

**UJI POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK SPONS DAN  
BAKTERI SIMBION SPONS LAUT *Callyspongia vaginalis* DARI  
PERAIRAN KENDIT TERHADAP PERTUMBUHAN  
BAKTERI *Vibrio harveyi***

**SKRIPSI**



**UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A**

**Disusun Oleh :**

**DEWI FORTUNA NURAMA**

**NIM : H74218017**

**PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL  
SURABAYA**

**2021**

## PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Dewi Fortuna Nurama

NIM : H74218017

Program Studi : Ilmu Kelautan

Angkatan : 2018

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul : “ UJI POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK SPONS DAN BAKTERI SIMBION SPONS LAUT *Callyspongia vaginalis* DARI PERAIRAN KENDIT TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Vibrio harveyi* ”. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 29 Maret 2022

Yang menyatakan,



Dewi Fortuna Nurama

NIM. H74218017

## LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : DEWI FORTUNA NURAMA

NIM : H74218017

JUDUL : UJI POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK SPONS DAN  
BAKTERI SIMBION SPONS LAUT *Callyspongia vaginalis* DARI

PERAIRAN KENDIT TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI

*Vibrio harveyi*

Ini telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 07 Juli 2022

Dosen Pembimbing 1



Misbakhul Munir, S.Si., M.Kes

NIP.1981072252014031002

Dosen Pembimbing 2



Dian Sari Maisaroh, M.Si

NIP.198908242018012001

## PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Dewi Fortuna Nurama ini telah dipertahankan  
di depan tim penguji skripsi  
Surabaya, 12 Juli 2022

Mengesahkan,  
Dewan Penguji

Penguji I



Misbakhul Munir, S.Si, M.Kes

NIP.19810117252014031002

Penguji II



Dian Sari Maisaroh, S.Kel, M.Si

NIP.19890824201812001

Penguji III



Mauludiyah, S.T, M.T

NUP. 201409003

Penguji IV



Fajar Setiawan, M.T

NIP.198405062014031001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Sunan Ampel  
Surabaya



Dr. A. Saepul Hamdani, M.Pd

NIP.196507312000031002

# PERSETUJUAN PUBLIKASI



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA  
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300  
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Dewi Fortuna Nurama  
NIM : H74218017  
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Ilmu Kelautan  
E-mail address : dewifortunan23@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi  Tesis  Desertasi  Lain-lain (.....)

yang berjudul :

Uji Potensi Antibakteri Ekstrak Spons dan Bakteri Symbion Spons Laut *Callyspongia vaginalis* dari Perairan Kendit Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio barveyi*

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 17 Agustus 2022

Penulis

(Dewi Fortuna Nurama)

## ABSTRAK

### UJI POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK SPONS DAN BAKTERI SIMBION SPONS LAUT *Callyspongia vaginalis* DARI PERAIRAN KENDIT TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Vibrio harveyi*

Saat ini penggunaan antibiotik pada bidang perikanan maupun budidaya diperkirakan memiliki dampak negatif terhadap lingkungan karena menyebabkan polutan, sebagai salah satu upaya alternatif penanggulangan masalah infeksi *vibriosis* pada hewan budidaya dengan menganalisis potensi antibakteri ekstrak spons dan bakteri simbion spons terhadap bakteri *Vibrio harveyi* maka spons jenis *Callyspongia vaginalis* yang ditemukan di perairan Kendit perlu untuk diujikan mikroba simbion dan ekstraknya sebagai sebagai salah satu upaya alternatif penanggulangan masalah infeksi *vibriosis* pada hewan budidaya dengan menganalisis potensi antibakteri ekstrak spons dan bakteri simbion spons *Callyspongia vaginalis* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penapisan bakteri asosiasi spons sebagai antibakteri patogen *Vibrio harveyi*, mengetahui pengaruh entibakteri ekstrak spons terhadap bakteri patogen, serta mengetahui hasil skrining uji fitokimia ekstrak spons. Uji antagonis pada penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa mikroorganisme yang bersifat antagonis dapat menghambat bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Metode yang digunakan pada metode ini yaitu difusi cakram. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*, hal ini ditunjukkan oleh masih adanya zona bening pada konsentrasi 10%, 20%, 80% yang menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut memiliki kriteria zona hambat lemah, sedangkan pada konsentrasi 40% dan 60% memiliki kriteria zona hambat sedang. Hasil uji penapisan menunjukkan hanya terdapat 4 isolat aktif menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dengan ditandai munculnya zona hambat disekitar kertas cakram dan dikategorikan memiliki daya hambat lemah. Uji fitokimia pada ekstrak spons ini menunjukkan adanya metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, tripenoid, dan Steroid.

**Kata kunci:** *Callyspongia vaginalis*, Spons, *Vibrio harveyi*, Bakteri simbion, Metabolit sekunder



## ABSTRACT

### THE POTENTIAL ANTIBACTERIAL EXTRACT SPONGES AND BACTERIA ASSOCIATION OF MARINE SPONGES *Callyspongia vaginalis* OF THE WATERS KENDIT ON THE GROWTH OF BACTERIA *Vibrio harveyi*

At present the use of antibiotics in the field of fisheries and aquaculture is thought to have a negative impact on the environment because it causes pollutants, as one of the alternative efforts to overcome the problem of vibriosis infection in cultivation by analyzing the potential for antibacterial sponge and bacteria symbion sponge to *Vibrio harveyi* found in Kendit waters need to be tested for symbiotic and extract microbes as an alternative effort to overcome the problem of vibriosis infection in cultivation by analyzing the antibacterial potential of sponge extract and bacteria symbion sponge *Callyspongia vaginalis* against *Vibrio harveyi* bacteria. This research aims to determine the screening of sponge associations as antibacterial pathogenic *Vibrio harveyi*, determine the effect of sponge extracts of the pathogenic bacteria, as well as finding out the results of the scrining of sponge extract phytochemical tests. The antagonistic test in this study was conducted to prove that antagonistic microorganisms can inhibit the pathogenic bacteria of *Vibrio harveyi*. The method used in this method is discus discus. The test results show that the *Callyspongia vaginalis* sponge extract has the potential to inhibit the growth of *Vibrio harveyi* bacteria, this is indicated by the presence of clear zones at a concentration of 10%, 20% and 80% which shows that the concentration has weak inhibition zone criteria, whereas at a concentration of 40% and 60% has moderate inhibition zone criteria. The screening test results showed that there were only 4 active isolates showing the presence of antibacterial activity with marked the appearance of the inhibition zone around the disc paper and categorized as having a weak inhibition. The phytochemical test in this sponge extract shows the presence of secondary metabolites namely flavonoids, alkaloids, tripenoids, and steroids.

**Keywords:** *Callyspongia vaginalis*, Sponge, *Vibrio harveyi*, Simbionion bacteria, Secondary metabolites

UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## DAFTAR ISI

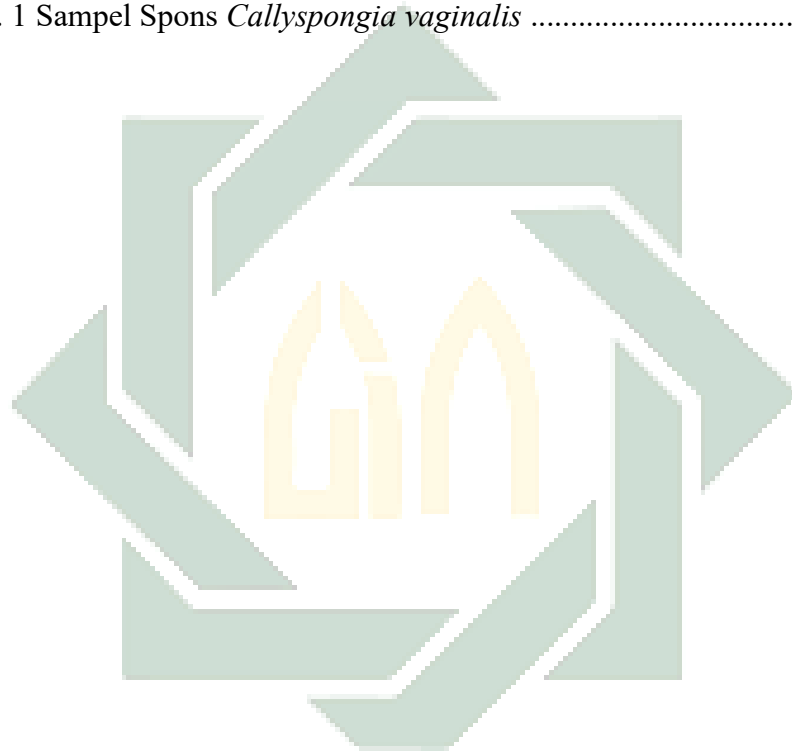
PERNYATAAN KEASLIAN.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING .....	ii
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI.....	iii
PERSETUJUAN PUBLIKASI .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT.....	vii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
1.5 Batasan Masalah .....	3
BAB II.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tinjauan Umum Spons.....	4
2.4 Bakteri.....	6
2.5 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	7
2.6 Bakteri Simbion .....	8
2.7 Ekstraksi .....	8
2.8 Pelarut.....	10
2.9 Jenis Media .....	10
2.10 Uji Fitokimia.....	11
2.11 Integrasi Keislaman.....	13
2.12 Penelitian Terdahulu.....	14
BAB III .....	19
METODOLOGI PENELITIAN .....	19



3.1 Lokasi Penelitian.....	19
3.2 Tahapan Penelitian .....	20
3.3 Variabel Penelitian .....	22
3.4 Tahap Persiapan dan Pelaksanaan.....	22
3.5 Penapisan Bakteri Simbion Spons <i>Callyspongia Vaginalis</i> terhadap .....	25
Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i> .....	25
3.6 Efektivitas Antibakteri Spons <i>Callyspongia vaginalis</i> Sebagai.....	29
Antibakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	29
3.7 Skrining Fitokimia Ekstrak Spons <i>Callyspongia vaginalis</i> .....	32
BAB IV .....	35
HASIL DAN PEMBAHASAN .....	35
4.1 Penapisan Bakteri simbion Spons <i>Callyspongia vaginalis</i> sebagai.....	35
antibakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	35
4.1.1 Hasil Identifikasi Spons dan Karakterisasi Isolat Tunggal .....	35
4.1.2 Hasil Pewarnaan Gram .....	36
4.1.3 Hasil Uji Antagonis Bakteri Simbion Spons <i>Callyspongia Vaginalis</i> ...	36
4.2 Efektivitas Antibakteri Spons <i>Callyspongia vaginalis</i> Sebagai Antibakteri	39
<i>Vibrio harveyi</i> .....	39
4.2.1 Hasil Uji Antibakteri Ekstrak spons <i>Callyspongia vaginalis</i> .....	39
4.2.2 Hasil Uji Statistika.....	40
4.3 Hasil Uji Fitokimia.....	42
BAB V .....	45
PENUTUP.....	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran.....	45
LAMPIRAN.....	53

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 <i>Callyspongia vaginalis</i> .....	6
Gambar 2. 2 Bentuk Bakteri.....	8
Gambar 2. 3 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	9
Gambar 3. 1 Lokasi Peta Penelitian .....	20
Gambar 3. 2 Flow Chart Tahap Penapisan.....	21
Gambar 3. 3 Flow Chart Uji Ekstrak Spons .....	22
Gambar 3. 4 Uji Difusi Cakram .....	29
Gambar 4. 1 Sampel Spons <i>Callyspongia vaginalis</i> .....	36



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu .....	16
Tabel 3. 1 Alat Tahap Persiapan dan Pelaksanaan .....	23
Tabel 3. 2 Bahan Tahap Persiapan dan Pelaksanaan .....	24
Tabel 3. 3 Alat Metode Penapisan Aktivitas Antibakteri .....	26
Tabel 3. 4 Bahan Metode Penapisan Aktivitas Antibakteri .....	26
Tabel 3. 5 Alat Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Spons .....	30
Tabel 3. 6 Bahan Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Spons .....	30
Tabel 3. 7 Alat Uji Fitokimia .....	33
Tabel 3. 8 Bahan Uji Fitokimia .....	33
Tabel 4. 1 Hasil Karakterisasi Isolat Tunggal Spons <i>Callyspongia vaginalis</i> .....	36
Tabel 4. 2 Hasil Pewarnaan Gram.....	37
Tabel 4. 3 Hasil Pengamatan 24 jam Uji Antagonis .....	37
Tabel 4. 4 Hasil Pengamatan 48 jam Uji Antagonis .....	37
Tabel 4. 5 Hasil Pengamatan 24 jam Uji Antibakteri Ekstrak Spons .....	39
Tabel 4. 6 Hasil Pengamatan 48 jam Uji Antibakteri Ekstrak Spons .....	40
Tabel 4. 7 Hasil Uji Fitokimia .....	43

UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sumber daya alam di wilayah daratan telah banyak diteliti oleh ilmuwan untuk diambil manfaatnya bagi kesejahteraan hidup manusia. Di sisi lain, laut tidak hanya berfungsi sebagai sumber cadangan bahan makanan dari berbagai biota laut yang hidup di dalamnya tetapi juga sebagai bahan pembuat kosmetik maupun obat-obatan (Pasodung *et al.*, 2018). Perairan Kendit yang menjadi andalan pemerintah Kabupaten Situbondo sebagai sumber pendapatan, terdapat begitu banyak sumber daya alam yang dimiliki, selain ikan Kerapu yang menjadi ciri khas perairan ini, terdapat biota-biota laut lainnya untuk dikembangkan, salah satu biota yang potensial yaitu spons.

Penelitian mengenai organisme laut beberapa tahun terakhir pun sangat gencar dilakukan, baik di dalam maupun di luar negeri. Substansi bioaktif, terutama terdapat pada biota laut yang tidak bertulang belakang seperti spons. Biota tersebut memiliki kandungan senyawa aktif yang lebih banyak dibanding *algae* dan tumbuhan darat. Diantara biota laut tak bertulang belakang tersebut, spons menduduki tempat teratas sebagai sumber substansi aktif (Aristyawan *et al.*, 2018).

Spons merupakan salah satu bahan bioaktif dari laut yang memiliki berbagai aktivitas seperti anti mikroba, anti jamur, antivirus, anti kanker, dan antibakteri, penelitian yang dilakukan oleh Aunurohim (2007) terhadap spons *Callyspongia sp.* juga menunjukkan bahwa spons tersebut mengandung steroid, alkaloid, flavonoid dan trepenoid. Penelitian ini mengambil spons *Callyspongia vaginalis*, karena menurut Rahmawati (2016) spons spesies ini menjadi salah satu jenis spons yang sering ditemukan di perairan Indonesia yang banyak diteliti kandungan dan aktivitas senyawa bioaktifnya. Adanya penelitian senyawa aktif antibakteri merupakan langkah awal yang baik dan dapat dimanfaatkan dibidang kelautan dan perikanan.

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Macpal *et.al.*(2019) menggunakan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* pada spons *Callyspongia aerizusa*, namun pada penelitian kali ini menggunakan bakteri patogen *Vibrio harveyi* karena menurut

Saptiani *et al* (2013) *Vibrio* sp. merupakan bakteri akuatik yang dapat ditemukan di sungai, muara sungai, kolam, dan laut serta dapat memicu berbagai macam penyakit yang menjadi kendala utama pada bidang perikanan dan budidaya karena dapat merugikan usaha budidaya seperti kematian total, penurunan produksi dan penurunan kualitas perairan. Penyakit yang timbul dapat disebabkan oleh salah satu jenis penyakit bakterial seperti bakteri *Vibrio harveyi* dan dikenal dengan nama penyakit *Vibriosis* atau penyakit udang menyala (kunang-kunang) yang umumnya menyerang udang vanname. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian di atas 80% dalam waktu relatif singkat. Hal ini dikarenakan tingkat keganasan bakteri *Vibrio harveyi* yang sangat tinggi.

Penggunaan antibiotik di pasaran menurut Dr. Hari Paraton, SpOG selaku Ketua KPRA Kemenkes RI pada talkshow *World Antimicrobial Awareness Week 2020* tidak efektif untuk diaplikasikan pada bidang perikanan maupun budidaya karena selain berdampak negatif menjadi polutan seperti limbah dan antibiotik yang diberikan melalui pakan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada tubuh dan menimbulkan masalah resistensi, maka penelitian ini dilakukan guna untuk mencari tahu bahan alam apa khususnya yang berasal dari laut yang bisa kita gunakan untuk menjadi alternatif serta memberi keuntungan lainnya yaitu pencemaran lingkungan berkurang karena dapat di distruksi oleh bakteribakteri di alam. Berdasarkan latar belakang tersebut spons jenis *Callyspongia vaginalis* yang ditemukan di perairan kendit, perlu untuk diujikan mikroba simbiotiknya sebagai sebagai salah satu upaya penanggulangan masalah infeksi *vibriosis* pada hewan budidaya maupun menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak spons terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut :

- a. Bagaimana penapisan bakteri simbion spons *Callyspongia vaginalis* sebagai antibakteri patogen *Vibrio harveyi* ?
- b. Bagaimana pengaruh antibakteri ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*?
- c. Bagaimana hasil uji fitokimia ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Mengetahui penapisan bakteri laut bakteri simbion spons *Callyspongia vaginalis* sebagai antibakteri patogen *Vibrio harveyi*.
- b. Mengetahui pengaruh antibakteri ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*.
- c. Mengetahui hasil skrining uji fitokimia ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi kepada pembaca mengenai aktivitas potensi antibakteri pada Spons *Callyspongia vaginalis* di Perairan Kendit, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur.
2. Memberikan pengetahuan pada peneliti mengenai potensi aktivitas antibakteri pada spons yang diujikan terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*.

## 1.5 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah di atas, batasan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Sampel spons yang digunakan adalah spesies *Callyspongia vaginalis*
- b. Sampel spons diambil di Perairan Kendit, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur.
- c. Penelitian ini hanya terfokus pada jenis bakteri patogen *Vibrio harveyi*.
- d. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi spons adalah metanol
- e. Pengamatan dilakukan pada 24 jam dan 48jam.
- f. Uji fitokimia hanya sampai pengamatan visual saja



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tinjauan Umum Spons**

Spons menjadi salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang penyebarannya cukup luas. Terdapat 15.000 spesies spons di seluruh dunia dan sekitar 45% senyawa bioaktif ditemukan pada spons. Perairan Indonesia terdapat 850 jenis spons yang berpotensi untuk menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki sifat bioaktif. Spons termasuk hewan berpori yang bersifat filter feeder sehingga menjadi habitat bagi mikroorganisme untuk tinggal dalam tubuhnya (Ngantung *et al.*, 2016).

Sebagai filter feeder yang mencari makanan dengan mengisap dan menyaring air melalui sel cambuk dan memompakan air keluar melalui oskulum, hidup spons selalu melekat pada substrat dan tidak dapat berpindah tempat secara bebas. Saat mempertahankan diri dari serangan predator dan infeksi bakteri patogen, spons mengembangkan sistem biodefense yaitu dengan menghasilkan zat racun dari dalam tubuhnya, menurut sebagai bahan farmasi zat ini umumnya dimanfaatkan (Murniasih, 2003).

Bentuk tubuh spons menurut Marzuki (2018) yaitu sederhana seperti tabung dengan dinding tipis, atau bentuknya terdapat masif, beragam dan kurang teratur. Jenis spons beberapa bercabang seperti pohon, lainnya memiliki bentuk seperti sarung tinju, cawan dan kubah. Spons juga memiliki ukuran beragam, mulai dari jenisnya berukuran sebesar kepala jarum pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0,9 m dan tebalnya 30,5m. Spons jenis-jenis tertentu nampak berbulu getar karena spikula menyembul keluar dari badannya. Spons juga memiliki kemampuan regenerasi yang sangat tinggi, apabila sebagian tubuh spons terpotong, rusak atau hancur, bagian tersebut dapat teregenerasi menjadi bagian yang utuh seperti semula. Proses regenerasi dapat dilakukan apabila bagian tubuh spons yang masih sehat tidak boleh kurang dari 0.4 mm dan terkandung sel-sel koanosit dalam jumlah yang mencukupi untuk menumbuhkan bagian spons yang baru.

## 2.2 *Callyspongia vaginalis*

Demospongiae merupakan kelompok spons yang paling dominan diantara filum porifera. Seluruh Demospongiae memiliki saluran air tipe leukonoid. Kelompok spons ini tersebar luas di alam, jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. Umumnya, habitat Demospongiae di laut dalam maupun dangkal, *Callyspongia vaginalis* merupakan salah satu contoh spons dari kelas Demospongiae. Spesies ini termasuk bagian dari genus *Callyspongia* dan famili *Callyspongiidae*, menurut Faden (2018) nama ilmiah spesies ini pertama kali diterbitkan pada tahun 1814 oleh Jean-Baptiste Lamarck. Klasifikasi spons *Callyspongia vaginalis* sebagai berikut :

Filum: Porifera

Kelas: Demospongiae

Famili: Callyspongiidae

Spesies: *Callyspongia vaginalis*



Gambar 2. 1 *Callyspongia vaginalis* (spongeguide.uncw.edu)

Menurut Cruickshank (2016) karakteristik morfologi permukaan warna dan bentuk pertumbuhan yang telah diamati, biasanya spesies ini ditemui sebagai satu hingga beberapa tabung abu-abu elastis dengan proyeksi kerucut kecil. Seiring waktu, tabung dapat dihubungkan oleh anastomosis untuk membentuk spesimen berbentuk kipas berongga.

Spons laut memiliki daya tarik untuk diteliti karena memiliki kandungan metabolit sekunder yang dihasilkannya berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang pengobatan. Spons *Callyspongia* sp menghasilkan metabolit sekunder berupa steroid, alkaloid, flavonoid, dan terpenoid yang ke depannya dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat (Rumampuk *et al.*, 2017).

### 2.3 Antibakteri

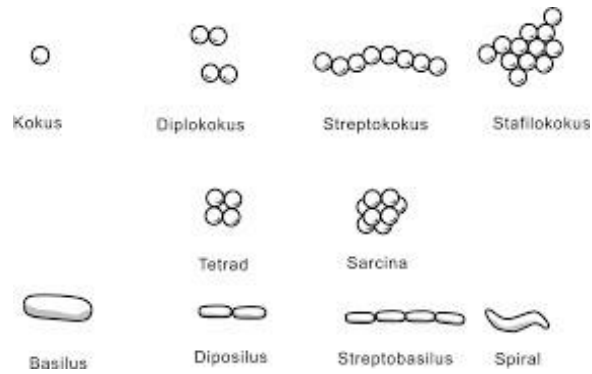
Antibakteri dapat diklasifikasikan menjadi bakteriostatik, bakteriosidal, dan bakteriolisis. Bakteriostatik secara berkala sebagai penghambat sintesis protein dan berfungsi sebagai pengikat ribosom. Bakteriosidal mengikat kuat pada sel target dan tidak hilang melalui pengenceran yang tetap akan membunuh sel. Sel yang mati tidak hancur dan tetap memiliki jumlah sel yang konstan. Beberapa bakteriosidal merupakan bakteriolisis, yakni membunuh sel secara lisis pada sel dan mengeluarkan komponen sitoplasmanya. Lisis dapat menurunkan jumlah sel dan juga kepadatan kultur (Madigan *et al.*, 1997).

Respon tiap mikroorganisme terhadap antibakteri berbeda-beda. Bakteri memiliki tingkat sensitivitas yang berbeda dimana umumnya bakteri Gram-positif lebih rentan dibandingkan dengan bakteri Gram-negatif yang secara alami lebih resisten. Target penting antibiotik terhadap bakteri yaitu ribosom, dinding sel, membran sitoplasma, enzim biosintesis lemak, serta replikasi, dan transkripsi DNA (Madigan *et al.*, 1997). Kriteria kekuatan antibakteri menurut (Davis & Stout, 1971) adalah sebagai berikut:

1. Diameter zona hambat 10 - 20mm : Daya hambat kuat
2. Diameter zona hambat 5 - 10 mm : Daya hambat sedang
3. Diameter zona hambat 0 - 5 mm : Daya hambat lemah

### 2.4 Bakteri

Bakteri berasal dari kata latin bacterium (jamak, bacteria), merupakan kelompok terbanyak dari organisme hidup. Mereka sangatlah kecil dan kebanyakan uniselular, dengan struktur sel yang relatif sederhana tanpa nukleus atau inti sel, *cytoskeleton*, dan organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Berdasarkan kemampuan menimbulkan penyakit bakteri ada dua jenis yakni patogen dan non-patogen. Patogen merupakan bakteri yang dapat menimbulkan penyakit baik melalui invasi langsung atau mencemari makanan (Rahayuningtyas *et al.*, 2017). Sedangkan bakteri non-patogen adalah tidak berpotensi menimbulkan penyakit, bahkan ada yang menguntungkan bagi manusia. Berdasarkan bentuk bakteri dibagi menjadi tiga yakni Basillus, Coccus, Spiral yang tersaji pada Gambar 2.2



Gambar 2. 2 Bentuk Bakteri (repository.ut.ac.id)

## 2.5 Bakteri *Vibrio harveyi*

*Vibrio harveyi* merupakan golongan bakteri Gram negatif yang ada di perairan laut yang menyebabkan timbulnya luminous *vibriosis* pada udang, dan menyebabkan penyakit serius pada budidaya udang. Pada bakteri Gram negatif, dinding selnya mengandung peptidoglikan dan juga lipopolisakarida, yang fungsinya melindungi sel. Bakteri ini sulit diberantas dengan obat antibiotik, yang sudah terserang umumnya tidak dapat disembuhkan. Bakteri yang resisten terhadap antibiotik dapat mentransfer gen resisten ke bakteri lain melalui air, udang, pakan, peralatan maupun aktivitas manusia (Saptiani *et al.*, 2013). Dalam Bergey's Manual edisi ke-9 (Lesser & Blakemore, 1990), klasifikasi bakteri *Vibrio harveyi* yaitu sebagai berikut :

Kingdom : Prokaryota  
 Divisi : Bacteria  
 Ordo : Eubacteriales  
 Family : Vibrionaceae  
 Genus : *Vibrio*  
 Spesies : *Vibrio harveyi*



Gambar 2. 3 Bakteri *Vibrio harveyi* (repository.ub.ac.id)

Menurut Lesser & Blakemore (1990), pada umumnya *V. harveyi* bersifat patogen *oportunistik*, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada di lingkungan pemeliharaan yang bersifat saprofitik dan berkembang patogenik apabila kondisi lingkungan dan inangnya memburuk. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 30°C, salinitas antara 20-30 ppt dengan pH 7,0 dan bersifat *anaerobik fakultatif*, yaitu dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen.

## 2.6 Bakteri Simbion

Bakteri yang hidup di laut serta berkembang di laut memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan berbagai organisme laut, sehingga tidak ada satupun organisme laut yang bebas dari interaksi dengan bakteri. Bakteri di laut memiliki peranan yang sangat penting untuk menjaga kesinambungan kehidupan laut karena bakteri mempunyai kemampuan untuk mendegradasi senyawa organik menjadi senyawa anorganik (Ginting *et al.*, 2019).

Beberapa bakteri laut telah dilaporkan oleh Nofiani (2012) menunjukkan aktivitas antimikroba, khususnya bakteri yang bersimbion dengan organisme lain. Bakteri tersebut mempunyai kemampuan yang hampir sama dengan inangnya untuk menghasilkan senyawa bioaktif salah satunya terdapat pada spons. Umumnya, keberadaan bakteri simbion berfungsi untuk melindungi biota yang ditumpanginya dan dirinya dengan menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan golongan senyawa dengan struktur bervariasi dan khas untuk setiap organisme, memiliki berat molekul relatif kecil, berfungsi sebagai pertahanan diri organisme, melawan penyakit, dan pertumbuhan.

## 2.7 Ekstraksi

Ekstraksi dikenal sebagai pemisahan bagian aktif dari jaringan sampel dengan menggunakan pelarut yang selektif dalam standar yang sesuai dengan prosedur ekstraksi. Metode ekstraksi terbagi menjadi dua macam yaitu metode ekstraksi modern dan metode ekstraksi konvensional. Metode konvensional diantaranya maserasi dan refluks, sedangkan metode ekstraksi modern diantaranya yaitu ekstraksi *Microwave Assisted Extraction*. Berikut berbagai macam jenis metode ekstraksi menurut (Tetti, 2014) :

- 1) Maserasi : Merupakan metode maserasi sederhana yang paling banyak dilakukan baik untuk skala kecil maupun skala industri. Penggunaan metode ini dilakukan dengan memasukkan sampel dan pelarut yang sesuai ke dalam erlenmeyer pada suhu ruang. Setelah proses tersebut, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Metode ini memiliki kerugian utama yaitu memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak. Namun metode ini dapat menghindari rusaknya senyawa yang bersifat termolabil.
- 2) *Ultrasound – Assisted Solvent Extraction* : Termasuk metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound*. Proses metode ini meliputi wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel sehingga menghasilkan rongga pada sampel dan membuat kerusakan sampel dapat menyebabkan meningkatnya kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi.
- 3) Perkolasi : Metode ini memiliki kelebihan yaitu sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya yaitu jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu. Tahap penggunaan metode ini yaitu serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator, kemudian pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah.
- 4) Soxhlet : Metode soxhlet dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa atau kertas saring dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Metode ini memiliki keuntungan dibanding metode lain yaitu memiliki proses ekstraksi kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugian dari metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih.



- 5) Reflux dan Destilasi Uap : Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih, sehingga uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu. Destilasi uap memiliki proses yang sama, selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Namun, metode ini memiliki kerugian yaitu senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi.

## 2.8 Pelarut

Salah satu faktor yang mempengaruhi ekstraksi adalah jenis pelarut, karena mempengaruhi perolehan hasil kadar zat aktif serta pemakaian pelarut terbaik akan menjamin proses ekstraksi yang optimal (Noviyanty *et al.*, 2019). Pada proses ekstraksi didapatkan senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder, terdapat 3 tingkat kepolaran pelarut yang berbeda yaitu nonpolar, semipolar, dan polar.

- 1) Pelarut Polar : Memiliki tingkat kepolaran yang tinggi. Contoh pelarut polar diantaranya yaitu air, metanol, etanol, asam asetat, asam format.
- 2) Pelarut Semipolar : Pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah dibanding pelarut polar, namun tingkat kepolarannya lebih tinggi dibanding pelarut non-polar. Beberapa contoh pelarut semipolar diantaranya adalah aseton, etil asetat, dan kloroform
- 3) Pelarut Non-polar : Merupakan pelarut yang hampir tidak polar, dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang tidak larut dalam pelarut polar. Beberapa contoh pelarut non-polar adalah heksana, eter, benzena, dan toulena.

## 2.9 Jenis Media

Media merupakan campuran nutrien atau zat makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan. Selain untuk menumbuhkan mikroba, media juga dibutuhkan untuk isolasi, inokulasi, kultur atau peremajaan mikroba. Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroba, yaitu sumber energi misalnya gula, sumber nitrogen, juga ion inorganik esensial dan kebutuhan yang khusus, seperti vitamin. Media pertumbuhan mengandung unsur makro yang dibutuhkan

mikroba seperti karbon (C), Hidrogen (H), oksigen (O), Nitrogen (N), dan Phospor (P). selain itu media juga mengandung unsur mikro seperti besi (Fe), dan Magnesium (Mg). Berdasarkan bentuknya menurut (Yusminar *et al.*, 2017) media dibedakan menjadi :

- 1) Media Cair : Digunakan untuk pembenihan diperkaya sebelum disebar media padat, tidak cocok untuk isolasi mikroba dan tidak dapat dipakai untuk mempelajari koloni kuman.
- 2) Media Semi Padat : Media yang mengandung agar sebesar 0,5 %
- 3) Media Padat : Digunakan untuk mempelajari koloni kuman, untuk isolasi dan untuk memperoleh biakan murni.

## 2.10 Uji Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan cara untuk mengidentifikasi bioaktif yang belum tampak melalui suatu tes atau pemeriksaan yang dapat dengan cepat memisahkan antara bahan alam yang memiliki kandungan fitokimia tertentu dengan bahan alam yang tidak memiliki kandungan fitokimia tertentu, dan merupakan suatu tahapan awal yang dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dalam suatu sampel. Skrining ini biasanya meliputi pemeriksaan kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, glikosida, terpenoid, atau steroid (Najoan *et al.*, 2016).

Tahap ini merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam sampel yang sedang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna.

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan. Pada penelitian ini pengujiannya dilakukan dengan cara mengambil sedikit sampel dari ekstrak hasil maserasi, lalu ditambahkan reagen sesuai dengan senyawa yang akan diidentifikasi

- 1) Flavonoid : Merupakan golongan fenol terbesar yang senyawa terdiri dari C6-C3-C6 dan sering ditemukan diberbagai macam tumbuhan dalam bentuk glikosida atau gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup

hidroksil fenolik. Flavonoid merupakan golongan metabolit sekunder yang disintesis dari asam piruvat melalui metabolisme asam amino. Flavonoid sering menjadi senyawa pereduksi yang baik yang menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzimatik maupun non enzimatik, sehingga flavonoid merupakan suatu antioksidan yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker. Flavonoid mencakup banyak pigmen yang paling umum dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan mulai dari fungus sampai angiospermae. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amoniak, sehingga flavonoid mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan (Rahman *et al.*, 2017).

- 2) Alkaloid : Suatu golongan senyawa yang tersebar luas. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan membentuk cincin heterosiklik. Alkaloid kebanyakan bersifat racun, tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan.
- 3) Triterpenoid dan Steroid : Berbagai macam aktivitas fisiologis yang menarik ditunjukkan oleh beberapa triterpenoid, dan senyawa ini merupakan komponen aktif dalam tumbuhan obat yang telah digunakan untuk mengobati penyakit termasuk diabetes, kerusakan hati, dan malaria. Beberapa senyawa mungkin mempunyai nilai ekologi bagi tumbuhan yang mengandungnya karena senyawa ini dapat bekerja sebagai insektisida atau antifungus (Saidi *et al.*, 2017).
- 4) Saponin : Merupakan senyawa aktif permukaan yang mudah terdeteksi melalui kemampuannya dalam membentuk busa. Komponen ikatan glikosida yang terdapat didalam saponin menyebabkan senyawa ini cenderung bersifat polar
- 5) Polifenol : Polifenol merupakan senyawa alami pada tumbuhan yang menyimpan berjuta manfaat untuk kesehatan. Jika dikonsumsi, zat ini berperan sebagai antioksidan yang mampu mengurangi angka kesakitan berbagai penyakit serius seperti kanker, diabetes, infeksi, hingga hipertensi.

## 2.11 Integrasi Keislaman

Laut memiliki banyak fungsi atau manfaat bagi kehidupan manusia dan makhluk hidup lainnya karena di dalam dan di atas laut terdapat kekayaan sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan di antaranya tempat rekreasi dan hiburan, tempat hidup sumber makanan, pembangkit listrik tenaga ombak, pasang surut, angin dan lain sebagainya, tempat barang tambang berada, sebagai jalur transportasi air, sebagai tempat cadangan air bumi. Dengan luasnya lautan yang besar ini, sudah sepantasnya manusia memaksimalkan air laut sebagai sumber energi alternatif. Tidak hanya air laut yang memberikan manfaat bagi kehidupan sebagai energi, melainkan air hujan juga memberikan manfaat bagi kehidupan.

Penelitian mengenai lautpun sejak dulu sudah gencar dilakukan, seperti fenomena di Selat Gibraltar yang menghubungkan Lautan Mediterania dan Samudera Atlantik, para ilmuwan menjelaskan, fenomena tersebut terjadi karena air laut dari Samudera Atlantik dan dari Laut Mediterania memiliki karakteristik yang berbeda, dilihat dari suhu air, kadar garam, dan kerapatannya. Fenomena ini sudah dijelaskan dalam Al-Quran surah ArRahman ayat 19-20 :

م رَجَ الْبَحْرَيْنِ يَلْتَقِيَانِ . بَيْنَهُمَا بَرْزَخٌ أَلَّا يَبْغِيَانِ

*“Dia membiarkan dua laut mengalir yang (kemudian) keduanya bertemu. Diantara keduanya ada batas yang tidak dilampaui masing-masing.”* (QS. Ar-Rahman: 19-20)

Penyebab kedua lautan tersebut tidak saling bercampur satu sama lain adalah, menurut Tantawi Jauhari yang menyebabkan kedua air laut yang bertemu mengalir berdampingan namun tidak saling bercampur satu sama lain dikarenakan adanya pembatas yang bersifat illahiyah. Sedangkan menurut Fakhr al-Din al-Razi adalah dikarenakan karakteristik dari air itu sendiri. Karakteristik air laut satu dengan lainnya tidaklah sama. Karakteristik itu meliputi salinitas (kadar garam), suhu, massa, densitas, dan sebagainya. Penelitian ilmiah memuktikan bahwa setiap laut memiliki kadar garam yang sama setiap saat. Tidak berkurang dan tidak bertambah tinggi. Meskipun ia bertemu dengan laut yang lain. Setiap laut juga memiliki massa air tertentu

yang tetap, tidak berkurang dan tidak bertambah, juga suhu dan warna pun tidak berubah.

## 2.12 Penelitian Terdahulu

Penelitian ini dilakukan berdasarkan acuan dan keterkaitan dengan penelitian sebelumnya. Berikut merupakan penelitian terdahulu yang dapat dijadikan acuan dalam penelitian ini :

**Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu**

No	Tahun	Nama Penulis	Judul Penelitian	Metode	Kesimpulan	Perbedaan dengan Peneliti
1	2016	Dewi Isnaeni dan Rahmawati	Isolasi Dan Karakterisasi Mikrobakteri Symbion Dari Spons <i>Callyspongia Vaginalis</i> dan Uji Daya Hambat Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella thypi</i>	Uji daya hambat dilakukan untuk mengetahui apakah mikrobakteri simbiospons yang diujikan mempunyai potensi sebagai bakteri antibiotik dengan langkah awal suspensi bakteri <i>Salmonella thypi</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> pada NaCl 0,9% fisiologis di ukur dengan standar <i>MAC Farlan.</i> menginokulasi bakteri patogen menggunakan swab steril dipulaskan kesemua permukaan cawan berisi medium MHA ( <i>Multon Hilton Agar</i> ) dan disk berisi spons diletakkan diatas permukaan, control (+) antibiotik klorafenicol control (-) disk kosong kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C	Hasil uji daya hambat mikrobakteri symbion hasil isolat dari spons <i>Callyspongia vaginalis</i> dapat menghambat <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella thypi</i> sebesar 8 mm, tetapi masih bersifat resisten bila dibandingkan disk chloramfenicol yang memiliki zona hambat 25 mm sebagai kontrol positif.	1. Langkah awal uji daya hambat dengan cara maserasi dan ekstraksi 2. inokulasi bakteri patogen menggunakan media <i>Zobell Marine Agar</i>

2	2018	Aditya P.Pasodung, Fitje Losung, Esther D.Angkouw	Uji Aktivitas Antibakteri Spons <i>Plakortis sp.</i> Yang Dikoleksi Dari Perairan Bunaken	Mengekstraksi spons dilakukan dengan maserasi terlebih dahulu menggunakan pelarut etanol (EtOH) sebanyak 250gram/botol selama 24jam selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas Whatman untuk mendapatkan ekstrak spons	Etanol digunakan karena mempunyai sifat yang selektif, ekonomis, dan mampu mengekstrak sebagian besar senyawa kimia yang terkandung dalam sampel. Setelah dievaporasi diperoleh berat ekstrak kasar spons sebanyak 8,4299gram	1. Pada proses maserasi menggunakan larutan metanol
3	2016	Agus Trianto dkk	Skrining Aktivitas Antibakteri Dan Identifikasi Sponge Dari Teluk Kupang	Uji aktivitas antibakteri dilakukan dalam media Zobell padat selama 2x24 jam. Uji antibakteri pada 11 sampel ekstrak kasar sponge terhadap bakteri <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i> pada konsentrasi 500 µg/disk, 250 µg/disk, 100 µg/disk, dan 50 µg/disk. Ekstrak yang diaplikasikan sebanyak 10 µl/disk. Pengukuran zona hambat pada 24 jam	Bakteri uji yang digunakan yaitu bakteri <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i> yang dikultur dalam media Zobell 2216E dalam media miring	1. Bakteri uji yang digunakan yaitu <i>Vibrio harveyi</i> 2. Kultur bakteri menggunakan <i>zobell marine agar</i>

UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A



4	2017	Aditya Cahya Nugraha, dkk	Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid sebagai Antibakteri dari Daun Mangga	Ekstrak etanol dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator. Selanjutnya dilakukan uji skrining fitokimia diantaranya uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid. Ekstrak etanol dilakukan isolasi menggunakan pelarut aquades dan etil asetat, kemudian dikocok hingga homogen. Didiamkan hingga terbentuk dua fase, fase etil asetat kemudian diambil dan dipekatkan menggunakan rotary vacuum evaporator	Sampel dikatakan mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri apabila terjadi daerah bening disekitar paper disc akibat pengaruh senyawa bioaktif sampel. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan isolat flavonoid yang lebih kuat dalam menghambat bakteri Gram negatif ( <i>Eschericia coli</i> ) dibandingkan dengan bakteri Gram positif ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) disebabkan adanya perbedaan struktur dinding sel kedua jenis bakteri tersebut (Nugraha dkk, 2017)	1. Menggunakan ekstrak metanol 2. Ekstrak metanol yang sudah di rotary vacuum langsung di uji daya hambat dan tidak dilakukan uji fitokimia
---	------	---------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

5	2017	Andhika Dwi Aristyawan, dkk	Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons <i>Agelas cavernosa</i>	Dalam penentuan konsentrasi hambat minimum menggunakan modifikasi metode mikrodilusi dengan cara sebanyak 50 $\mu$ L larutan uji dengan konsentrasi berurutan dari besar ke kecil dimasukkan ke dalam sumuran pertama hingga delapan. Pada sumuran sembilan ditambahkan 50 $\mu$ L larutan kontrol positif, sumuran berikutnya dimasukkan 50 $\mu$ L larutan kontrol negatif, dan sumuran sebelas dimasukkan 50 $\mu$ L media dan pada sumuran kedua belas dimasukkan 100 $\mu$ L media sebagai kontrol media. Selanjutnya pada masing masing sumuran ditambahkan 50 $\mu$ L suspensi bakteri uji. Microplate diinkubasi pada suhu 37°C selama sekitar 24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri	Apabila pada lubang plate terjadi kekeruhan dan disertai dengan perubahan warna menjadi merah setelah penambahan pereaksi warna INT maka menandakan adanya pertumbuhan bakteri (Aristyawan dkk, 2017).	1. Penentuan konsentrasi hambat menggunakan uji difusi cakram
---	------	-----------------------------	-----------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------

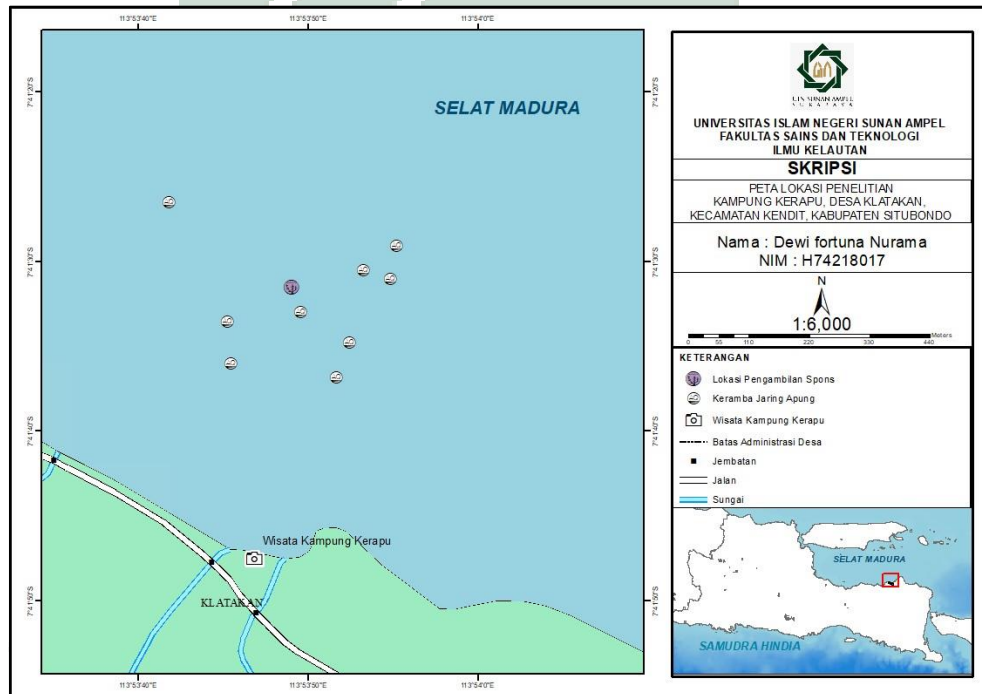
6.	2018	Sri Hariati, dkk	Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kapang Laut <i>Nodulisporium Sp. Kt29</i> Terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	Metode yang digunakan yaitu kultivasi kapang yang terdiri dari dua tahap yaitu prekultur dan kultur massal. Prekultur bertujuan agar kapang dapat beradaptasi terhadap media pertumbuhan, dilakukan dengan cara memindahkan isolat kapang ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 100 mL media potato dextrose broth (PDB) dan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu ruang	Hasil pengamatan menggunakan SEM menunjukkan adanya perbedaan pada sel <i>V. harveyi</i> perlakuan kontrol dibandingkan dengan perlakuan yang diberi ekstrak <i>Nodulisporium sp. KT29</i> . Sel <i>V. harveyi</i> pada perlakuan yang diberi ekstrak <i>Nodulisporium sp. KT29</i> pada pengamatan SEM menunjukkan adanya kerusakan sel.	Uji yang digunakan menggunakan metode kultivasi kapang sedangkan uji yang saya gunakan menggunakan uji antagonis
----	------	------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini berlokasi di Perairan Kendit yang berada di Wisata Kampung Kerapu, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur. Lokasi pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling* yaitu penentuan stasiun secara tidak acak dengan berdasarkan pertimbangan dan informasi yang didapat oleh peneliti. Stasiun lokasi yang dipilih dalam pengambilan data sampel peneliti yaitu merupakan daerah yang terdapat spons spesies *Callispongia vaginalis*.

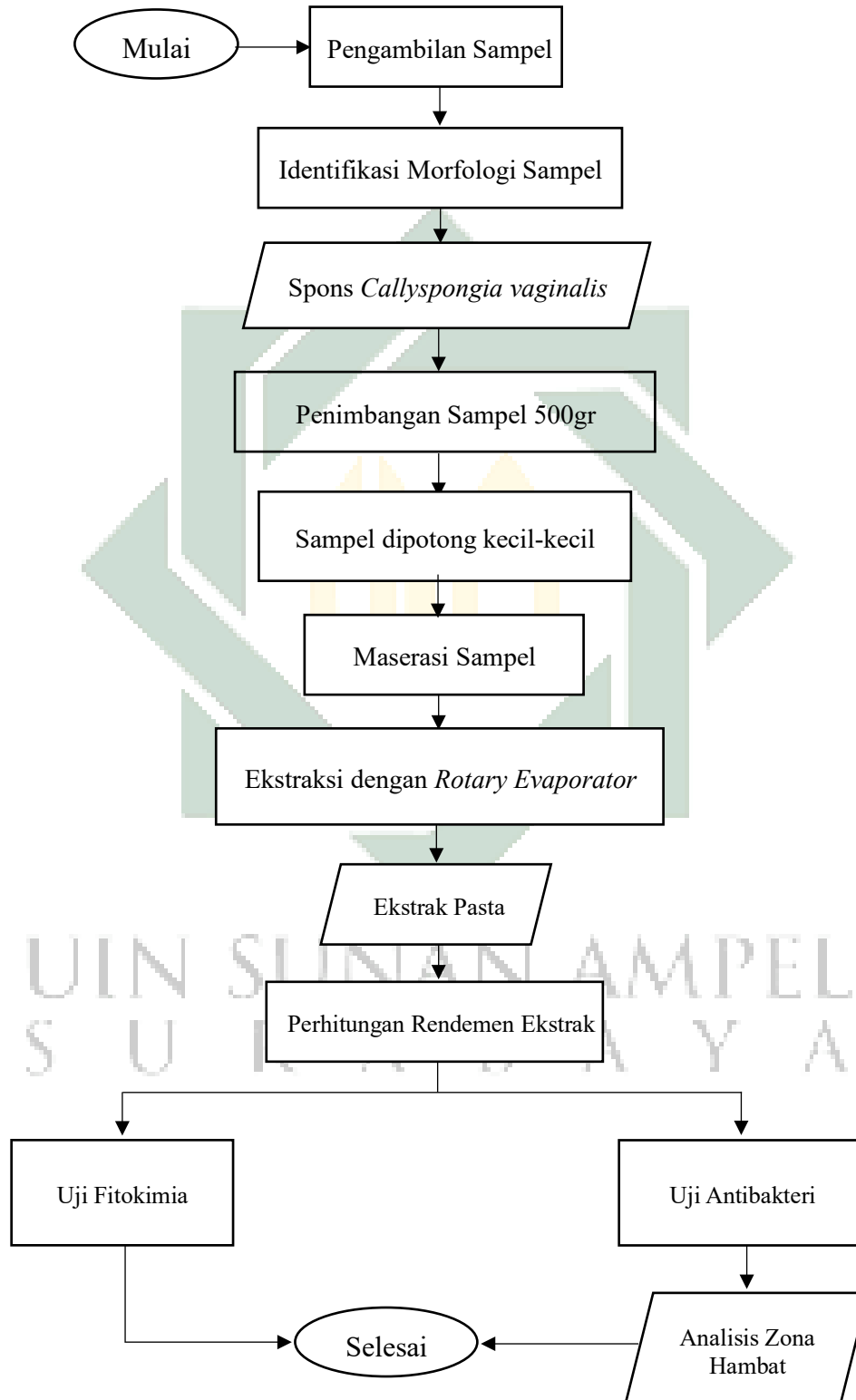


Gambar 3. 1 Lokasi Peta Penelitian

### 3.2 Tahapan Penelitian

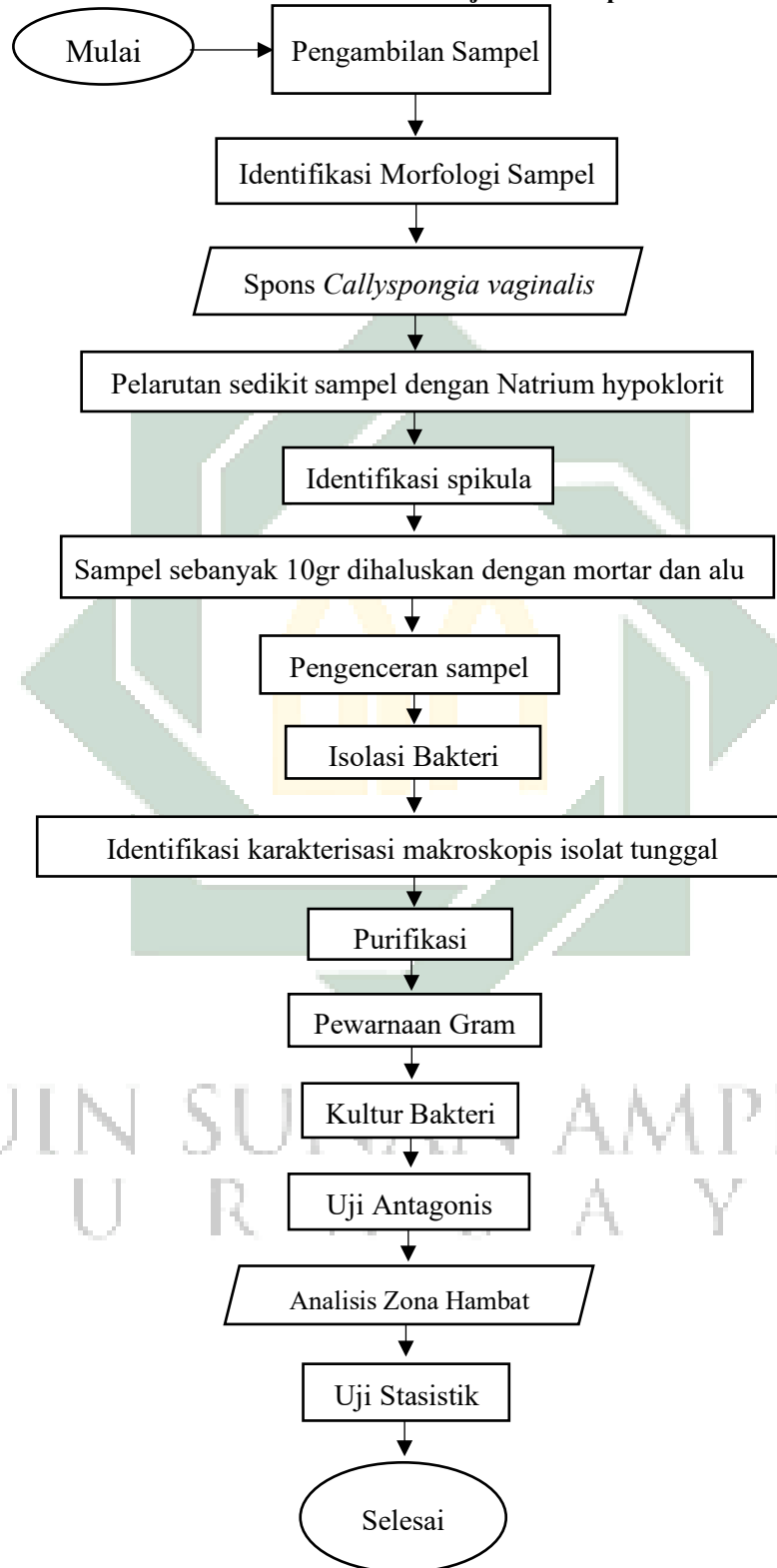
#### a) Penapisan bakteri simbiosis spons *Callyspongia vaginalis* terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*

Gambar 3. 2 Flow Chart Tahap Penapisan



b) Uji antibakteri ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* sebagai antibakteri *Vibrio harveyi*

Gambar 3. 3 Flow Chart Uji Ekstrak Spons



### 3.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel lain atau menjadi sebab atau berubahnya variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak Spons *Callyspongia vaginalis* dan bakteri simbion .
2. Variable terikat merupakan variabel yang dapat berubah karena pengaruh variabel bebas, variabel terikat pada penelitian ini yaitu daya hambat bakteri patogen *Vibrio harveyi*.

### 3.4 Tahap Persiapan dan Pelaksanaan

Tahapan ini terdiri dari survey pendahuluan, persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian, sterilisasi alat, pembuatan media, pengambilan sampel dan pengenceran sampel. **a. Alat dan Bahan**

**Tabel 3. 1 Alat Tahap Persiapan dan Pelaksanaan**

No	Nama Alat	Fungsi
1.	Cawan Petri	Untuk tempat pembuatan media
2.	Tabung Reaksi	Untuk tempat pembuatan media miring
3.	<i>Autoclaf</i>	Untuk sterilisasi alat dan media dengan pemanasan basah
4.	Spreader	Untuk menyebarkan cairan dipermukaan media agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata
5.	Erlenmeyer	Untuk menampung larutan, bahan atau cairan
6.	Gelas ukur	Untuk mengukur volume larutan
7.	Mortar dan alu	Untuk menghancurkan atau menghaluskan suatu bahan atau zat yang masih bersifat padat atau kristal
8.	Neraca Analitik	Untuk menimbang berat sampel
9.	Hot Plate	Memanaskan media dan larutan
10.	<i>Magnetic Stirer</i>	Menghomogenkan larutan pada tabung Erlenmeyer
11.	Sarung Tangan	Pengambilan sampel
12.	<i>Fin dan Snorkle</i>	Pengambilan Sampel
13.	Plastic Ziplock	Penyimpanan Sampel
14.	<i>Coolbox</i>	Menjaga Sampel agar tidak rusak.
15.	Gunting	Untuk memotong Sampel spons
16.	Tabung Reaksi	Sebagai tempat pembuatan media cair
17.	<i>Vortex Mixer</i>	Menghomogenkan larutan
18.	Tabung Test	Wadah untuk identifikasi spikula
19.	Mikroskop	Untuk mengamati spikula spons
20.	Preparat	Tempat menaruh sampel uji pada mikroskop



**Tabel 3. 2 Bahan Tahap Persiapan dan Pelaksanaan**

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	<i>Zobell Marine Agar</i>	Untuk membuat media padat
2.	Air Laut Steril	- Campuran pembuatan media padat - Pengenceran sampel - Mensterilkan sampel uji agar tidak terkontaminasi
3.	Aquadest	Menghilangkan kristal bleach

### **b. Prosedur Kerja**

Tahap persiapan dan pelaksanaan dalam penelitian ini terdiri dari :

#### 1) Survei Pendahuluan :

Dilakukan dengan menyerahkan surat perizinan penelitian (Lampiran 2), serta melihat kondisi lapangan (Lampiran 1) pada lokasi penelitian.

#### 2) Sterilisasi Alat:

- Disiapkan alat yang akan disterilkan
- Dibungkus alat berbahan kaca menggunakan kertas buram dan dilapisi dengan plastic ziplock
- Disterilkan alat berbahan kaca menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C selama 35 menit
- Disterilkan alat berbahan logam dengan cara pemijaran diatas api bunsen

#### 3) Pembuatan media

- Disiapkan 6 cawan petri untuk pembuatan media
- Ditimbang media *Zobell marine agar* sebanyak 8,28 gram
- Disiapkan air laut steril sebanyak 150 ml
- Disiapkan 6 cawan petri
- Dimasukkan air laut steril dan media *Zobell marine agar* kedalam erlenmeyer
- Diletakkan erlenmeyer berisi media di atas hotplate hingga homogen dan mendidih
- Disterilkan larutan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit
- Dituang media kedalam cawan petri dalam kondisi hangat kukuh

### 3) Pengambilan Sampel

- Diambil spons pada titik koordinat 7°41'31.5"S 113°53'49.0"E.
- Diambil sampel spons dengan cara snorkling (Lampiran 3) dengan bantuan alat potong gunting
- Disemprot sampel spons menggunakan air laut steril

### 4) Identifikasi Sampel

Diverifikasi morfologi spons melalui laman [www.spongeguide.uncw.edu](http://www.spongeguide.uncw.edu) dengan membandingkan hasil dokumentasi terhadap portal identifikasi spons pada laman web tersebut.

### 5) Identifikasi Spikula

- Diambil sedikit potongan sampel spons
- Dilarutkan menggunakan Natrium hypoklorit dalam tabung test
- Dibilas menggunakan aquadest untuk menghilangkan kristal bleach
- Ditaruh potongan spons pada preparat
- Diamati dengan perbesaran 1000x

### 6) Pengenceran Sampel

Menurut Olsvik *et al.*, (1991) untuk mendapatkan sampel koloni bakteri baik maka dilakukan pengenceran terhadap suspensi sampel bakteri dengan menggunakan teknik pengenceran bertingkat hingga  $10^{-10}$ . Tahap pengenceran sampel terdiri dari :

- Dihaluskan sampel menggunakan mortar dan alu sebanyak 10gr
- Disiapkan tabung reaksi berisi 9ml air laut steril
- Diambil sampel sebanyak 1gr untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi air laut steril
- Dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* - Diulangi langkah hingga pengenceran  $10^{-10}$

### 3.5 Penapisan Bakteri Simbion Spons *Callyspongia Vaginalis* terhadap Bakteri Patogen *Vibrio harveyi*

Penapisan antibakteri bertujuan untuk melihat isolat mana yang berpotensi dalam menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio harveyi* menggunakan uji difusi cakram, dapat dikatakan bakteri bakteri simbion tersebut memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen apabila terbentuk zona hambat di sekitar isolat bakteri bakteri simbion spons *Callyspongia vaginalis*.

#### a. Alat dan Bahan

**Tabel 3. 3 Alat Metode Penapisan Aktivitas Antibakteri**

No	Nama Alat	Fungsi
1.	Cawan Petri	Untuk tempat pembuatan media
2.	Lemari Inkubasi	Menumbuhkan mikroorganismenya
3.	<i>Spreader</i>	Untuk meratakan
4.	Bunsen	Untuk sterilisasi alat berbahan dasar kaca
5.	Pipet Tetes	Memindahkan cairan dengan volume kecil
6.	Jarum Ose	Menginokulasi mikroba dari suatu media ke media lainnya
7.	Tabung Reaksi	Tempat pembuatan media miring
8.	Kapas Steril	Sebagai tutup tabung reaksi agar tidak terkontaminasi
9.	<i>Vortex mixer</i>	Untuk menghomogenkan larutan
10.	Kertas Cakram	Menguji aktivitas antimikroba
11.	Jangka Sorong	Untuk mengukur zona hambat
12.	Penjepit Pinset	Untuk mengambil kertas cakram agar tetap steril

**Tabel 3. 4 Bahan Metode Penapisan Aktivitas Antibakteri**

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	<i>Zobell Marine Agar</i>	Media padat untuk suspensi bakteri patogen
2.	<i>Vibrio harveyi</i>	Bakteri patogen
3.	Larutan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	Campuran pembuatan standar kekeruhan <i>Mc.Farland</i>
4.	Larutan BaCL 1%	Campuran pembuatan standar kekeruhan <i>Mc.Farland</i>

## b. Prosedur Kerja

Tahapan dalam metode penapisan antibakteri ini terdiri dari :

### 1) Isolasi Bakteri

- Disiapkan 6 cawan petri berisi media *Zobell marine agar*
- Disiapkan hasil pengenceran bertingkat  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$
- Diambil sebanyak 1ml dari tiap pengenceran untuk ditanam pada media *Zobell marine agar*
- Diratakan menggunakan spreader
- Dilakukan 2x perulangan pada tiap pengenceran
- Diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  pada lemari inkubasi selama 2x24 jam 2)

### Karakterisasi Isolat Tunggal

Diamati koloni bakteri yang tumbuh untuk dikarakterisasi berdasarkan karakteristik morfologi dari hasil isolasi. Karakteristik morfologi yang diamati meliputi warna, elevasi, ukuran dan tepian koloni bakteri

### 3) Purifikasi

Metode permunian yang digunakan adalah cawan gores, metode ini digunakan untuk memisahkan hasil inokulasi yang terdiri dari banyak koloni berlainan jenis sehingga didapat koloni murni pada setiap petri (Rahayuningtyas *et al.*, 2017). Koloni bakteri yang diambil untuk dimurnikan adalah koloni yang dominan dengan cara sebagai berikut : -

Disiapkan tabung reaksi berisi media *Zobell marine agar*

- Diambil isolat yang akan dimurnikan pada cawan petri dengan jarum ose
- Digoreskan isolat pada media miring dengan metode zigzag
- Ditutup tabung reaksi menggunakan kapas steril

### 4) Pewarnaan Gram

Isolat bakteri yang berhasil dipurifikasi dilakukan uji pewarnaan gram, menurut Rahmawati (2016) langkah pada teknik ini yaitu :

- Diambil segores isolat bakteri spon spon menggunakan jarum ose
- Diletakkan pada object glass
- Ditetaskan kristal violet sebanyak 2-3 tetes
- Didiamkan selama 60 detik
- Dibilas preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan

- Diteteskan larutan lugol sebanyak 2-3 tetes diatas preparat
- Didiamkan selama 60 detik
- Dibilas preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan
- Ditetesi preparat dengan larutan alkohol sebanyak 2-3 tetes
- Didiamkan selama 60 detik
- Dibilas preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan
- Ditetesi preparat dengan larutan safranin sebanyak 2-3 tetes
- Dibilas preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan
- Diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x

#### 5) Kultur Bakteri

Setelah tahap purifikasi dilakukan maka perlu dilakukan kultur bakteri sebagai peremajaan bakteri pada media padat menggunakan metode cawan gores dengan bantuan jarum ose.

#### 6) Pembuatan Standar *Mc.Farland* 0,5

Pembuatan standar *Mc.Farland* 0,5 menurut Ariami (2017) sebagai berikut :

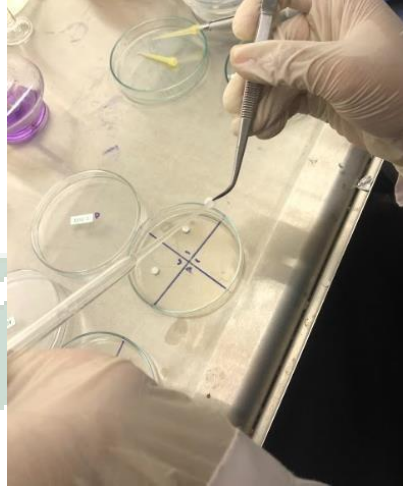
- Disiapkan wadah berbahan kaca yang sudah disterilkan
- Disiapkan larutan BaCL 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%
- Diambil larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebanyak 9,95ml untuk dimasukkan kedalam wadah
- Diambil larutan BaCL 1% sebanyak 0,05ml untuk dicampur dengan larutan sebelumnya di dalam wadah

#### 7) Uji Antagonis

Uji antagonis dilakukan dengan metode difusi cakram antara bakteri simbiosis dengan bakteri patogen Radjasa *et.al.* (2007) dengan prosedur sebagai berikut :

- Disiapkan tabung reaksi berisi 5ml air laut steril
- Diambil tiap isolat bakteri yang telah dipurifikasi untuk disuspensikan pada 5ml air laut steril
- Dihomogenkan menggunakan vortex mixer
- Diinkubasi selama 24jam
- Disamakan standar kekeruhannya dengan larutan *Mc.Farland* 0,5

- Diambil sebanyak 50  $\mu$ L isolat bakteri yang telah tersuspensi
- Diteteskan pada kertas cakram
- Diletakkan kertas cakram pada media yang telah tersuspensi oleh bakteri patogen
- Diinkubasi selama 24jam dan 48jam



**Gambar 3. 4 Uji Difusi Cakram (dokumentasi peneliti)**

#### 8) Analisis Zona Hambat

- Diamati pada pengamatan 24 jam dan 48 jam
- Dicatat besar zona bening yang terbentuk dengan cara lebar zona bening dikurangi besarnya kertas cakram (6mm)
- Dihitung rata-rata dari 3 perulangan dan standar deviasinya menggunakan rumus excel AVERAGE dan STDEV
- Dikatagorikan zona hambat berdasarkan kekuatan daya antibakterinya berdasar (Davis & Stout, 1971) :
  1. Diameter zona hambat 10-20mm : Daya hambat kuat
  2. Diameter zona hambat 5-10mm : Daya hambat sedang
  3. Diameter zona hambat 0-5mm : Daya hambat lemah

### 3.6 Efektivitas Antibakteri Spons *Callyspongia vaginalis* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi*

Ekstraksi dikenal sebagai pemisahan bagian aktif dari jaringan sampel dengan penggunaan pelarut yang selektif dalam standar yang sesuai dengan prosedur ekstraksi. Menurut Novita (2016) metode maserasi basah dipilih untuk menghindari kerusakan komponen ekstrak sampel yang belum diketahui kandungan senyawanya yang memiliki kemungkinan bersifat tidak tahan panas.

#### a. Alat dan Bahan

**Tabel 3. 5 Alat Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Spons**

No	Nama Alat	Fungsi
1.	Erlemenyer	Sebagai wadah maserasi
2.	Corong	Alat bantu untuk menuangkan cairan dari suatu tempat ke tempat lainnya
3.	Kertas Saring	Untuk menyaring larutan
4.	Gunting	Untuk menggunting sampel
5.	Jarum Ose	Menginokulasi mikrobia dari suatu media ke media lainnya.
6.	<i>Rotary Evaporator</i>	Untuk mendapatkan ekstrak pasta hasil maserasi
7.	Tabung Reaksi	Tempat pembuatan media
8.	Bunsen	Digunakan untuk pemanasan, sterilisasi, dan pembakaran
9.	Lemari inkubasi	Menyimpan sampel dan menumbuhkan bakteri
10.	Pipet tetes	Mengambil larutan dalam skala kecil
11.	Kertas cakram	Untuk menguji aktivitas antimikroba
12.	Cawan petri	Untuk menumbuhkan media
13.	Penjepit pinset	Untuk mengambil kertas cakram dan menaruh pada media
14.	Jangka sorong	Untuk mengatur zona hambat

**Tabel 3. 6 Bahan Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Spons**

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	<i>Vibrio harveyi</i>	Bakteri patogen
2.	Metanol 96%	- Pelarut maserasi - Kontrol negatif
3.	Media <i>Zobell marine agar</i>	Media padat untuk suspensi bakteri patogen
4.	<i>Chloramfenicol</i>	Kontrol positif

## b. Prosedur Kerja

### 1) Maserasi

Pada tahap ini pelarut yang digunakan yaitu metanol, karena menurut (Astarina *et al.*, 2013), metanol dapat menarik senyawa flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid yang juga didasarkan pada hasil penelitian terdahulu oleh (Mayang Puspita Krisyuninda & Aunurohim, 2007) menyatakan bahwa dalam ekstrak spons laut *Callyspongia sp.* terdapat senyawa steroid, alkaloid, flavonoid dan terpenoid.

- Ditimbang spons sebanyak 500 gram
- Dipotong kecil-kecil sampel spons
- Diletakkan kedalam wadah
- Direndam menggunakan pelarut metanol 96% dalam waktu 24jam
- Disaring hasil rendaman tiap 1x24 jam
- Direndam kembali menggunakan pelarut
- Disaring kembali hasil rendaman hingga 3x24 jam

### 2) Ekstraksi

- Dimasukkan larutan hasil maserasi kedalam labu *Rotary evaporator*
- Dirotari hasil maserasi
- Didapatkan ekstrak pasta hasil rotari
- Ditimbang hasil ekstrak pasta yang diperoleh
- Dihitung rendemen ekstrak menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat bahan baku}} \times 100\%$$

(Putu Puspadi Aristyanti *et al.*, 2017)

### 3) Perhitungan konsentrasi

- Digunakan konsentrasi sebesar 10%, 20%, 40%, 60%, dan 80%
- Dihitung tiap konsentrasi menggunakan rumus  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$
- Dicampurkan ekstrak dan metanol sesuai dengan perbandingan perhitungan konsentrasi



#### 4) Uji Antibakteri Ekstrak Spons

Metode yang digunakan pada uji ini yaitu difusi cakram, metode ini digunakan karena merupakan metode yang sering digunakan (Verdiana *et al.*, 2018). Prosedur tahapan uji ini yaitu :

- Disiapkan media *Zobell marine agar* yang telah tersuspensi oleh bakteri patogen *Vibrio harveyi*
- Disiapkan tabung reaksi berisi 5 konsentrasi ekstrak
- Disiapkan metanol untuk kontrol negatif (-) dan kloramfenikol sebagai kontrol positif (+)
- Diambil sebanyak 20  $\mu$ L tiap konsentrasi
- Diteteskan pada kertas cakram
- Diletakkan kertas cakram pada media yang telah tersuspensi oleh bakteri patogen
- Diambil sebanyak 20  $\mu$ L tiap kontrol positif dan negatif
- Diteteskan pada kertas cakram
- Diletakkan kertas cakram pada media yang telah tersuspensi oleh bakteri patogen
- Diambil kertas cakram
- Diletakkan kertas cakram pada media yang telah tersuspensi oleh bakteri patogen sebagai kontrol netral
- Diinkubasi selama 24jam dan 48jam

#### 5) Analisis zona hambat

- Diamati pada pengamatan 24 jam dan 48 jam
- Dicatat besar zona bening yang terbentuk dengan cara lebar zona bening dikurangi besarnya kertas cakram (6mm)
- Dihitung rata-rata dari 3 perulangan dan standar deviasinya menggunakan rumus excel AVERAGE dan STDEV
- Dikatagorikan zona hambat berdasarkan kekuatan daya antibakterinya berdasar (Davis & Stout, 1971) :
  1. Diameter zona hambat 10-20mm : Daya hambat kuat
  2. Diameter zona hambat 5-10mm : Daya hambat sedang
  3. Diameter zona hambat 0-5mm : Daya hambat lemah

### 6) Uji statistik

Setelah melewati uji normalitas dan uji homogenitas, uji analisis statistik digunakan untuk data diameter zona hambat menggunakan uji One Way Anova. Apabila prasyarat tersebut tidak terpenuhi maka dilanjutkan menggunakan Uji Kruskal Wallis. Sedangkan apabila data tersebut dikatakan normal dan homogen maka dapat dilanjutkan Uji One Way ANOVA dengan dasar pengambilan keputusan :

1. Nilai  $P < 0,05$  maka  $H_0$  ditolak, terdapat perbedaan antar perlakuan
2. Nilai  $P > 0,05$  maka  $H_0$  diterima, tidak terdapat perbedaan antar perlakuan

### 3.7 Skrining Fitokimia Ekstrak Spons *Callyspongia vaginalis*

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang terdapat didalamnya yang bisa dimanfaatkan dalam bidang farmakologi sebagai antibakteri (Rahman *et al.*, 2017). Uji fitokimia terbagi menjadi alkaloid, triterpenoid dan steroid, saponin, fenol, dan flavonoid. a.

#### Alat dan Bahan

Tabel 3. 7 Alat Uji Fitokimia

No	Nama Alat	Fungsi
1.	Tabung Reaksi	Sebagai tempat uji
2.	Pipet tetes	Mengambil larutan dalam skala kecil
3.	Rak Tabung Reaksi	Sebagai alat bantu menaruh tabung reaksi
4.	Cawan Porselin	Menguapkan bahan
5.	Bunsen	Untuk pemanasan dan pembakaran

Tabel 3. 8 Bahan Uji Fitokimia

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	Larutan $FeCl_3$ 1%	Pereaksi uji Polifenol
2.	Larutan $H_2O$	Pereaksi uji Sponin
3.	Larutan <i>Liebermann-Burchad</i>	Pereaksi uji Triterpenoid dan Steroid
4.	Larutan <i>Dragendorff</i>	Pereaksi uji Alkaloid
5.	Larutan HCL 0,1 N	Pereaksi uji Alkaloid
6.	Larutan NaOH 10%	Pereaksi uji Flavonoid

## b. Prosedur Kerja

Prosedur kerja uji fitokimia menurut (Mayang Puspita Krisyuninda & Aunurohim, 2007) adalah sebagai berikut : a) Flavoloid

- Disiapkan tabung berisi 0,5mg ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diberi pereaksi NaOH 10% beberapa tetes pada tabung berisi ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diamati apakah terdapat perubahan menjadi berwarna coklat

### b) Alkaloid

- Disiapkan tabung berisi 0,5mg ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diberi air secukupnya pada cawan porselin
- Dididihkan air pada cawan porselin diatas bunsen
- Diuapkan ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* pada tabung diatas cawan porselin yang mendidih hingga mendapatkan residu
- Dilarutkan residu dengan beberapa tetes pereaksi *Dragendorff* + HCL 0,1 N
- Diamati apakah terdapat perubahan terbentuknya endapan merah

### c) Triterpenoid dan Steroid

- Disiapkan tabung berisi 0,5gr ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diberi pereaksi *Liebermann-Burchad* beberapa tetes pada tabung berisi ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diamati apakah terdapat perubahan menjadi berwarna ungu- merah-coklat

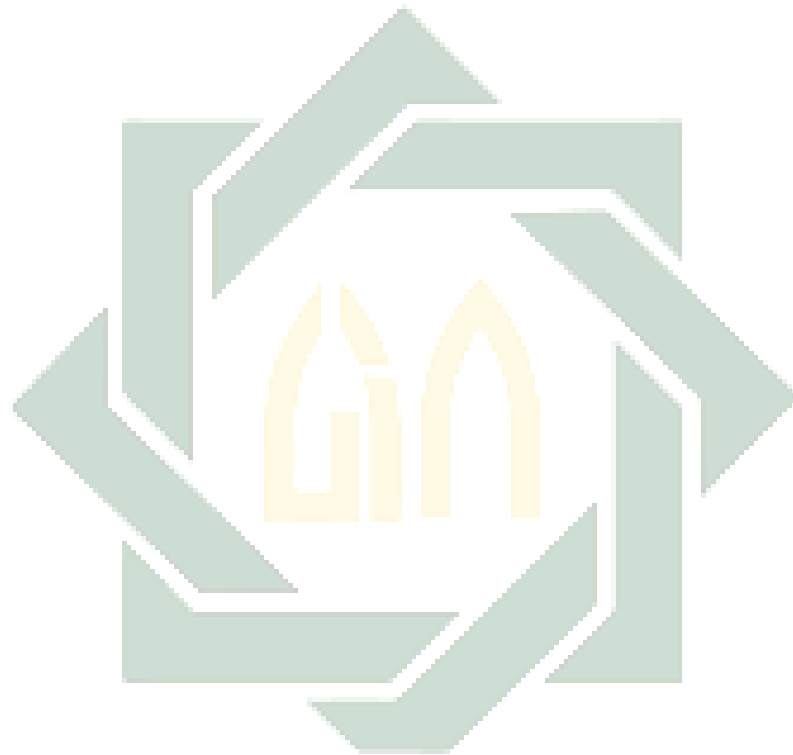
### d) Saponin

- Disiapkan tabung berisi 0,5mg ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diberi pereaksi H<sub>2</sub>O 10 mL pada tabung berisi ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Dikocok sampel selama 30 detik
- Diamati apakah terbentuk busa yang tidak hilang selama 30 detik sebagai indikasi adanya saponin

### e) Polifenol

- Disiapkan tabung berisi 0,5mg ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*

- Diberi pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1% beberapa tetes pada tabung berisi ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*
- Diamati apakah terdapat perubahan menjadi berwarna ungu, biru, atau hitam yang kuat.



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Penapisan Bakteri simbiosis Spons *Callyspongia vaginalis* sebagai antibakteri *Vibrio harveyi*

##### 4.1.1 Hasil Identifikasi Spons dan Karakterisasi Isolat Tunggal

Perbandingan hasil dokumentasi (Gambar 4.1) terhadap portal identifikasi spons pada laman [www.spongeguide.uncw.edu](http://www.spongeguide.uncw.edu), spons spesies ini yang memiliki ciri-ciri berwarna abu-abu dan berbentuk tabung elastis berongga, menunjukkan spons ini terverifikasi masuk ke dalam ordo Callyspongia kelas Demospongia, spesies *Callyspongia vaginalis*. Pengujian spikula di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x didapatkan hasil bahwa spons *Callyspongia vaginalis* memiliki spikula berbentuk Calcareous yang dapat dilihat pada Lampiran.



Gambar 4. 1 Sampel Spons *Callyspongia vaginalis* (Sumber : Dokumentasi peneliti)

Berdasarkan identifikasi morfologi koloni tunggal didominasi oleh bentuk bulat sebanyak 5 isolat, pinggiran berserabut 2 isolat, lonjong 1 isolat dan warna koloni dominan putih susu yang tersaji pada tabel 4.1

**Tabel 4. 1 Hasil Karakterisasi Isolat Tunggal Spons *Callyspongia vaginalis***

Kode Isolat	Warna	Bentuk Koloni	Elevasi	Tepi Koloni
BA.CV01	Putih susu	Bulat	Timbul	Bergigi
BA.CV02	Putih susu	Bulat	Timbul	Halus
BA.CV03	Kuning	Bulat	Timbul	Halus
BA.CV04	Kuning	Berserabut	Timbul	Bergigi
BA.CV05	Putih Susu	Bulat	Timbul	Berserabut
BA.CV06	Kuning	Berserabut	Datar	Berserabut
BA.CV07	Putih Susu	Lonjong	Datar	Berombak
BA.CV08	Putih Susu	Bulat	Timbul	Halus

#### 4.1.2 Hasil Pewarnaan Gram

**Tabel 4. 2 Hasil Pewarnaan Gram**

Kode Isolat	Bentuk	Jenis Gram
BA.CV01	Basilus	Negatif
BA.CV02	Coccus	Negatif
BA.CV03	Batang	Negatif
BA.CV04	Batang	Negatif
BA.CV05	Batang	Negatif
BA.CV06	Basilus	Negatif
BA.CV07	Batang	Negatif
BA.CV08	Basilus	Negatif

Berdasar hasil uji pewarnaan gram terhadap seluruh isolat didapatkan bahwa seluruh bakteri simbiosis spons *Callyspongia vaginalis* termasuk ke dalam bakteri gram negatif (-). Hal ini sesuai dengan Marzuki *et.al.*(2014) yang menyatakan bahwa bakteri simbiosis spesies *Callyspongia sp* dalam penelitiannya termasuk ke dalam bakteri gram negatif, dan menunjukkan bahwa bakteri laut 95% memiliki sifat gram negatif.

#### 4.1.3 Hasil Uji Antagonis Bakteri Simbiosis Spons *Callyspongia Vaginalis*

Pengujian aktivitas antibakteri dari setiap isolat dengan perulangan 1 (P1) hingga perulangan 3 (P3) tersaji pada Tabel 4.3 dan Tabel 4.4.

**Tabel 4. 3 Hasil Pengamatan 24 jam Uji Antagonis**

Kode Isolat	P1 (mm)	P2 (mm)	P3 (mm)	Rata-rata $\pm$ SD (mm)	Kriteria Hambatan (Davis & Stout, 1971)
BA.CV01	1	1	1,1	1,03 $\pm$ 0,05	Lemah
BA.CV02	0,5	0,6	0,7	0,6 $\pm$ 0,1	Lemah
BA.CV03	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0	Tidak Ada
BA.CV04	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0	Tidak Ada
BA.CV05	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0	Tidak Ada
BA.CV06	0,6	0,7	1	0,76 $\pm$ 0,20	Lemah
BA.CV07	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0	Tidak Ada
BA.CV08	1,2	1,3	1,2	1,23 $\pm$ 0,05	Lemah

**Tabel 4. 4 Hasil Pengamatan 48 jam Uji Antagonis**

Kode Isolat	P1 (mm)	P2 (mm)	P3 (mm)	Rata-rata ± SD (mm)	Kriteria Hambatan (Davis & Stout, 1971)
BA.CV01	1,3	1,3	1,5	1,36 ± 0,11	Lemah
BA.CV02	0,5	0,6	0,7	0,63 ± 0,11	Lemah
BA.CV03	0	0	0	0,0 ± 0,0	Tidak Ada
BA.CV04	0	0	0	0,0 ± 0,0	Tidak Ada
BA.CV05	0	0	0	0,0 ± 0,0	Tidak Ada
BA.CV06	0,6	0,7	1	1,03 ± 0,32	Lemah
BA.CV07	0	0	0	0,0 ± 0,0	Tidak Ada
BA.CV08	1,2	1,3	1,2	1,43 ± 0,057	Lemah

Berdasarkan hasil Tabel 4.3 dan Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa dari pengujian 8 isolat, hanya terdapat 4 isolat aktif yang membentuk zona hambat yang mengindikasikan adanya aktivitas terhadap antibakteri, sedangkan 4 isolat lainnya dengan kode isolat BA.CV03, BA.CV04, BA.CV05, BA.CV07 menunjukkan tidak adanya zona hambat yang terbentuk yang menunjukkan tidak ada kepekaan mikroba terhadap isolat bakteri simbion spons *Callyspongia vaginalis*. Keempat isolat aktif menunjukkan memiliki kriteria daya hambat lemah dalam menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri uji, hal ini sesuai dengan Davis & Stout (1971), kriteria kekuatan antibakteri berdasarkan diameter zona hambat yaitu lemah (0-5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm).

Hasil pengukuran pada pengamatan 48 jam menunjukkan adanya kenaikan zona hambat pada tiap isolat aktif, hal ini menunjukkan bahwa keempat isolat aktif memiliki sifat bakterisidal. Sampel dapat dikatakan bakterisidal karena dapat mencegah pertumbuhan hal ini sesuai dengan pernyataan (Trisia et al., 2018).

Penghambatan pertumbuhan bakteri uji dapat terjadi dikarenakan beberapa faktor, menurut WHO faktor teknis yang dapat mempengaruhi diameter daya hambat pada metode difusi cakram antara lain kepekatan inokulum, waktu pemasangan cakram, suhu inkubasi, ketebalan media agar.

Kemampuan suatu isolat bakteri simbion dalam menghambat lebih dari satu jenis bakteri uji dapat terjadi karena isolat

bakteri bakteri simbion tersebut mampu menghasilkan suatu senyawa bioaktif yang memiliki kemampuan dalam menghambat beberapa jenis bakteri. Isolat bakteri bakteri simbion yang hanya mampu menghambat satu jenis bakteri uji hal tersebut dapat terjadi karena senyawa bioaktif yang dihasilkan isolat bakteri tersebut hanya mampu menghambat satu jenis bakteri saja. Antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri memiliki sifat selektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain, hal tersebut memungkinkan suatu bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain, namun bakteri tersebut tidak dapat menghambat pertumbuhan dari jenis bakteri yang lainnya (Pringgenies & Dananjoyo, 2012).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi diameter zona hambat bakteri, yang pertama yaitu kekeruhan suspensi bakteri, apabila suspensi kurang keruh maka diameter zona hambat akan lebih besar, dan sebaliknya jika suspensi lebih keruh maka diameter zona hambat akan semakin kecil. Temperatur inkubasi menjadi faktor kedua yang mempengaruhi diameter zona hambat pertumbuhan bakteri patogen, karena untuk mendapatkan hasil pertumbuhan yang optimal, inkubasi dilakukan pada suhu 35<sup>0</sup>C. Suhu yang kurang dari 35<sup>0</sup>C bisa menyebabkan diameter zona hambat lebih besar. Hal ini bisa terjadi pada *plate* yang ditumpuk-tumpuk lebih dari 2 *plate* pada saat inkubasinya. Tebalnya media agar juga menjadi faktor yang mempengaruhi diameter zona hambat pertumbuhan bakteri patogen. Ketebalan agar 4mm lebih efektif dibanding yang kurang dari 4mm. Karena, jika kurang dari 4mm maka difusi menjadi lebih cepat, sedangkan jika lebih dari 4mm maka menjadi lambat (Zeniusa *et al.*, 2019).



## 4.2 Efektivitas Antibakteri Spons *Callyspongia vaginalis* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi*

### 4.2.1 Hasil Uji Antibakteri Ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*

**Tabel 4. 5 Hasil Pengamatan 24 jam Uji Antibakteri Ekstrak Spons**

Konsentrasi	P1 (mm)	P2 (mm)	P3 (mm)	Rata-rata ± SD (mm)	Kriteria Hambatan (Davis & Stout, 1971)
10%	2,7	2,5	2,3	2,5 ± 0,2	Lemah
20%	4,3	4,9	4,6	4,6 ± 0,3	Lemah
40%	6,2	6,5	6,0	6,23 ± 0,25	Sedang
60%	9,8	9,0	9,1	9,3 ± 0,43	Sedang
80%	2,9	3,1	3,4	3,13 ± 0,25	Lemah
Netral	0	0	0	0,00 ± 0,00	Tidak ada
Kontrol (+)	8,3	8,3	8,8	8,34 ± 0,94	Sedang
Kontrol (-)	0	0	0	0,00 ± 0,00	Tidak ada

**Tabel 4. 6 Hasil Pengamatan 48 jam Uji Antibakteri Ekstrak Spons**

Konsentrasi	P1 (mm)	P2 (mm)	P3 (mm)	Rata-rata ± SD (mm)	Kriteria Hambatan (Davis & Stout, 1971)
10%	2,8	3,0	2,3	2,7 ± 0,36	Lemah
20%	4,7	5,0	4,6	4,76 ± 0,2	Lemah
40%	6,6	6,5	6,2	6,43 ± 0,2	Sedang
60%	9,9	9,3	9,2	9,46 ± 0,37	Sedang
80%	3,3	3,2	3,4	3,3 ± 0,1	Lemah
Netral	0	0	0	0,00 ± 0,00	Tidak ada
Kontrol (+)	8,3	8,3	8,8	8,34 ± 0,94	Sedang
Kontrol (-)	0	0	0	0,00 ± 0,00	Tidak ada

Ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* setelah dilakukan proses ekstraksi menggunakan *rotary evaporator* didapatkan hasil ekstrak 9,3 gram dengan hasil perhitungan rendemen sebesar 1,86%. Umumnya, rendemen senyawa bioaktif yang terkandung dalam spons sangat kecil. Namun demikian rendemen yang sangat kecil tersebut akan mempunyai nilai ekonomi tinggi, jika senyawa yang dihasilkan potensial sebagai obat dan nantinya dapat dikembangkan (Suryaningrum *et al.*, 2014).

Berdasarkan hasil uji efektivitas antibakteri ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* hasil yang diperoleh adalah terbentuknya zona hambat disekeliling cakram yang ditandai dengan adanya area bening. Dalam pengujian ini digunakan kontrol positif menggunakan kloramfenikol dan kontrol negatif menggunakan metanol. Penggunaan

kontrol positif (+) digunakan untuk kontrol dari zat uji dengan membandingkan diameter daerah yang terbentuk, sedangkan penggunaan kontrol negatif (-) menggunakan metanol untuk mengetahui apakah ada atau tidak pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan mikroba uji sehingga dapat dipastikan bahwa aktivitas yang ditunjukkan oleh ekstrak adalah senyawa yang digunakan.

Tabel hasil menunjukkan diameter zona hambat kontrol negatif (metanol) tidak terbentuk dibandingkan dengan zona hambat kontrol positif (Kloramfenikol) terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Konsentrasi 40% dan 60% pada ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*. Ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*, hal ini ditunjukkan oleh masih adanya zona bening disekitar cakram yang berisi ekstrak dalam jangka waktu penyimpanan selama 2 hari. Sehingga untuk dapat diaplikasikan, cukup menggunakan konsentrasi 40% atau 60% ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* agar dapat menyamai kemampuan antibiotik kloramfenikol dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*.

Penurunan zona hambat dari konsentrasi 60% ke 80% disebabkan oleh beberapa kemungkinan, seperti kurangnya daya difusi ekstrak pada media. Faktor pengenceran dapat mempengaruhi proses difusi ekstrak. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah kelarutan, menjadikan hal ini memperlambat difusi bahan aktif ekstrak ke dalam media dan akhirnya dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan ekstrak dengan konsentrasi tinggi dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* (Zeniusa et al., 2019).

#### 4.2.2 Hasil Uji Statistika

Data zona hambat yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji statistik menggunakan SPSS 16. Uji statistik terdiri dari uji normalitas dan uji homogenitas dengan dasar pengambilan keputusan :

## 1. Uji Normalitas

Hasil uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* dari data zona hambat potensi antibakteri ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* diketahui berdistribusi normal. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai signifikansi sebesar 0,200 yang menunjukkan jika nilai tersebut  $> 0,05$  maka tergolong distribusi normal. Kemudian setelah dilakukan uji normalitas, dilanjutkan dengan uji homogenitas *Levene test* dan diperoleh nilai signifikansi ekstrak *Callyspongia vaginalis* sebesar 0,993 yang menunjukkan bahwa varian data homogen.

## 2. Uji One Way Anova




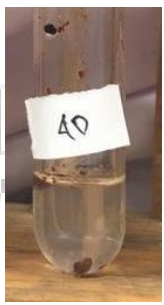

Uji One Way Anova dapat dilakukan ketika hasil uji normalitas adalah berdistribusi normal dan hasil uji homogenitas adalah varian data homogen. Berdasarkan hasil Uji Anova diketahui nilai signifikansi sebesar 0,928 yang menunjukkan nilai tersebut  $> 0,05$  sehingga dapat disimpulkan bahwa  $H_0$  diterima dan tidak terdapat perbedaan rata-rata zona hambat ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* dengan menggunakan konsentrasi yang berbeda. Maka perbedaan rata-rata zona hambat secara deskriptif tidaklah signifikan yang diduga disebabkan oleh faktor kekeruhan suspensi ekstrak dalam pembuatan konsentrasi, apabila semakin keruh maka diameter zona hambat akan semakin kecil, sedangkan apabila kekeruhan suspensi ekstrak kurang keruh maka diameter zona hambat akan lebih besar. Dikarenakan hasil analisis data tersebut sama, tidak dapat dilanjutkan uji post hoc.

UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

### 4.3 Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* yang dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

**Tabel 4. 7 Hasil Uji Fitokimia**

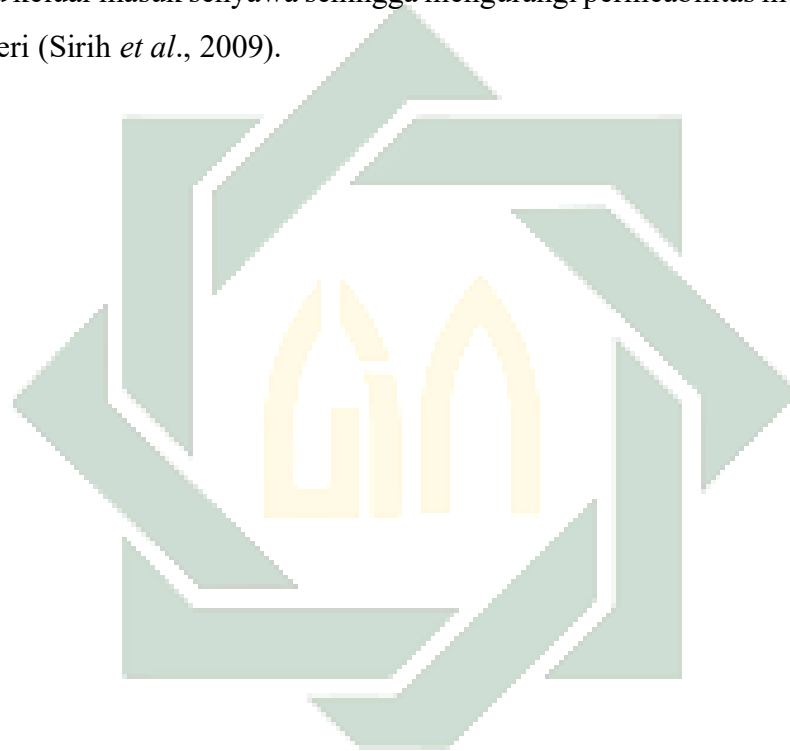
No	Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan	Gambar
1	Flavonoid	+	Reaksi yang terbentuk berwarna coklat	
2	Alkaloid	+	Reaksi positif apabila terdapat endapan warna merah	
3	Triterpenoid dan Steroid	+	Perubahan warna menjadi ungu kemerahcoklat	
4	Saponin	-	Terbentuk busa stabil kira-kira 10 detik	
5	Polifenol	-	Perubahan warna menjadi ungu, biru atau hitam	

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* menunjukkan bahwa ekstrak spons positif mengandung metabolit sekunder Flavonoid, Alkaloid, Triterpenoid dan Steroid yang berperan penting sebagai antimikroba dan antibiotika. Hasil penelitian tersebut didukung oleh hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Rumagit *et.al.*(2015) yang menunjukkan bahwa beberapa spons mengandung matabolit sekunder triterpenoid. Senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu triterpenoid, diterpenoid, dan saponin. Hasil ini diperkuat juga oleh penelitian yang dilakukan oleh Aunurohim (2007) yang menyatakan bahwa dalam ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. terdapat senyawa steroid, alkaloid, flavonoid dan treponoid.

Metabolit sekunder keberadaannya menjadi faktor penting terjadinya mekanisme kerja sebagai antibakteri. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membran sel, dan metabolisme energi. Sedangkan mekanisme kerja triterpenoid sebagai antibakteri adalah saat berinteraksi dengan membran luar dinding sel bakteri mengakibatkan membran luar dinding sel bakteri tersebut rusak. Rusaknya membran luar dinding sel yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang mengakibatkan sel kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau bahkan mati (Rumampuk *et al.*, 2017).

Penggunaan senyawa flavonoid mampu meningkatkan pertumbuhan udang vaname dengan menjaga kondisi tubuh udang dari patogen yang menyerang pencernaan udang (Andayani *et al.*, 2018). Alkaloid mempunyai kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut, dalam pergerakannya masuk ke dalam sel diperlukan adanya transport aktif pada membran, tidak seperti senyawa steroid, yang dalam

pergerakannya untuk masuk ke dalam membran sel tidak mengalami kesulitan karena masuk melalui difusi membran (Kurniawan & Aryana, 2015). Mekanisme kerja triterpenoid sebagai senyawa antibakteri yaitu dengan menyebabkan penurunan permeabilitas membran sel bakteri yang disebabkan senyawa triterpenoid yang akan bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuk senyawa sehingga mengurangi permeabilitas membran sel bakteri (Sirih *et al.*, 2009).



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian uji potensi antibakteri ekstrak spons dan bakteri simbiosis spons laut *Callyspongia vaginalis* terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*, dapat disimpulkan bahwa :

1. Pada hasil uji penapisan bakteri simbiosis spons *Callyspongia vaginalis* sebagai antibakteri patogen *Vibrio harveyi* menunjukkan hanya terdapat 4 isolat aktif dengan kode isolat BA.CV01, BA.CV02, BA.CV06, BA.CV08 dari 8 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dengan ditandai munculnya zona hambat disekitar kertas cakram dan dikategorikan memiliki daya hambat lemah.
2. Hasil uji antibakteri ekstrak spons *Callyspongia vaginalis* sebagai antibakteri patogen *Vibrio harveyi* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dengan ditandai munculnya zona hambat disekitar kertas cakram pada seluruh konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi 10%, 20%, 80% menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut memiliki kriteria zona hambat lemah, sedangkan pada konsentrasi 40% dan 60% memiliki kriteria zona hambat sedang.
3. Terdapat senyawa metabolit sekunder pada ekstrak spons *Callyspongia vaginalis*, yaitu flavonoid, Alkaloid, tripenoid dan steroid.

#### **5.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, penulis berharap untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan pengembangan uji pemisahan senyawa, identifikasi bakteri simbiosis spons hingga tingkat molekuler dan uji aktivitas antibakteri spons *Callyspongia vaginalis* terhadap bakteri patogen lainnya, serta uji toksitas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andayani, S., Fajar, M., & Rahman, M. F. (2018). Effect of alkaloids derived from jellyfish (*Aeginura* sp.) on the intestinal histopathology and relative percentage survival (RPS) of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) infected by *Vibrio harveyi*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/137/1/012006>
- Ariami, P. (2017). Efektifitas Teh Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) Sebagai Antimikroba Terhadap Pertumbuhan Bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 3(6), 3–8.
- Aristyawan, A. D., Sugijanto, N. E., & Suciati, S. (2018). Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons *Agelas cavernosa*. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 4(1), 39. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v4i12017.3943>
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4), 1–7.
- Cruickshank, S. (2016). The online guide to the animals of trinidad and tobago. *Ecology*, 3.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Applied Microbiology*, 22(4), 659–665. <https://doi.org/10.1128/aem.22.4.659665.1971>
- Faden, A. A. (2018). Evaluation of Antibacterial Activities of Aqueous and Methanolic Extracts of *Areca Catechu* Against Some Opportunistic Oral Bacteria. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(3), 655–659.
- Ginting, E. L., Rangan, L., Wantania, L. L., & Wullur, S. (2019). Isolation of Symbiotic Bacteria with Red Algae from Tongkaina Waters, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(2), 395. <https://doi.org/10.35800/jip.7.2.2019.23728>
- Isnaeni, D., & Rahmawati. (2016). Isolasi dan Karakterisasi Mikrosimbion dari Spons *Callyspongia vaginalis* dan Uji Daya Hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Majalah Farmasi Nasional*, 13(2), 8–19.
- Kurniawan, B., & Aryana, W. F. (2015). Binahong (*Cassia Alata* L) As Inhibitor Of *Escherichia Coli* Growth. *J Majority*, 4(4), 100–104.
- Lesser, M. P., & Blakemore, R. P. (1990). Description of a novel symbiotic bacterium from the brittle star, *Amphipholis squamata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2436–2440. <https://doi.org/10.1128/aem.56.8.2436-2440.1990>
- Macpal, F., Yudistira, A., & Wewengkang, D. S. (2019). Uji Aktivitas Antimikroba Dari Jamur Laut Yang Berasosiasi Dengan Organisme Laut Spons *Callyspongia aerizusa*. *Pharmacon*, 8(4), 1007. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29382>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms. January 2010*.
- Marzuki, I. (2018). *Eksplorasi Spons Indonesia*. 1–218.
- Marzuki, I., Noor, A., Nafie, N. La, & Djide, M. N. (2014). Isolasi dan identifikasi bakteri shimbion spons penghasil enzim amilase asal pantai melawai balikpapan. *Dr. Aloei Saboe*, 1(2), 11–18.



- <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8WTRV>
- Mayang Puspita Krisyuninda, & Aunurohim, D.; D. A. W. M. . (2007). *UJI TOKSISITAS FRAKSI SPONS Callyspongia sp. DENGAN METODE Brine Shrimp Test (BST) DARI PERAIRAN PASIR PUTIH SITUBONDO*.
- Murniasih, T. (2003). Metabolit Sekunder Dari Spons Sebagai Bahan Obat-Obatan. *Oseana*, 28(3), 27–33. <http://www.springer.com/series/15440%0Apapers://ae99785b-2213-416daa7e-3a12880cc9b9/Paper/p18311>
- Najoan, J. J., Runtuwene, M. J. R., & Wewengkang, D. S. (2016). Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tiga (*Allophylus Cobbe L.*). *Pharmakon*, 5(1), 266–274.
- Ngantung, A., Sumilat, D., & Bara, R. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Dari Spons *Dictyonella Funicularis*. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 2, 10–16.
- Nofiani, R. (2012). Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *Jurnal Natur Indonesia*, 10(2), 120. <https://doi.org/10.31258/jnat.10.2.120-125>
- Novita, W. (2016). TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI STREPTOCOCCUS MUTANS Willia Novita. *Jmj*, 4(2), 140–155.
- Noviyanty, A., Salingkat, C. A., & Syamsiar, S. (2019). PENGARUH JENIS PELARUT TERHADAP EKSTRAKSI DARI KULIT BUAH NAGA MERAH (*Hyllocereus polyrhizus*). *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 5(3), 271–279. <https://doi.org/10.22487/kovalen.2019.v5.i3.14037>
- Olsvik, Ø., Wasteson, Y., Lund, A., & Hornes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *International Journal of Food Microbiology*, 12(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90051-P](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90051-P)
- Pasodung, A., Losung, F., Angkouw, E., Lintang, R., Mantiri, D., & Sumilat, D. (2018). Uji aktivitas antibakteri spons *Plakortis sp.* yang dikoleksi dari perairan Bunaken. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 6(1), 44. <https://doi.org/10.35800/jplt.6.1.2018.20192>
- Pringgenies, D., & Dananjoyo, M. C. (2012). Penapisan Bakteri Simbion Gastropoda *Stramonita armigera* Penghasil Senyawa Antibakteri Multi Drug Resistant dari Perairan Ternate. *Jurnal Natur Indonesia*, 13(3), 200. <https://doi.org/10.31258/jnat.13.3.200-206>
- Putu Puspadi Aristyanti, N., Made Wartini, N., Bagus Wayan Gunam, I., Jurusan Teknologi Industri Pertanian, M., Teknologi Pertanian Unud, F., & Teknologi Industri Pertanian, D. (2017). Rendemen dan Karakteristik Ekstrak Pewarna Bunga Kenikir (*Tagetes erecta L.*) Pada Perlakuan Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 5(3), 13–23.
- Radjasa, O. K., Martens, T., Grossart, H.-P., Brinkhoff, T., Sabdono, A., & Simon, M. (2007). Antagonistic activity of marine bacterium *pseudoalteromonas*.pdf. In *Journal of Biological Sciences* (Vol. 7, Issue 2, pp. 239–246).
- Rahayuningtyas, A. D., Dewi, W., & Sudjarwo, I. (2017). <p>Pemanfaatan ekstrak etil asetat buah merah sebagai zat pengganti pewarna primer pada teknik pengecatan tunggal bakteri gram negatif batang</p><p>Utilization of ethyl acetate extract of *Pandanus conoideus lam.* as substitution for simple staining

- techniq. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 29(2).  
<https://doi.org/10.24198/jkg.v29i2.18583>
- Rahman, F. A., Haniastuti, T., & Utami, T. W. (2017). Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.22146/majkedgiind.11325>
- Rumagit, H. M., Runtuwene, M. R. J., & Sudewi, S. (2015). Uji Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Spons Lamellodysidea Herbacea. *Pharmacon*, 4(3), 183–192.
- Rumampuk, Y. B. J., Wowor, P. M., & Mambo, C. D. (2017). Uji Daya Hambat Ekstrak Spons Laut (*Callyspongia Aerizusa*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella Typhi* dan *Streptococcus Pyogenes*. *Jurnal E-Biomedik*, 5(2), 3–8. <https://doi.org/10.35790/ebm.5.2.2017.18480>
- Saidi, N., Helwati, H., Lubis, L. Q., & Bahi, M. (2017). ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT FROM STEM BARK OF *Cinnamomum sintoc*. *Jurnal Natural*, 17(2), 77. <https://doi.org/10.24815/jn.v0i0.8049>
- Saptiani, G., Prayitno, S. B., & Anggoro, S. (2013). POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUJU (*Acanthus ilicifolius*) TERHADAP *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 7(1), 17–20. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.558>
- Sirih, M., Piper, M., Anti, A., R, F. J., M, D. A. C., & Nirwani, B. (2009). MANFAAT SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) SEBAGAI AGEN ANTI Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*.
- Suryaningrum, T. D., Pramadhany, W. W., & Wikanta, T. (2014). Penapisan Senyawa Antibakteri dan Toksisitas dari Spons Asal Perairan Pulau Bonerate Sulawesi Selatan. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 2(1), 45. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v2i1.27>
- Tetti, M. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan UIN Alauddin*, 7(2), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s11293-018-9601-y>
- Trisia, A., Philyria, R., & Toemon, A. N. (2018). Uji Aktivitas ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN KALANDUYUNG (*Guazuma ulmifolia* Lam.) TERHADAP PERTUMBUHAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DENGAN METODE DIFUSI CAKRAM (KIRBY-BAUER). *Anterior Jurnal*, 17(2), 136–143. <https://doi.org/10.33084/anterior.v17i2.12>
- Verdiana, M., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2018). PENGARUH JENIS PELARUT PADA EKSTRAKSI MENGGUNAKAN GELOMBANG ULTRASONIK TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BUAH LEMON (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 7(4), 213. <https://doi.org/10.24843/itepa.2018.v07.i04.p08>

- Yusminar, Wardiyah, & Nida, K. (2017). Mikrobiologi dan Parasitologi. *Buku Bahan Ajar Farmasi*, 59. <http://bppsdmk.kemkes.go.id/pusdiksdmk/wpcontent/uploads/2017/11/DAFTAR-ISI-DAN-MIKROBIOLOGIPARASITOLOGI.pdf>
- Zeniusa, P., Ramadhian, M. R., Nasution, S. H., & Karima, N. (2019). Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Majority*, 8(2), 136–143.
- Andayani, S., Fajar, M., & Rahman, M. F. (2018). Effect of alkaloids derived from jellyfish (*Aeginura* sp.) on the intestinal histopathology and relative percentage survival (RPS) of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) infected by *Vibrio harveyi*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/137/1/012006>
- Ariami, P. (2017). Efektifitas Teh Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) Sebagai Antimikroba Terhadap Pertumbuhan Bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 3(6), 3–8.
- Aristyawan, A. D., Sugijanto, N. E., & Suciati, S. (2018). Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons *Agelas cavernosa*. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 4(1), 39. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v4i12017.3943>
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4), 1–7.
- Cruickshank, S. (2016). The online guide to the animals of trinidad and tobago. *Ecology*, 3.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Applied Microbiology*, 22(4), 659–665. <https://doi.org/10.1128/aem.22.4.659665.1971>
- Faden, A. A. (2018). Evaluation of Antibacterial Activities of Aqueous and Methanolic Extracts of *Areca Catechu* Against Some Opportunistic Oral Bacteria. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(3), 655–659.
- Ginting, E. L., Rangian, L., Wantania, L. L., & Wullur, S. (2019). Isolation of Symbiotic Bacteria with Red Algae from Tongkaina Waters, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(2), 395. <https://doi.org/10.35800/jip.7.2.2019.23728>
- Isnaeni, D., & Rahmawati. (2016). Isolasi dan Karakterisasi Mikrosimbion dari Spons *Callyspongia vaginalis* dan Uji Daya Hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Majalah Farmasi Nasional*, 13(2), 8–19.
- Kurniawan, B., & Aryana, W. F. (2015). Binahong (*Cassia Alata* L) As Inhibitor Of *Escherichia Coli* Growth. *J Majority*, 4(4), 100–104.
- Lesser, M. P., & Blakemore, R. P. (1990). Description of a novel symbiotic bacterium from the brittle star, *Amphipholis squamata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2436–2440. <https://doi.org/10.1128/aem.56.8.2436-2440.1990>
- Macpal, F., Yudistira, A., & Wewengkang, D. S. (2019). Uji Aktivitas Antimikroba dari Jamur Laut yang Berasosiasi dengan Organisme Laut Spons *Callyspongia aerizusa*. *Pharmacon*, 8(4), 1007. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29382>

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms. January 2010*.
- Marzuki, I. (2018). *Eksplorasi Spons Indonesia*. 1–218.
- Marzuki, I., Noor, A., Nafie, N. La, & Djide, M. N. (2014). Isolasi dan identifikasi bakteri simbiosis spons penghasil enzim amilase asal pantai melawai balikpapan. *Dr. Aloei Saboe*, 1(2), 11–18.  
<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8WTRV>
- Mayang Puspita Krisyuninda, & Aunurohim, D.; D. A. W. M. . (2007). *UJI TOKSISITAS FRAKSI SPONS Callyspongia sp. DENGAN METODE Brine Shrimp Test (BST) DARI PERAIRAN PASIR PUTIH SITUBONDO*.
- Murniasih, T. (2003). Metabolit Sekunder Dari Spons Sebagai Bahan Obat-Obatan. *Oseana*, 28(3), 27–33.  
<http://www.springer.com/series/15440/papers/ae99785b-2213-416daa7e-3a12880cc9b9/Paper/p18311>
- Najoan, J. J., Runtuwene, M. J. R., & Wewengkang, D. S. (2016). Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tiga (*Allophylus Cobbe L.*). *Pharmacoon*, 5(1), 266–274.
- Ngantung, A., Sumilat, D., & Bara, R. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Dari Spons *Dictyonella Funicularis*. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 2, 10–16.
- Nofiani, R. (2012). Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *Jurnal Natur Indonesia*, 10(2), 120.  
<https://doi.org/10.31258/jnat.10.2.120-125>
- Novita, W. (2016). TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI STREPTOCOCCUS MUTANS *Willia Novita*. *Jmj*, 4(2), 140–155.
- Noviyanty, A., Salingkat, C. A., & Syamsiar, S. (2019). PENGARUH JENIS PELARUT TERHADAP EKSTRAKSI DARI KULIT BUAH NAGA MERAH (*Hylocereus polyrhizus*). *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 5(3), 271–279. <https://doi.org/10.22487/kovalen.2019.v5.i3.14037>
- Olsvik, Ø., Wasteson, Y., Lund, A., & Hornes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *International Journal of Food Microbiology*, 12(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90051-P](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90051-P)
- Pasodung, A., Losung, F., Angkouw, E., Lintang, R., Mantiri, D., & Sumilat, D. (2018). Uji aktivitas antibakteri spons *Plakortis sp.* yang dikoleksi dari perairan Bunaken. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 6(1), 44.  
<https://doi.org/10.35800/jplt.6.1.2018.20192>
- Pringgenies, D., & Dananjoyo, M. C. (2012). Penapisan Bakteri Simbiosis Gastropoda *Stramonita armigera* Penghasil Senyawa Antibakteri Multi Drug Resistant dari Perairan Ternate. *Jurnal Natur Indonesia*, 13(3), 200.  
<https://doi.org/10.31258/jnat.13.3.200-206>
- Putu Puspadi Aristyanti, N., Made Wartini, N., Bagus Wayan Gunam, I., Jurusan Teknologi Industri Pertanian, M., Teknologi Pertanian Unud, F., & Teknologi Industri Pertanian, D. (2017). Rendemen dan Karakteristik Ekstrak Pewarna Bunga Kenikir (*Tagetes erecta L.*) Pada Perlakuan Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 5(3), 13–23.



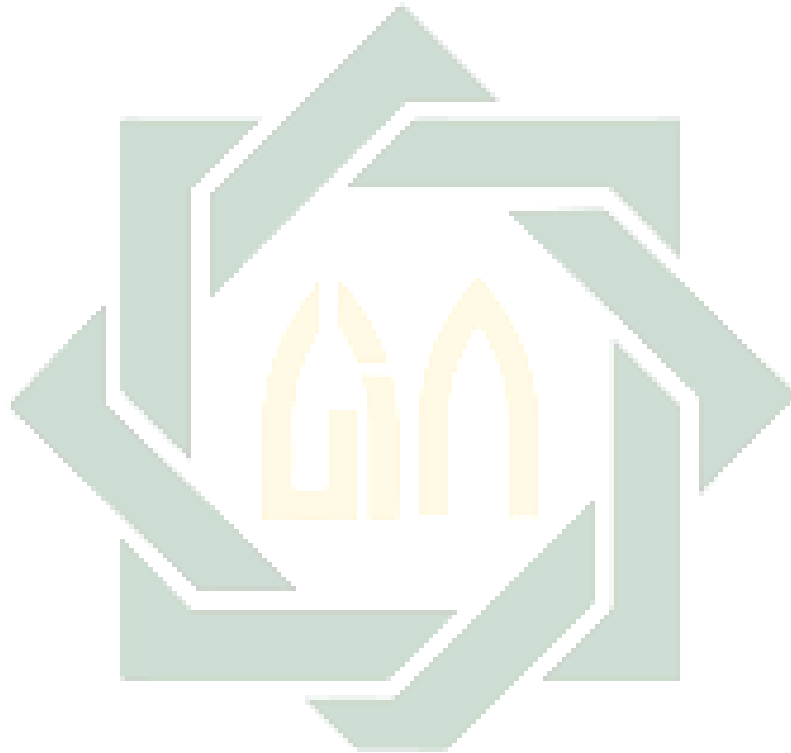
- Radjasa, O. K., Martens, T., Grossart, H.-P., Brinkhoff, T., Sabdono, A., & Simon, M. (2007). Antagonistic activity of marine bacterium pseudoalteromonas.pdf. In *Journal of Biological Sciences* (Vol. 7, Issue 2, pp. 239–246).
- Rahayuningtyas, A. D., Dewi, W., & Sudjarwo, I. (2017). <p>Pemanfaatan ekstrak etil asetat buah merah sebagai zat pengganti pewarna primer pada teknik pengecatan tunggal bakteri gram negatif batang</p><p>Utilization of ethyl acetate extract of Pandanus conoideus lam. as substitution for simple staining techniq. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 29(2). <https://doi.org/10.24198/jkg.v29i2.18583>
- Rahman, F. A., Haniastuti, T., & Utami, T. W. (2017). Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.22146/majkedgiind.11325>
- Rumagit, H. M., Runtuwene, M. R. J., & Sudewi, S. (2015). Uji Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Spons Lamellodysidea Herbacea. *Pharmacon*, 4(3), 183–192.
- Rumampuk, Y. B. J., Wowor, P. M., & Mambo, C. D. (2017). Uji Daya Hambat Ekstrak Spons Laut (*Callyspongia Aerizusa*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella Typhi* dan *Streptococcus Pyogenes*. *Jurnal E-Biomedik*, 5(2), 3–8. <https://doi.org/10.35790/ebm.5.2.2017.18480>
- Saidi, N., Helwati, H., Lubis, L. Q., & Bahi, M. (2017). ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT FROM STEM BARK OF *Cinnamomum sintoc*. *Jurnal Natural*, 17(2), 77. <https://doi.org/10.24815/jn.v0i0.8049>
- Saptiani, G., Prayitno, S. B., & Anggoro, S. (2013). POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUJU (*Acanthus ilicifolius*) TERHADAP *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 7(1), 17–20. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.558>
- Sirih, M., Piper, M., Anti, A., R, F. J., M, D. A. C., & Nirwani, B. (2009). MANFAAT SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) SEBAGAI AGEN ANTI Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*.
- Suryaningrum, T. D., Pramadhany, W. W., & Wikanta, T. (2014). Penapisan Senyawa Antibakteri dan Toksisitas dari Spons Asal Perairan Pulau Bonerate Sulawesi Selatan. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 2(1), 45. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v2i1.27>
- Tetti, M. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan UIN Alauddin*, 7(2), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s11293-018-9601-y>
- Trisia, A., Philyria, R., & Toemon, A. N. (2018). Uji Aktivitas ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN KALANDUYUNG (*Guazuma ulmifolia Lam.*) TERHADAP PERTUMBUHAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DENGAN METODE DIFUSI CAKRAM (KIRBY-BAUER). *Anterior Jurnal*, 17(2), 136–143. <https://doi.org/10.33084/anterior.v17i2.12>
- Verdiana, M., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2018). PENGARUH

JENIS PELARUT PADA EKSTRAKSI MENGGUNAKAN GELOMBANG ULTRASONIK TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BUAH LEMON (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 7(4), 213.

<https://doi.org/10.24843/itepa.2018.v07.i04.p08>

Yusminar, Wardiyah, & Nida, K. (2017). Mikrobiologi dan Parasitologi. *Buku Bahan Ajar Farmasi*, 59. PARASITOLOGI.pdf

Zeniusa, P., Ramadhian, M. R., Nasution, S. H., & Karima, N. (2019). Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Majority*, 8(2), 136–143.



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A