E
1	Pulau Kayu Angin Bira	1,09	13	0,43	1,97	20	0,66
2	Pulau Jagung	1,14	7	0,59	1,99	8	0,95
3	Pulau Sebaru Besar	1,47	10	0,64	2,16	18	0,75
4	Pulau Melinjo	0,92	3	0,84	1,14	5	0,71
5	Pulau Pelangi	1,35	7	0,70	2,19	13	0,86
6	Pulau Kotok	1,25	9	0,57	2,13	18	0,74
7	Gosong Panggang	1,00	7	0,51	2,21	13	0,86
8	Pulau Kelapa	0,88	3	0,8	1,12	6	0,63
	Rata-rata	1,14	7	0,64	1,86	13	0,77
	Nilai minimum	0,88	3	0,43	1,12	5	0,63
	Nilai Maksimum	1,47	13	0,84	2,21	20	0,95

Nephthea spp. dari perairan TNKpS memiliki keanekaragaman dan kekayaan sedang-rendah. *Nephthea spp.* yang memiliki kelompok senyawa yang sangat sedikit adalah pada perairan Kelapa, Melinjo, dan Jagung. Hal ini terlihat selaras dengan karakteristik keanekaragaman dan kekayaan bakteri di ketiga wilayah tersebut. Indeks kerataan (E) menerangkan apakah terdapat puncak yang areanya mendominasi dalam kromatogram. Suatu puncak dalam kromatogram KCKT dengan detektor UV-Vis menunjukkan karakteristik senyawa/kelompok senyawa dalam menyerap sinar UV-Vis. Puncak yang memiliki area dalam jumlah besar menyatakan penyerapan tinggi sinar tersebut, sedangkan yang kecil adalah sebaliknya. Daerah umum bagi penetapan senyawa dalam UV-Vis adalah pada panjang gelombang antara 240–270 nm, yaitu daerah penyerapan gugus-gugus rangkap terkonjugasi, seperti konjugasi linear, dan sikloheksena yang mempunyai rantai samping.²¹ Melalui nilai indeks kerataan (E) yang secara umum mendekati 1 menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari *Nephthea spp.* dari perairan TNKpS memiliki sejumlah senyawa yang memiliki gugus fungsi penyerap sinar UV-Vis yang gugus fungsionalnya sebanding.

Hasil analisis korelasi terhadap indeks bakteri dan kelompok senyawa dalam ekstrak metanol *Nephthea spp.* terdapat pada Tabel 2.

Hasil pengujian pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa nilai kekayaan antara keragaman bakteri dan kelompok senyawa dalam *Nephthea spp.* memiliki nilai yang sangat selaras dan signifikan ditandai dengan nilai korelasi keduanya sebesar 0,96. Dengan demikian, semakin beragam bakteri yang berasosiasi dalam inang *Nephthea*

spp., maka jumlah senyawa yang dapat diekstrak dari biota tersebut dapat diperkirakan juga akan semakin beragam. Hasil ini memperkuat hal yang diterangkan oleh Haygood⁸ bahwa keberadaan diversitas mikroba dalam lingkungan ataupun yang menjadi simbiosis biota karang memiliki keterkaitan yang erat terhadap metabolit sekunder yang ditemukan dari inangnya.

Selain itu, nilai indeks keanekaragaman bakteri dan kelompok senyawa dalam ekstrak metanol *Nephthea spp.* yang terbaik diperlihatkan berada di perairan wilayah tengah dan paling selatan TNKpS. Hal ini selaras dengan hasil penelitian Chasanah¹² mengenai lokasi perairan terbaik di TNKpS. Oleh karena itu, hasil ini juga memperkuat dugaan mengenai pentingnya arti kawasan konservasi laut yang efektif untuk menjaga keberlangsungan kualitas lingkungan yang baik. Pada lingkungan terumbu karang yang baik dalam wilayah perairan rendah cemaran, keanekaragaman dan kekayaan makro karang serta mikroorganismenya akan tinggi, sehingga dengan fungsi sebagai respons terhadap lingkungannya, produksi dan diversitas senyawa biopotensial farmakologis dari biota karang juga akan tinggi.

KESIMPULAN

Terdapat hubungan yang kuat antara kekayaan bakteri dan metabolit sekunder dari *Nephthea spp.* Pusat keanekaragaman dan kekayaan tersebut terletak pada sampel yang diperoleh di perairan perairan tengah dan paling selatan TNKpS, yang memiliki kualitas perairan terbaik di wilayah tersebut.

Tabel 2. Korelasi Spearman dari indeks kekayaan (R), indeks keragaman Shannon-Weiner (H), dan pemerataan (E) keragaman bakteri dan kelompok senyawa dalam ekstrak kasar metanol sampel *Nephthea spp.* dari tiap lokasi pengambilan sampel di TNKpS

Korelasi Spearman		H Ekstrak	R Ekstrak	E Ekstrak
H Bakteri	Koefisien korelasi	0,62	0,60	0,53
	P (2-arah)	0,10	0,11	0,18
R Bakteri	Koefisien korelasi	0,36	0,96**	0,07
	P (2-arah)	0,39	7,2E-05	0,86
E Bakteri	Koefisien korelasi	-0,40	-0,77	-0,19
	P (2-arah)	0,32	0,03	0,65

Keterangan: ***) p<0,01

SARAN

Kawasan konservasi laut yang efektif sangat penting untuk menjaga keberlangsungan kualitas lingkungan yang baik dalam menjaga kandungan produksi *plasma nutfah* biota terumbu karang yang memiliki nilai biopotensial farmakologis tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Staf Taman Nasional Kepulauan Seribu atas bantuannya dalam pelaksanaan kegiatan riset di lapangan: Sahiran, Satibi, dan Hamdani.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Hoover, C.A., M. Slattery, N.M. Targett, and A.G. Marsh. 2008, Transcriptome and Metabolite Responses to Predation in a South Pacific Soft Coral, *Biology Bulletin*, 214: 319–328.
- ²Widjhati R., A. Supriyono, dan Subintoro. 2004. Pengembangan Senyawa Bioaktif dari Biota Laut. *Makalah Forum Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta: 25 Maret 2004. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan, Depertemen Kelautan dan Perikanan.
- ³Britschgi, T. B. and S. J. Giovannoni. 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 57: 1.707–1.713.
- ⁴Urakawa, H., K.K. Tsukamoto, and K. Ohwada. 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 145: 3.305–3.315.
- ⁵Hentschel, U., K. M. Usher, and M. W. Taylor. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol*. 55: 167–177.
- ⁶Taylor, M. W., R. Radax, D. Steger, and M. Wagner. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71: 295–347.
- ⁷Harder, T. et al. 2003. A distinctive epibiotic bacterial community on the soft coral *Dendronephthya* sp. and antibacterial activity of coral tissue extracts suggest a chemical mechanism against bacterial epibiosis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 337–347.
- ⁸Haygood, M.G., E.W. Schmidt, S.K. Davidson, and D.J. Faulkner. 1999. Microbial Symbionts of Marine Invertebrates: Opportunities for Microbial Biotechnology. *Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(1):33–43.
- ⁹Pringault, O., R. Duran, S. Jacquet, and J.P. Torretton. 2007. Temporal Variations of Microbial Activity and Diversity in Marine Tropical Sediments (New Caledonia Lagoon). *Microb Ecol*.
- ¹⁰Pabel, C.T. et al. 2003. Antimicrobial Activities and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Bacillus Isolates from the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biotechnology*, 5: 424–434.
- ¹¹Januar, H.I. et al. 2010. Cytotoxic Compounds from Indonesia Specimens of the Soft Coral *Nephthea* spp., *Marine Drugs*, 8: 2.142–2.152.
- ¹²Chasanah, E. et al. 2010. *Pengkajian Efek Perubahan Iklim dan Stresor Antropogenik pada Senyawa Bioaktif Ekologis Biota Invertebrata Terumbu Karang di Lingkungan CTI*. Laporan Teknis Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan 2010. Jakarta.
- ¹³Januar, H.I. et al. 2009, A Preliminary Study, Fine Chemicals from *Nephthea* and *Sarcophyton* in a Local Pressure from Environmental Stressors at Seribu Islands Indonesia, *Proceeding Paper at Biotechnology Session -World Ocean Conference*, Manado 11–15 Mei 2009.
- ¹⁴Holtrof, G. W. 2004. *Jakarta Jabodetabek: Peta Jalan dan Index*. Edisi 14. PT Djembatan, Indonesia.
- ¹⁵Zhou, J., A. M. Bruns, and J.M. Tiedje. 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2): 316–322.
- ¹⁶Allen, B., M. Kon, and B.Y. Yaneer. 2009. A new phylogenetic diversity measure generalizing the shannon index and its application to phyllostomid bats. *The American Naturalist*, 174(2)
- ¹⁷Felske, A. et al.1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology*. 143:2.983–2.989.
- ¹⁸Isenbarger, T.A. et al. 2008. Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Applied and Environmental Microbiology*: 840–849.
- ¹⁹Moran, A.C. et al. 2008. Changes in Bacterial Community Structure Associated with Coastal Copper Enrichment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(11): 2.239–2.245.

²⁰Santosa, Y., E.P. Ramadhan, dan D.A. Rahman. 2008. Studi Keragaman Mamalia pada Beberapa Tipe Habitat di Stasiun Penelitian Pondok Ambung Taman Nasional Tanjung Puting Kalimantan Tengah. *Media Konservasi*, 13(3): 1–7.

²¹Januar, H.I., T. Wikanta, dan E. Hstarini. 2005, Analisis Spektrometri UV-Vis dan FT-IR terhadap Gugus Fungsi Ekstrak Metanol Rumput Laut *Ulva fasciata* Segar dan Kering, *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia Badan Riset Kelautan dan Perikanan*, 11(4): 1–9.