



AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER EKSTRAK KASAR METABOLIT BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS DAN DETEKSI GEN PENYANDI NRPS

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

WULAN FITRIANI SAFARI



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2015**

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA*

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul Aktivitas Antibakteri dan Antikanker Ekstrak Kasar Metabolit Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons dan Deteksi Gen Penyandi NRPS adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Januari 2015

Wulan Fitriani Safari
NIM G351120351

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



RINGKASAN

WULAN FITRIANI SAFARI. Aktivitas Antibakteri dan Antikanker Ekstrak Kasar Metabolit Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons dan Deteksi Gen Penyandi NRPS. Dibimbing oleh ARIS TRI WAHYUDI dan EKOWATI CHASANAH.

Spons laut dikenal mampu menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antibakteri, antifungi dan antikanker. Pengembangan senyawa bioaktif dari spons mengalami kendala keterbatasan biomassa spons. Mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons laut menjadi alternatif untuk memecahkan masalah tersebut. Mikroba yang bersimbiosis dengan spons dapat mencapai 40% dari volume jaringan spons dengan densitas mencapai 10^9 sel bakteri per mm^3 jaringan spons. Potensi ini memungkinkan bakteri simbiosis pada spons mampu memproduksi senyawa bioaktif dan menggantikan spons sebagai penghasil senyawa bioaktif.

Eksplorasi senyawa bioaktif bakteri asal spons dari perairan Indonesia telah dilakukan. Tiga isolat bakteri diberi kode HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 berhasil diisolasi dari spons *Haliclona* sp. dari Pulau Waigeo, Kabupaten Raja Ampat, Papua Barat. Isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 memiliki aktivitas antimikrob berspektrum luas terhadap bakteri patogen maupun cendawan patogen, namun sampai saat ini belum ditentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan potensinya sebagai antikanker. Keberadaan kluster gen penyandi domain Adenilasi (A) dari kompleks enzim Nonribosomal Peptida Sintetase (NRPS) juga belum diketahui sehingga perlu dilakukan analisis secara genetik untuk memastikan bahwa isolat-isolat bakteri asal spons laut memiliki kemampuan mensintesis senyawa bioaktif.

Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 memiliki aktivitas antibakteri berspektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan nilai KHM berkisar 0.1 sampai 1 mg/mL. Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit HAL-74 dan HAA-01 termasuk sedang (moderat) sedangkan aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit HAL-13 termasuk lemah. Uji kandungan senyawa kimia terhadap ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons menunjukkan ekstrak kasar metabolit HAL-13 dan HAA-01 mengandung steroid dan HAL-74 mengandung flavonoid. Ekstrak kasar metabolit HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 124.35 $\mu\text{g/mL}$, 463.85 $\mu\text{g/mL}$ dan 448.43 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kasar metabolit HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 mampu menghambat sel kanker HeLa. Ekstrak kasar metabolit HAL-74 memiliki aktivitas antikanker terbaik dengan nilai IC_{50} sebesar 134.9 $\mu\text{g/mL}$. Isolat HAL-74 dan HAA-01 terdeteksi memiliki DNA penyandi domain A dengan ukuran 1000 pasang basa (pb). Sekuen domain A dari isolat HAL-74 memiliki homologi dengan *Comamonas* sp. POUX sebesar 96% dan HAA-01 memiliki homologi dengan *B. subtilis* sebesar 99%.

Kata kunci: antibakteri, antikanker, bakteri yang berasosiasi dengan spons, konsentrasi hambat minimum (KHM), nonribosomal peptida sintetase (NRPS)

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

© Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang (Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang) Bogor Agricultural University



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

SUMMARY

WULAN FITRIANI SAFARI. Antibacterial and Anticancer Activity of Metabolite Crude Extracts from Sponge Associated-Bacterial and Detection of NRPS Gene. Supervised by ARIS TRI WAHYUDI and EKOWATI CHASANAH.

Marine sponges are known as producer of a wide range of bioactive secondary metabolites with various biological activities, such as antibacterial, antifungal and anticancer. The limitation of sponge biomass is the main factor for the large scale production of bioactive compounds. Therefore, marine microorganisms which associated with marine sponges became one of the alternative ways to solve that problem. Microbial associates can comprise as much as 40% of sponge tissue volume with densities in excess of 10^9 microbial cells per mm^3 of sponge tissue. Marine microorganisms have contributed to the majority of bioactive compounds. They can produce the same metabolite compounds as their host.

The exploration of bioactive compounds has been carried out in Indonesia. Three bacterial isolates coded as HAL-74, HAA-01 and HAL-13 have been isolated from sponge *Haliclona* sp. at Waigeo Island, Raja Ampat District, West Papua Province. The crude extract of isolates HAL-74, HAA-01 and HAL-13 have broad-spectrum antimicrobial activity. Determination MIC and identification of anticancer potency for these isolates were important in order to characterize their bioactive compounds. Detection of Adenylation (A) domain of NRPS genes was important for identifying these bacteria as well as ensuring their capability in synthesizing the bioactive compounds.

The metabolite crude extracts of HAL-74, HAA-01 and HAL-13 had broad spectrum antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria with MIC values were 0.1 until $1 \mu\text{g/mL}$. Antibacterial activity of metabolite crude extracts from HAL-74 and HAA-01 are moderate while the antibacterial activity of metabolite crude extracts of the HAL-13 relatively weak. Chemistry compounds assay showed that metabolite crude extracts from HAA-01 and HAL-13 had steroids meanwhile metabolite crude extracts from HAL-74 has flavonoids. The metabolite crude extracts from HAL-74, HAA-01 and HAL-13 were potent against the brine shrimp with LC_{50} values of $124.35 \mu\text{g/mL}$, $463.85 \mu\text{g/mL}$ and $448.43 \mu\text{g/mL}$ respectively. The metabolite crude extracts had cytotoxicity effect on HeLa cell line with the best IC_{50} value of $134.9 \mu\text{g/mL}$. Genetic analysis showed HAL-74 and HAA-01 had gene that encoded the adenylase (A) domain of Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) which played role in the synthesis of bioactive compounds. Sequences analysis of DNA fragment encoding A domain showed that isolate HAL-74 has a similarity level of 96% with *Comamonas* sp. POUX and isolate HAA-01 has a similarity level of 99% with *B. subtilis*.

Keywords: Antibacterial, anticancer, marine sponge associated-bacteria, minimum inhibitory concentration (MIC), nonribosomal peptide synthetase (NRPS)



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2015
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER EKSTRAK
KASAR METABOLIT BAKTERI YANG BERASOSIASI
DENGAN SPONS DAN DETEKSI GEN PENYANDI NRPS**

WULAN FITRIANI SAFARI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains
pada
Program Studi Mikrobiologi

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2015**



Pengujian Luar Komisi pada Ujian Tesis : Dr. Laksmi Ambarsari, MS

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor) Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Judul Tesis : Aktivitas Antibakteri dan Antikanker Ekstrak Kasar Metabolit Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons dan Deteksi Gen Penyandi NRPS
Nama : Wulan Fitriani Safari
NIM : G351120351

Disetujui oleh
Komisi Pembimbing

Prof Dr Aris Tri Wahyudi, MSi
Ketua

Dr Ir Ekowati Chasanah, MSc
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi
Mikrobiologi

Dekan Sekolah Pascasarjana

Prof Dr Anja Meryandini, MS

Dr Ir Dahrul Syah, MScAgr

Tanggal Ujian:
24 Desember 2014

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah yang berjudul Aktivitas Antibakteri dan Antikanker Ekstrak Metabolit dari Bakteri yang Bersosiasi dengan Spons dan Deteksi Gen NRPS berhasil diselesaikan.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Prof Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si sebagai ketua komisi pembimbing dan Dr.Ir. Ekowati Chasanah, M.Sc sebagai anggota komisi pembimbing, yang telah banyak memberikan bimbingan, saran, nasehat, motivasi, waktu konsultasi, serta solusi dari setiap permasalahan yang dihadapi penulis selama melaksanakan penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini. Selain itu penulis ucapkan terima kasih kepada penguji luar komisi Dr. Laksmi Ambarsari, MS dan Prof Dr. Anja Meryandini, MS selaku Ketua Program Studi Mikrobiologi IPB, yang telah memberikan motivasi selama studi dan masukan pada saat ujian sidang tesis. Selain itu penulis ucapkan terima kasih seluruh Dosen pada Program Studi Mikrobiologi yang telah memberikan ilmu dan pengalaman selama studi. Terima kasih atas hibah penelitian unggulan strategi IPB tahun 2012 kepada Prof Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si yang telah mendanai sebagian penelitian ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Jaka selaku staf Laboratorium Mikrobiologi IPB, Bapak Eman selaku staf Laboratorium Kimia Analitik yang telah banyak membantu penelitian ini, Vita, Eja, Anja, Rahmi, Hari, Asrianto, Tini, Annisa, Gegek, Fadhil, Ernin serta seluruh teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi IPB, atas dukungan, motivasi dan bantuannya selama penelitian ini. Terima kasih untuk teman-teman seperjuangan di Pascasarjana Mikrobiologi IPB angkatan 2012, teman-teman di Wisma Agung 3 serta seluruh pihak yang telah memberikan doa dan dukungannya, penulis ucapkan terima kasih.

Ucapan terima kasih tak terhingga penulis ucapkan kepada Bapak, Mamak, Ibu, Adik-adik tercinta, serta keluarga besar tersayang, atas doa, dukungan, kasih sayang, dan semangat yang diberikan.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Januari 2015

Wulan Fitriani Safari
NIM G351120351



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vi
PENDAHULUAN	6
Latar Belakang	1
Tujuan	2
Manfaat Penelitian	2
Ruang Lingkup Penelitian	2
TINJAUAN PUSTAKA	3
Senyawa Bioaktif dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons	3
Penyakit Infeksi	5
Kanker	6
Nonribosomal Peptida Sintetase (NRPS)	7
METODE	8
Kerangka Penelitian	8
Waktu dan Tempat Penelitian	8
Ekstraksi Metabolit Bakteri	8
Uji Kandungan Senyawa kimia	9
Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)	9
Uji Toksisitas Menggunakan <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	10
Uji Aktivitas Antikanker	10
Amplifikasi DNA Penyandi Domain Adenilasi (A)	11
Analisis Bioinformatika	11
HASIL DAN PEMBAHASAN	12
Hasil	12
Pembahasan	19
SIMPULAN DAN SARAN	23
Simpulan	23
Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	28
RIWAYAT HIDUP	46

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DAFTAR TABEL

1	Senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri yang berasosiasi dengan spons	4
2	Kandungan senyawa kimia ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons	12
3	Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap berbagai bakteri uji	13
4	Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap bakteri uji	13
5	Aktivitas toksisitas ekstrak kasar metabolit bakteri terhadap larva <i>A. salina</i>	14
6	Nilai LC_{50} BSLT ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons	15
7	Rata-rata nilai absorbansi sel HeLa pada berbagai konsentrasi ekstrak kasar metabolit bakteri	15
8	Nilai IC_{50} ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons	17
9	Analisis bioinformatika sekuen fragmen DNA penyandi domain A menggunakan program BLASTX	18

DAFTAR GAMBAR

1	Struktur gen NRPS	7
2	Diagram alir prosedur penelitian	8
3	Efek sitotoksik ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap penghambatan sel HeLa	16
4	Pita DNA penyandi domain A yang berukuran 1000 pb	17
5	Pohon filogenetik berdasarkan sekuen asam amino domain A yang dikonstruksi dengan metode <i>Neighbor-Joining</i> dengan nilai ulangan bootstrap 1000.	18

DAFTAR LAMPIRAN

1	Penghitungan % kematian dan nilai LC_{50} ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons	29
2	Penghitungan % penghambatan sel HeLa dan nilai IC_{50}	32
3	Pengeditan Sekuen Nukleotida Gen Penyandi Domain A dengan Bioedit	33
4	Sekuen Nukleotida Gen Penyandi Domain A	45

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan penting. Penyakit ini bersifat sangat dinamis, dapat menyebar secara langsung atau tidak langsung, dari satu orang ke orang lain. Tingkat kematian akibat penyakit ini masih relatif besar. Setiap tahun penyakit infeksi dapat menyebabkan kematian sekitar 3.5 juta orang (WHOa 2014). Penanganan penyakit infeksi biasanya menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan tidak terkontrol telah mengakselerasi timbulnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik/*multi drug resistance* (MDR) (Radjasa *et al.* 2007). Hal tersebut merupakan masalah serius yang penting untuk ditanggulangi. Kecemasan yang muncul dalam penanganan penyakit infeksi akibat strain MDR mendorong berbagai penelitian dalam eksplorasi senyawa antibiotik yang baru.

Kanker menjadi masalah kesehatan penting selain penyakit infeksi. Kanker merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia, sekitar 8.2 juta kematian akibat kanker terjadi pada tahun 2012 (WHO b 2014). Kanker serviks termasuk jenis kanker yang menyebabkan kematian yang besar. WHO b (2014) menyebutkan bahwa kanker serviks merupakan penyakit kanker terbesar kelima yang menyebabkan kematian pada perempuan di dunia dan terbesar kedua di Indonesia. Pada tahun 2014 terjadi 9500 kematian akibat penyakit ini. Pengobatan kanker saat ini menggunakan pengobatan konvensional berupa kemoterapi dan obat-obat simptomatik. Metode kemoterapi tidak efektif karena sulit dalam mendesain senyawa kemoterapi yang mempunyai aktivitas antikanker tinggi namun mempunyai efek samping yang rendah terhadap sel normal. Obat-obat antikanker yang ada sekarang juga masih mempunyai efek samping terhadap jaringan-jaringan normal (Gibbs 2000). Untuk mengatasi masalah tersebut pencarian sumber senyawa antikanker baru dengan sifat yang lebih baik terus dilakukan.

Spons dikenal mampu menghasilkan berbagai senyawa bioaktif. Berbagai senyawa kimia seperti terpenoid, alkaloid, peptida dan poliketida berhasil diisolasi dari spons (Webster dan Hill 2001). Senyawa bioaktif tersebut memiliki berbagai aktivitas biologis yang berperan penting di bidang farmasi seperti antibakteri, antifungi, antitumor dan antikanker. Pengembangan senyawa bioaktif dari spons mengalami kendala keterbatasan biomassa spons, misalnya untuk mendapatkan 18 g bryostatindibutuhkan sekitar 13.000 kg *Bryozoansneritina* (Taylor *et al.* 2007). Hal ini tentu dapat menyebabkan dampak bencana ekologi. Oleh karena itu, pencarian sumber senyawa bioaktif alternatif yang ramah lingkungan perlu dilakukan.

Pencarian senyawa bioaktif kini lebih diarahkan ke komunitas mikroorganisme pada jaringan spons sebagai simbiosis. Mikroorganisme laut telah memberi kontribusi pada sebagian besar senyawa bioaktif. Mereka dapat menghasilkan senyawa metabolit yang sama seperti inangnya (Proksch *et al.* 2002). Mikroba yang berasosiasi dengan spons dapat mencapai 40% dari volume jaringan spons dengan densitas mencapai 10^9 sel bakteri per mm^3 jaringan spons (Hoffmann *et al.* 2005). Secara khusus organisme laut yang sesil seperti spons diperkirakan sangat bergantung pada mekanisme pertahanan simbiosisnya, yaitu

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

Agribisnis Universitas Bogor



dengan menghasilkan senyawa bioaktif. Potensi ini memungkinkan bakteri simbiosis pada spons mampu memproduksi senyawa bioaktif dan menggantikan spons yang selama ini menghasilkan senyawa bioaktif.

Eksplorasi senyawa bioaktif bakteri asal spons dari perairan Indonesia telah dilakukan. Tokasaya (2010) berhasil mengisolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons *Haliclona* sp. dari Pulau Waigeo, Kabupaten Raja Ampat, Papua Barat, tiga isolat diantaranya diberi kode HAL-74, HAA-01 dan HAL-13. Banoet (2011) melaporkan bahwa ekstrak kasar isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 memiliki aktivitas antimikrob berspektrum luas terhadap bakteri patogen maupun fungi patogen, namun sampai saat ini belum ditentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan potensinya sebagai antikanker. Keberadaan kluster gen penyandi domain Adenilai (A) dari kompleks enzim Nonribosomal Peptide Sintetase (NRPS) belum diketahui juga, sehingga perlu dilakukan analisis genetik untuk memastikan bahwa isolat-isolat bakteri asal spons laut memiliki kemampuan mensintesis senyawa bioaktif.

Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan senyawa kimia, menentukan nilai KHM, menentukan sitotoksitas dan aktivitas antikanker ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons serta mendeteksi keberadaan gen penyandi domain A dari kluster gen NRPS isolat bakteri HAL-74, HAA-01 dan HAL-13.

Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberi pembuktian ilmiah mengenai potensi senyawa bioaktif dari isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons sebagai antibakteri dan antikanker. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan aset dan kontribusi besar terhadap penemuan senyawa antibakteri dan antikanker baru yang berasal dari Indonesia dengan sifat yang lebih baik.

Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup dalam penelitian ini meliputi ekstraksi metabolit bakteri, uji kandungan senyawa kimia, analisis aktivitas antibakteri, penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), analisis aktivitas antikanker dari ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons dan deteksi gen penyandi domain A dari kompleks enzim NRPS dari isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons. Uji kandungan senyawa kimia meliputi uji alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin dan tanin. Penentuan nilai KHM dilakukan dengan menggunakan 5 bakteri uji. Analisis aktivitas antikanker meliputi uji toksisitas dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) dan uji aktivitas antikanker terhadap sel HeLa. Deteksi gen penyandi domain A dari kompleks enzim NRPS meliputi isolasi genom, amplifikasi gen penyandi domain A dan analisis bioinformatika.



TINJAUAN PUSTAKA

Senyawa Bioaktif dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Spons merupakan salah satu komponen komunitas bentik yang penting di lautan. Spons memiliki perkembangan unik dan kesederhanaan struktural yang memisahkan spons dari hewan lain. Spons termasuk dalam Filum Porifera dan Subfilum Parazoa yang hidup sesil dan merupakan organisme pemakan suspensi (Hentschel *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2007). Ada tiga kelas utama spons, yaitu Calcarea (5 ordo dan 24 keluarga), Demospongiae (15 ordo dan 92 keluarga) dan Hexactinellida (6 ordo dan 20 keluarga). Sejauh ini sekitar 15.000 spesies spons telah dideskripsikan, namun kemungkinan keragaman mereka lebih tinggi (Fieseler *et al.* 2004). Sebagian besar spesies spons berada pada kelas Demospongiae.

Spons adalah hewan diploblas yang terdiri dari lapisan luar (pinakoderma) dan lapisan dalam (koanoderma). Hal ini membuat spons disebut plakozoa (Peraud 2006). Pinakoderma disusun oleh pinokosit. Pada permukaan luar terdapat pori-pori (ostia) yang merupakan saluran yang menembus sampai pada bagian kanal interior. Bagian dalam spons terdapat koanosit (sel-sel berflagella) yang berasal dari sebuah ruang yang disusun oleh koanoderma, ruang penyimpanan makanan. Air akan masuk melalui ostia karena adanya pergerakan flagel koanosit kemudian menyaring keluar partikel-partikel makanan dan ditransfer ke mesohil. Partikel akan dicerna secara fagositosis oleh arkeosit di mesohil (Castro dan Huber 2007).

Spons yang bersifat sesil menyaring makanannya dari aliran air. Air laut mengandung 10^7 virus, 10^5 bakteri dan fungi 10^3 sel/ml (Lopez *et al.* 2002; Meyer dan Kuever 2008) sehingga membuat spons rentan dengan bahaya patogen maupun predator. Spons adalah organisme sederhana dan sesil, selama evolusi mereka telah mengembangkan mekanisme pertahanan kimia untuk melindungi diri dari pesaing dan pemangsa serta mikroorganisme patogen. Spons mampu bertahan terhadap gangguan dari organisme lainnya dengan mengandalkan berbagai senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif ini dihasilkan mikroorganisme simbiotik bukan oleh spons itu sendiri (Belarbi *et al.* 2003).

Spons dianggap sebagai organisme yang potensial karena lebih dari 200 senyawa metabolit baru yang ditemukan setiap tahun, dibandingkan dengan organisme laut lainnya. Spons dianggap sebagai sumber substansi natural yang penting seperti antibiotik, antitumor, antikanker, antiviral, antiplasmodial, dan antiinflamatori. Produk alami laut sebagai hasil metabolit sekunder kemungkinan dihasilkan oleh kehadiran mikroorganisme pada jaringan spons sebagai simbiosis, baik simbiosis intraseluler ataupun ekstraseluler. Banyak kasus yang dapat menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi yang memproduksi kandungan senyawa bioaktif dan bukan inangnya. Senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis spons juga memiliki berbagai aktivitas farmakologis sama seperti inangnya (Tabel 1).

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Tabel 1 Senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri yang berasosiasi dengan spons

Senyawa	Spons	Bakteri yang berasosiasi	Sifat
<i>Cyclo-(L-proline-L-methionine)</i>	<i>Isodictya setifera</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Antibakteri
<i>Tetrabromo-diphenyl ethers</i>	<i>Dysidea sp.</i>	<i>Vibrio sp.</i>	Antibakteri, Sitotoksik
<i>Cyclo-(L-Pro-L-Phe)</i>	<i>Stelletta tenuis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> A72	Antimikroba
<i>Norharman</i>	<i>Hymeniacion perlevis</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> NJ6-3-1	Antimikroba
<i>Triclosan</i>	<i>Xestospongia sp.</i>	<i>Micrococcus luteus</i> R-1588-10	Antimikroba
<i>Acetic acid, -butylester</i>	<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> MAD08	Antimikroba
<i>Trisindoline</i>	<i>Hyrtios altum</i>	<i>Vibrio sp.</i>	Antibiotik
<i>Andrimid</i>	<i>Hyatella sp.</i>	<i>Vibrio sp.</i> M22-1	Antibiotik
<i>Rifamycin SV</i>	<i>Suberea clavata</i>	<i>Salinospora sp.</i>	Antibiotik
<i>Theonegramide</i>	<i>Theonella swinhoei</i>	<i>Entotheonella palauensis</i>	Antifungi
<i>Chitinase</i>	<i>Craniella australiensis</i>	<i>Streptomyces sp.</i> DA11	Antifungi
<i>Theonegramide</i>	<i>Theonella swinhoei</i>	<i>Entotheonella palauensis</i>	Antifungi
<i>Theopalauamide</i>	<i>Theonella swinhoei</i>	<i>Candidatus Entotheonella palauensis</i>	Antifungi
<i>Metacyclo-prodigiosin</i>	<i>Mycale plumose</i>	<i>Saccharopolyspora sp. nov.</i>	Antikanker
<i>Alteramide A</i>	<i>Halichondria okadai</i>	<i>Alteromonas sp.</i>	Antikanker, Sitotoksik
<i>Bromo-alterochromide A</i>	<i>Fascaplysinopsis reticulate</i>	<i>Pseudoalteromonas maricaloris</i>	Sitotoksik
<i>Oleic Acid</i>	<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> MAD08	Antiinflamatori, Antiandrogenik
<i>9-Octa-decenamide-Z</i>	<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> MAD08	Anemiagenik, dermatigenik
<i>n-Hexadecanoic- acid ethyl ester</i>	<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> MAD08	Antioksidan, Nematisida
	<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> MAD08	Hipokolesterolemik, Hemolitik

Sumber : Thomas *et al.* (2010)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Banyak mikroorganisme yang diketahui bersimbiosis dengan spons. Hoffmann *et al.* (2005) menyatakan bahwa bakteri yang bersimbiosis dengan spons dapat mencapai 40% dari jaringan spons dengan kepadatan 10^9 sel bakteri per mm^3 jaringan spons. Interaksi antara spons laut dan hidup mikroorganisme air begitu beragam dan memiliki banyak peran penting. Mikroba yang berada dalam tubuh spons dapat diartikan sebagai makanan, patogen, parasit atau sebagai organisme yang bersimbiosis secara mutualistik. Fungsi simbiosis mutualistik antara spons dengan mikroorganisme tersebut antara lain untuk pertukaran nutrisi, stabilitas struktur spons, pemrosesan limbah metabolit dan produksi metabolit sekunder (Hentschel *et al.* 2001). Mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spons mendapatkan suplai senyawa karbon organik yang dapat dengan mudah digunakan sebagai sumber energi sedangkan spons dapat memanfaatkan senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri simbiosis untuk pertahanan diri (Muller *et al.* 2004).

Hingga saat ini berbagai mikroorganisme yang telah diketahui bersimbiosis dengan spons dikategorikan ke dalam 14 filum bakteri, dua kelompok utama arkea, dan organisme eukariotik berukuran mikroskopik. Berdasarkan analisis sekuen 16S rDNA dan *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) yang dilakukan oleh Taylor *et al.* (2007) kelompok bakteri yang diketahui bersimbiosis dengan spons antara lain *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Poribacteria*, *Proteobacteria*, *Sphirochaetes* dan *Verrucomicrobia*.

Penyakit Infeksi

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, parasit atau fungi. Penyakit ini bersifat sangat dinamis, dapat menyebar secara langsung atau tidak langsung dari satu orang ke orang lain. Bakteri patogen yang menyebabkan penyakit infeksi penting di antaranya Enteropatogenik *Escherichia coli* (EPEC), *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli biasanya mengkolonisasi saluran pencernaan bayi manusia dalam beberapa jam setelah lahir. *E. coli* dan manusia hidup berdampingan dan saling menguntungkan (Kaper *et al.* 2004). Strain *E.coli* yang menyebabkan diare dikelompokkan menjadi patogen berdasarkan faktor virulensinya, strain *E. coli* yang menjadi patogen yaitu enteropatogenik *E. coli* (EPEC), enterohemoragik *E. coli* (EHEC), enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvasif *E. Coli* (EIEC) dan *diffusely adherent E. coli* (DAEC) (Nataro dan Kaper 1998). Strain enteropatogenik *E.coli* (EPEC) adalah penyebab utama diare pada anak-anak di negara berkembang. EPEC memicu pelepasan besar adenosin trifosfat (ATP) dari sel-sel usus inang (Crane *et al.* 2007). EPEC juga diketahui memiliki resistensi terhadap ampisilin dengan menghasilkan enzim β -laktamase. Hingga saat ini penanganan penyakit infeksi yang diakibatkan strain-strain EPEC menjadi masalah rumit karena penyebaran gen-gen enzim β -laktamase diantara strain-strain tersebut (Liu 2009).

P. aeruginosa merupakan bakteri gram negatif yang biasanya mendiami tanah dan permukaan perairan. Bakteri ini kadang juga ditemukan sebagai mikroflora normal pada manusia yang menghuni kulit, mukosa hidung dan tenggorokan (Morrison dan Wenzel 1984). *P. aeruginosa* merupakan salah satu patogen yang paling umum yang menyebabkan infeksi saluran pernapasan, baik akut maupun kronis (Arancibia *et al.* 2002). *P. aeruginosa* juga menyebabkan infeksi saluran kemih bakteremia serta menyebabkan morbiditas dan mortalitas tinggi pada pasien dengan fibrosis kistik (Breidenstein *et al.* 2011). *P. aeruginosa* juga merupakan penyebab infeksi serius pada pasien kanker *immunocompromised*, pasien luka bakardan pasien kateter (Stover *et al.* 2000). Kebanyakan strain *P. aeruginosa* strain yang terlibat dalam infeksi invasif dan toksigenik, masing-masing sebagai akibat dari produksi faktor virulensi permukaan dan faktor virulensi yang disekresikan (Kipnis *et al.* 2006). *P. aeruginosa* sulit diberantas karena resistensi tinggi terhadap antibiotik (Lambert 2002).

S. aureus adalah bakteri gram positif yang sering ditemukan sebagai komensal pada kulit, kelenjar kulit dan selaput lendir, terutama di hidung orang yang sehat (Crossley dan Archer 1997). *S. aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis dan infeksi saluran kemih. Infeksi nosokomial *S. aureus* mempengaruhi aliran darah, kulit, jaringan lunak dan saluran pernapasan bagian bawah. *S. aureus* juga menyebabkan infeksi mendalam seperti endokarditis dan osteomyelitis (Schito 2006). *S. aureus* mempunyai berbagai macam faktor virulensi, yang mencakup produk struktural dan produk yang disekresikan berpartisipasi dalam patogenesis. Salah satu karakteristik penting dari *S. aureus* adalah kemampuan untuk mengeluarkan racun yang merusak membran sel inang. Racun *cytolytic* membentuk β -barrel pori-pori di membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran isi sel dan lisis (Foster 2005).

Kanker

Kanker adalah segolongan penyakit karena sel atau sekelompok sel mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali (membelah melebihi batas normal), invasi (mengganggu dan menyerang jaringan yang berdekatan), dan metastasis (menyebarkan dari satu bagian ke bagian lain dalam tubuh melalui getah bening atau darah). Ketiga sifat ganas kanker membedakan mereka dari tumor jinak yang tidak menyerang atau bermetastasis. Kanker merupakan hasil dari serangkaian peristiwa molekuler fundamental yang mengubah sifat sel normal. Pada sel-sel kanker, sistem kontrol yang mencegah pertumbuhan sel yang berlebihan dan invasi jaringan lain dinonaktifkan. Sel-sel yang tumbuh tersebut mengembangkan karakteristik baru termasuk perubahan dalam struktur sel, penurunan penempelan sel dan produksi enzim baru. Perubahan tersebut memungkinkan sel-sel kanker menyebar dan menyerang jaringan lain (Dhorajiya *et al.* 2012).

Faktor-faktor penyebab kanker digolongkan menjadi faktor fisika, kimia dan biologi. Faktor fisika misalnya energi radiasi, faktor kimia yaitu senyawa kimia baik yang terdapat secara alami maupun ditambahkan secara sengaja ke dalam bahan pangan (senyawa senobiotik) dan faktor biologi misalnya virus. Energi radiasi sinar pengion seperti sinar ultra violet pada sinar matahari, sinar x dan sinar gamma merupakan unsur mutagenik dan karsinogenik bila penggunaannya



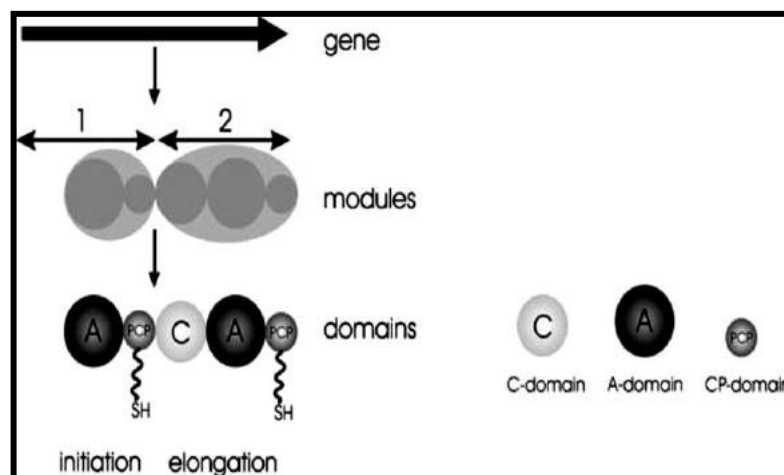
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

tidak tepat. Senyawa senobiotik merupakan senyawa pemicu kanker atau senyawa mutagenik. Senyawa senobiotik dapat berada dalam makanan karena reaksi-reaksi kimia dan biokimia yang terjadi baik selama pengolahan maupun penyimpanan, atau karena kontaminasi. Beberapa jenis virus telah dibuktikan menjadi salah satu pemicu pertumbuhan jenis kanker tertentu. Virus Hepatitis B dapat menjadi pemicu terjadinya kanker hati. Infeksi virus human papiloma dapat meningkatkan resiko kanker rahim. Selain virus, beberapa jenis parasit dilaporkan mampu meningkatkan resiko pertumbuhan jenis kanker tertentu (Cotran *et al.* 1994).

Kanker serviks adalah kanker kedua yang menginfeksi wanita di seluruh dunia dan merupakan kanker utama yang ada pada perempuan di sebagian besar negara berkembang. Bukti epidemiologi molekuler menunjukkan bahwa beberapa jenis *Human PapillomaVirus* (HPV) merupakan penyebab utama kanker serviks invasif dan neoplasia intraepithelial serviks. Lebih dari 80 jenis HPV telah diidentifikasi, dan sekitar 40 dapat menginfeksi saluran genital (DeVilliers 2001).

Nonribosomal Peptida Sintetase (NRPS)

Nonribosomal peptida merupakan kelompok produk alam yang dibentuk dari monomer asam amino sederhana. Nonribosomal peptida banyak dipelajari karena aktivitas biologi di bidang farmasi (Schwarzer *et al.* 2003). Banyak produk nonribosomal peptida yang telah digunakan seperti racun, siderofor, pigmen, antibiotik, sitotoksik dan immunosupresan. Nonribosomal peptida dapat ditemukan di bakteri atau fungi yang disintesis oleh nonribosomal peptida sintetase (NRPS). NRPS merupakan enzim multimodular yang besar yang tersusun dalam modul yang berisi domain-domain spesifik (Gambar 1). Enzim NRPS disusun oleh tiga modul yaitu modul inisiasi, modul elongasi dan modul terminasi. Domain utama pada NRPS yaitu domain adenilasi (A), kondensasi (C), dan *peptidyl carrier protein* (PCP) (Cane dan Walsh 1999).



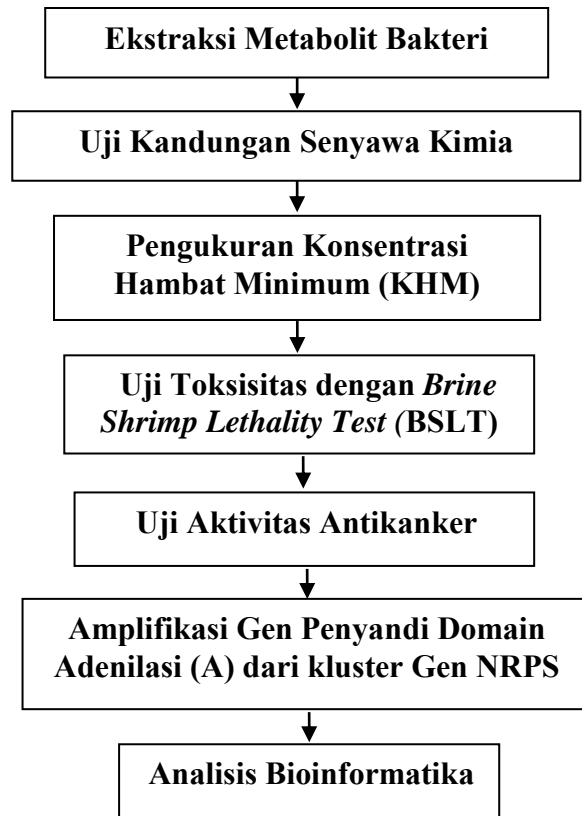
Gambar 1 Struktur gen NRPS (Finking dan Marahiel 2004)

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

METODE

Kerangka Penelitian

Kerangka penelitian ini (Gambar 2) meliputi ekstraksi metabolit bakteri, uji kandungan senyawa kimia, pengukuran nilai KHM, uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), uji aktivitas antikanker, deteksi gen penyandi domain A dari kluster gen NRPS dan analisis bioinformatika.



Gambar 2 Diagram alir prosedur penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari September 2013 sampai Agustus 2014, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Laboratorium Mikrobiologi dan Immunologi, Pusat Studi Satwa Primata, dan Laboratorium Kimia Analitik, Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor.

Ekstraksi Metabolit Bakteri

Isolat bakteri HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 dikultur dalam 1 L media *Sea Water Complete* (SWC) cair yang terdiri atas 5 g pepton, 1 g yeast extract, 3 mL gliserol, 250 mL air Laut (didapat dari pedagang di bogor) dan 750 mL

Aquades dan diinkubasi dalam inkubator berfluktuasi (*shaker*) dengan kecepatan 100 rpm pada 30 °C selama 72 jam, kemudian ditambahkan 1 L etil asetat dan diaduk selama 12 jam. Lapisan etil asetat dievaporasi dan ekstrak yang diperoleh disimpan pada suhu 5 °C (Muller *et al.* 2004).

Uji Kandungan Senyawa Kimia

Uji kandungan senyawa kimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons. Uji kandungan senyawa kimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji tanin, uji triterpenoid dan steroid (Harborne 1987).

Uji Alkaloid dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 0.5 g ekstrak kasar metabolit bakteridan 5 mL asam klorida 10% kemudian dikocok dan ditambah 5 mL larutan amoniak 10%. Selanjutnya diekstraksi dengan kloroform dan diuapkan. Residu yang terbentuk ditambah 1.5 mL asam klorida 2% dan dibagi dalam dua tabung. Tabung pertama ditambah 2-3 tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih kekuningan menunjukkan adanya alkaloid. Tabung kedua ditambah 2-3 tetes pereaksi Dragendorff, jika terbentuk endapan merah bata menunjukkan adanya alkaloid.

Uji flavonoid dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 0.5 g ekstrak dengan 10 mL aquades, dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Tiga mL filtrat ditambah serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat dan ditambah 2 mL amil-alkohol. Campuran dikocok dan dibiarkan memisah. Jika terbentuk warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan alkohol menunjukkan senyawa golongan flavonoid.

Uji steroid dan triterpenoid dilakukan dengan mengekstraksi mencampurkan sebanyak 0.5 g ekstrak dengan 10 mL eter lalu disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambah pereaksi Liebermann-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrat–1 tetes H₂SO₄ pekat). Jika terbentuk warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid sedangkan warna merah atau ungu menunjukkan triterpenoid.

Uji saponin dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 0.5 g ekstrak dengan 10 mL aquades, dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Sebanyak 3 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok dan biarkan selama 10 menit. Jika terbentuk busa yang stabil pada penambahan 1 mL HCl 2N menunjukkan adanya saponin.

Uji tanin dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 0.5 g ekstrak dengan 10 mL aquades, dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Sebanyak 1 mL filtrat ditambah beberapa tetes FeCl₃ 1%. Jika terbentuk warna biru tua/hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pengukuran KHM ekstrak kasar bakteri dengan menggunakan metode difusi agar. Ekstrak dilarutkan dalam etil asetat yang kemudian diteteskan pada kertas cakram 5 mm (Whatman) sehingga didapat konsentrasi ekstrak pada kertas cakram sebesar 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1

mg/mL dan 0.05 mg/mL. Kertas cakram dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40 °C. Setelah itu, kertas cakram disterilisasi di bawah sinar UV selama dua jam dan dimasukkan ke dalam agar cawan yang telah diinokulasi 1% (v/v) mikroba uji (konsentrasi 1×10^6 CFU/mL, OD_{620} 0.45) yaitu *P. aeruginosa*, *E.coli*, EPEC, *S. aureus*, dan *B. subtilis*. Cawan diinkubasi selama tiga jam untuk mengoptimalkan difusi ekstrak bakteri dalam media. Diameter zona penghambatan diukur setelah inkubasi selama 24 jam pada 37 °C dan dihitung nilai KHM. Kertas cakram kontrol negatif direndam dengan pelarut etil asetat sedangkan kertas cakram kontrol positif direndam dengan larutan ampisilin dan dibuat dengan cara yang sama (Sudirman 2010).

Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT terhadap larva *A. salina*. Penetasan *A. salina* dilakukan dengan cara memasukkan setengah sendok teh telur ke dalam air laut dan diberi aerator dan sumber cahaya. Larva yang digunakan untuk uji toksisitas adalah larva yang aktif. Sebanyak 20 larva *A. salina* ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi ekstrak dengan berbagai konsentrasi, lalu ditambahkan air laut hingga volume akhir adalah 4 mL. Konsentrasi akhir dalam tabung setelah penambahan air laut adalah 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL dan 0 µg/mL (kontrol). Selanjutnya tabung diinkubasi selama 24 jam. Kematian larva pada setiap konsentrasi dicatat dan dibandingkan dengan kontrol, dihitung lalu persentase kematian dengan rumus (Meyer *et al.* 1982) :

$$\% \text{ kematian} = \frac{(A-B)}{C} \times 100\%$$

A : Rata-rata jumlah kematian perlakuan (diberi ekstrak)

B : Rata-rata jumlah kematian kontrol (tidak diberi ekstrak)

C : Jumlah larva awal

Nilai kematian organisme uji 50% (LC₅₀) ditentukan dengan menggunakan kurva hubungan antara logaritma konsentrasi ekstrak (x) dan nilai probit dari persentase kematian larva udang (y) (Lampiran 1). Analisis probit yang digunakan berdasarkan dari metode Finney dan Stevens (1948).

Uji Aktivitas Antikanker

Uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTT menurut Thakur *et al.* (2005) dan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi, Pusat Studi Satwa Primata (PSSP), IPB. Sel kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker leher rahim yaitu sel HeLa. Sel kanker dikulturkan di dalam *Dubecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) dan diinokulasikan ke dalam sumuran dengan jumlah inokulan 100 µL (kepadatan 5×10^3 sel/sumuran) selama 24 jam. Sebanyak 100 µL ekstrak aktif dengan konsentrasi 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.2 µg/mL, 15.6 µg/mL, 7.8 µg/mL dan 0 µg/mL (kontrol) ditambahkan pada inokulan kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya setiap sumuran ditambahkan 100 µL 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-difeniltetrazolium bromida

(MTT) dan diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO₂. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan. Formazan dilarutkan dalam larutan etanol. Nilai absorbansi dibaca dengan alat *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader* pada panjang gelombang 550 nm. Persentase penghambatan sel HeLa dihitung dengan rumus (Patel *et al.* 2009) :

$$\% \text{ Penghambatan} = 1 - \frac{A}{B} \times 100\%$$

A : Rata-rata absorban perlakuan (diberi ekstrak)

B : Rata-rata absorban kontrol (tidak diberi ekstrak)

Nilai penghambatan sel HeLa50% (IC₅₀) ditentukan dengan menggunakan kurva hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) dan nilai persentase penghambatan sel HeLa (y) (Lampiran 2).

Amplifikasi DNA Penyandi Domain Adenilasi (A)

Tahap ini terdiri atas isolasi DNA genom, amplifikasi fragmen DNA penyandi domain A dari kluster NRPS dan analisis bioinformatika. Isolasi DNA genom dilakukan menggunakan metode lisis dengan *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Sambrook dan Russel 2001). Amplifikasi gen penyandi domain A dari NRPS dilakukan dengan mengikuti metode Schirmer *et al.* (2005). Amplifikasi dilakukan dengan mencampurkan berturut-turut 20 µl ddH₂O, 25 µl master mix taq polimerase PCR, 1.5 µl primer dan 2 µl template. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi domain A yaitu *forward*: 5'-AARDSIGGIGSIGSITAYBICC-3', *reverse*: 5'-CKRWAICCICKIAIYTTIAYYT G-3' (Schirmer *et al.* 2005). Reaksi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus yang terdiri dari beberapa tahap yaitu predenaturasi selama 5 menit dan denaturasi selama 1 menit pada suhu 94 °C, *annealing* pada 50 °C selama 1 menit, polimerisasi pada 72 °C selama 1 menit, dan *post PCR* dilakukan pada suhu 72 °C selama 10 menit. Amplikon fragmen DNA penyandi domain adenilasi (A) divisualisasi menggunakan teknik elektroforesis dengan gel agarosa (1% b/v), pewarnaan molekul DNA dilakukan menggunakan etidium bromida (5 µg/ mL). Isolat yang mempunyai gen penyandi domain A menunjukkan terbentuknya pita berukuran 1000 pb.

Analisis Bioinformatika

Hasil amplifikasi gen disekuen menggunakan jasa 1st Base (PT Genetika Sains Indonesia). Sekuen DNA diedit dengan perangkat lunak *Bioedit* dan dianalisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tools* protein (BLASTX) yang tersedia di situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Sekuen DNA yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan sekuen yang ada di *Genbank* (NCBI) menggunakan program *BlastX* sehingga diperoleh beberapa sekuen lain yang memiliki kemiripan terdekat. Sekuen DNA diterjemahkan ke dalam runutan protein menggunakan *ExPASy Molecular Biology* untuk membuat pohon filogenetik. Pohon filogenetik dibuat dengan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Uji Kandungan Senyawa kimia

Uji kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri HAL-74, HAA-01 dan HAL-13. Uji yang dilakukan adalah uji alkaloid, uji flavonoid, uji steroid dan triterpenoid, uji saponin dan uji tanin. Hasil identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder menunjukkan adanya kandungan flavonoid dan steroid pada ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons (Tabel 2). Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-13 dan HAA-01 mengandung senyawa golongan steroid sedangkan ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 mengandung senyawa golongan flavonoid. Semua ekstrak kasar metabolit isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons menunjukkan hasil yang negatif terhadap uji alkaloid, terpenoid, saponin dan tanin.

Tabel 2 Kandungan senyawa kimia ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons

Golongan senyawa	Ekstrak kasar metabolit		
	HAL-74	HAA-01	HAL-13
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	-	-
Steroid	-	+	+
Terpenoid	-	-	-
Saponin	-	-	-
Tanin	-	-	-

Keterangan : + = hasil uji positif, - = hasil uji negatif

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons ditunjukkan dengan adanya zona hambat. Zona penghambatan merupakan daerah jernih di sekitar kertas cakram, dimana pada daerah tersebut tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri. Ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons menunjukkan aktivitas antibakteri yang berbeda-beda. Diameter zona hambat ekstrak kasar metabolit pada berbagai konsentrasi terhadap lima bakteri uji sangat bervariasi. Secara umum terlihat semakin besar konsentrasi ekstrak kasar metabolit yang diberikan, semakin besar zona hambatnya (Tabel 3). Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bakteri uji yang sama diberikan ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 pada konsentrasi yang sama menghasilkan zona hambat yang berbeda, selain itu hasil menunjukkan terdapat zona hambat yang sama pada kelima isolat uji setelah diberi ekstrak yang sama dengan konsentrasi yang sama juga.

Tabel 3 Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap berbagai bakteri uji

Bakteri uji	Zona Hambat (mm) pada berbagai konsentrasi ekstrak (mg/mL)							
	1	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	
HAL-74	EC	3.5	1.5	1	0.75	0.5	0.25	-
	EPEC	2	1.5	1	0.75	0.5	0.25	-
	PA	3	2.5	2	1.5	0.5	0.25	-
	SA	3.5	1	1	1	0.5	-	-
	BS	2.5	1.5	1	0.5	0.25	0.25	-
HAA-01	EC	5	4	3.5	3	1	0.25	-
	EPEC	1.5	1	0.75	0.5	0.25	-	-
	PA	2.5	1.5	1	0.5	0.25	-	-
	SA	5	3	1.5	1	0.5	0.25	-
	BS	8	4	3	1	0.75	0.5	-
HAL-13	EC	0.25	-	-	-	-	-	-
	EPEC	0.25	-	-	-	-	-	-
	PA	0.25	-	-	-	-	-	-
	SA	0.25	-	-	-	-	-	-
	BS	0.25	-	-	-	-	-	-

Keterangan : EC = *E. coli* BS = *B. subtilis* PA = *P. aeruginosa* SA = *S. Aureus* - = tidak ada zona hambat

Tingkat aktivitas antibakteri suatu ekstrak diketahui melalui nilai konsentrasi hambat minimum (KHM). KHM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah senyawa antimikrob yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Wahi *et al.* 2011). Nilai KHM ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap bakteri uji berkisar antara 0.1 mg/mL sampai 1 mg/mL (Tabel 4).

Tabel 4 Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap bakteri uji

Bakteri Uji	KHM (mg/mL)		
	HAL-74	HAA-01	HAL-13
<i>Escherichia coli</i>	0.1	0.1	1
EPEC	0.1	0,2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.1	0.2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	0.1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	0.1	1

Hasil pengukuran KHM menunjukkan bahwa nilai KHM ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 dan HAA-01 terhadap bakteri uji berkisar antara 0.1-0.2 mg/mL. Nilai KHM ekstrak kasar metabolit isolat HAL-13 sebesar 1 mg/mL terhadap

semua bakteri uji. Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit HAL-74 dan HAA-01 tergolong sedang dan aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit HAL-13 tergolong lemah. Holetz *et al.* (2002) menyebutkan bahwa aktivitas antimikrob suatu ekstrak dikatakan baik jika nilai KHM di bawah 0.1 mg/mL, moderat jika nilai KHM 0.1-0.5 mg/mL, lemah jika nilai KHM 0.5-1 mg/mL dan tidak aktif jika nilai KHM lebih dari 1 mg/mL. Berdasarkan nilai KHM, ekstrak kasar metabolit HAL-74 memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap *E. coli*, EPEC, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dibanding *S. aureus*. Ekstrak kasar metabolit HAA-01 memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap *E. coli*, *B. subtilis* dan *S. aureus* dari pada EPEC dan *P. aeruginosa*. Sedangkan ekstrak kasar metabolit HAL-13 menunjukkan aktivitas antibakteri yang sama terhadap semua bakteri uji.

Uji Toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yaitu dengan menghitung jumlah larva *A. salina* yang mati setelah penambahan ekstrak kasar metabolit setelah 24 jam perlakuan yang selanjutnya dihitung persentase kematian dan nilai LC₅₀. Uji toksisitas menunjukkan adanya fenomena *dose dependent response*, dimana efek toksisitas meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Efek toksisitas ekstrak kasar metabolit bakteri akan menyebabkan larva *A. salina* mati. Hasil uji toksisitas ekstrak kasar metabolit bakteri terhadap larva *A. salina* menunjukkan bahwa ekstrak kasar metabolit tiap isolat bakteri menghasilkan persentase kematian yang beragam pada tiap konsentrasinya. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar metabolit bakteri yang diberikan, semakin tinggi persentase kematian *A. salina* (Tabel 5).

Tabel 5 Aktivitas toksisitas ekstrak kasar metabolit bakteri terhadap larva *A. salina*

Konsentrasi (µg/mL)	Kematian (%)		
	HAL-74	HAA-01	HAL-13
0	0	0	0
10	0	0	6.7
100	15	6.7	16.7
250	63.3	13.3	40
500	100	36.6	58.3
1000	100	100	100

Efek toksistas ekstrak kasar metabolit bakteri terbesar terdapat pada konsentrasi 1000 µg/ml dengan persentase kematian larva *A. salina* sebesar 100%, sedangkan efek toksisitas terendah terdapat pada konsentrasi 10 µg/ml dengan persentase kematian *A. salina* berkisar 0 sampai 6.7%. Ekstrak kasar metabolit isolat Hal-13 memiliki toksistas lebih baik dibanding ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 dan HAA-01 pada konsentrasi 10 dan 100 µg/mL, sedangkan pada konsentrasi 250 dan 500 µg/mL ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 lebih toksik dibanding ekstrak kasar metabolit isolat HAA-01 dan HAL-13.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Toksisitas ekstrak kasar metabolit bakteri diketahui melalui nilai LC_{50} (*Median Lethal Concentration*) yaitu konsentrasi dimana 50% larva *A. salina* mati setelah diberikan perlakuan ekstrak. Hasil penghitungan nilai LC_{50} ini penting sebagai langkah awal untuk menyeleksi isolat bakteri yang berpotensi menghasilkan senyawa antikanker. Nilai LC_{50} yang didapatkan berkisar antara 124.35 $\mu\text{g/mL}$ sampai 556.55 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 6). Hal ini berarti semua ekstrak bakteri bersifat toksik. Menurut Meyer *et al.* (1982), suatu ekstrak dikatakan toksik bila memiliki nilai LC_{50} di bawah 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan tidak toksik bila nilai LC_{50} di atas 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 6 Nilai LC_{50} BSLT ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons

Ekstrak kasar metabolit	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HAL-74	124.35
HAA-01	556.55
HAL-13	448.43

Uji Aktivitas Antikanker

Pengukuran aktivitas antikanker ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons menggunakan metode uji MTT dengan sel HeLa sebagai model sel kanker serviks. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa. Aktivitas sitotoksik ekstrak kasar metabolit bakteri terhadap sel HeLa dapat diamati dari nilai absorbansi (Tabel 7) yang selanjutnya dihitung persentase penghambatan sel HeLa.

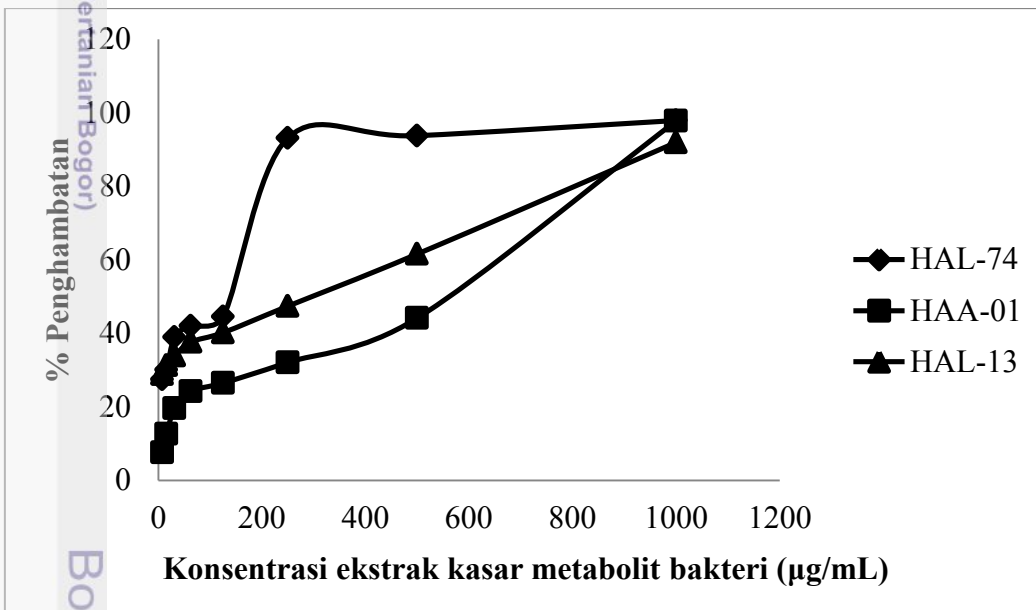
Tabel 7 Rata-rata nilai absorbansi sel HeLa pada berbagai konsentrasi ekstrak kasar metabolit bakteri

Konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata nilai absorban sel HeLa		
	HAL-74	HAA-01	HAL-13
0	0.557	0.539	0.546
7.812	0.396	0.505	0.389
15.625	0.382	0.477	0.376
31.25	0.333	0.439	0.361
62.5	0.317	0.414	0.341
125	0.303	0.402	0.327
250	0.037	0.371	0.287
500	0.034	0.305	0.21
1000	0.011	0.012	0.044

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Aktivitas sitotoksik ekstrak kasar metabolit bakteri dengan metode uji MTT dievaluasi dengan metode kolorimetrik. Prinsip pengujian ini berdasarkan pada kemampuan enzim reduktase mitokondria dehidrogenase pada sel yang aktif untuk mengubah larutan garam tetrazolium menjadi suatu produk formazan yang tidak larut air. Jumlah formazan yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Kristal violet formazan yang terbentuk terlebih dahulu dilarutkan dengan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) sehingga membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV (Sieuwerts *et al.* 1995). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak aktif yang diberikan maka semakin banyak sel yang mati sehingga semakin sedikit enzim reduktase mitokondria dehidrogenase yang bekerja. Hal ini menyebabkan semakin sedikit kristal violet formazan yang dihasilkan sehingga absorbansinya juga rendah dan sebaliknya. Semakin rendah konsentrasi ekstrak aktif yang diberikan maka semakin sedikit sel yang mati sehingga semakin banyak enzim reduktase mitokondria dehidrogenase yang bekerja. Hal ini menyebabkan semakin banyak kristal violet formazan yang dihasilkan sehingga absorbansinya menjadi tinggi.

Aktivitas antikanker ekstrak kasar metabolit bakteri terhadap sel HeLa dilihat dari persentase penghambatan sel HeLa. Secara keseluruhan terlihat semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin tinggi juga persentase penghambatan sel kanker Hela (Gambar 3).



Gambar 3 Efek sitotoksik ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap penghambatan sel HeLa

Efek sitotoksik ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons akan menyebabkan sel HeLa mati. Efek sitotoksik ekstrak kasar metabolit bakteri terbesar terdapat pada konsentrasi 1000 µg/ml. Ekstrak kasar metabolit HAL-13 memiliki aktivitas antikanker lebih baik dibanding ekstrak HAL-74 dan HAA-01 pada konsentrasi rendah, sedangkan pada konsentrasi sekitar 100 sampai 1000 µg/mL ekstrak kasar metabolit HAL-74 menunjukkan aktivitas antikanker terbaik dibandingkan ekstrak HAA-01 dan HAL-13. Pada konsentrasi sekitar 300

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumarkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

sampai 1000µg/mL ekstrak kasar metabolit HAL-74 menunjukkan efek sitotoksitas yang relatif sama dan tidak ada peningkatan persentase penghambatan yang signifikan. Ekstrak kasar metabolit HAL-13 menunjukkan peningkatan persentase penghambatan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kasar metabolit yang diberikan. Hal yang sama juga terlihat pada ekstrak kasar metabolit HAA-01 yang menunjukkan peningkatan efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan dan pada konsentrasi 1000µg/mL ekstrak kasar metabolit HAA-01 menunjukkan persentase penghambatan yang lebih besar dibandingkan ekstrak kasar metabolit HAL-13.

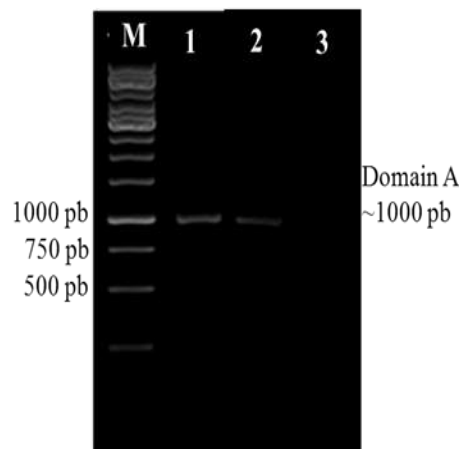
Aktivitas antikanker ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons terhadap kultur sel HeLa diketahui melalui nilai IC₅₀ (*Median Inhibition Concentration*). Menurut *National Cancer Institut* (NCI) nilai IC₅₀ adalah konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker sebesar 50% (Boyd *et al.* 1992). Data uji aktivitas antikanker menunjukkan bahwa ekstrak kasar metabolit tiap bakteri memiliki nilai IC₅₀ yang berbeda-beda. Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 mempunyai aktivitas antikanker yang paling baik dibanding dengan isolat bakteri yang lainnya (Tabel 8).

Tabel 8 Nilai IC₅₀ ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons

Ekstrak kasar metabolit	IC ₅₀ (µg/mL)
HAL-74	134.9
HAA-01	463
HAL-13	309

Amplifikasi DNA Penyandi Domain Adenilasi (A)

Hasil amplifikasi DNA penyandi domain A menunjukkan isolat HAL-74 dan HAA-01 memiliki DNA penyandi domain A dengan ukuran 1000 pb dan DNA penyandi domain A isolat HAL-13 tidak terdeteksi (Gambar 4).



Gambar 4 Pita DNA penyandi domain A yang berukuran 1000 pb, M = Marker 1 kb, Lane 1 = HAL-74, Lane 2 = HAA-01, Lane 3 = HAL-13

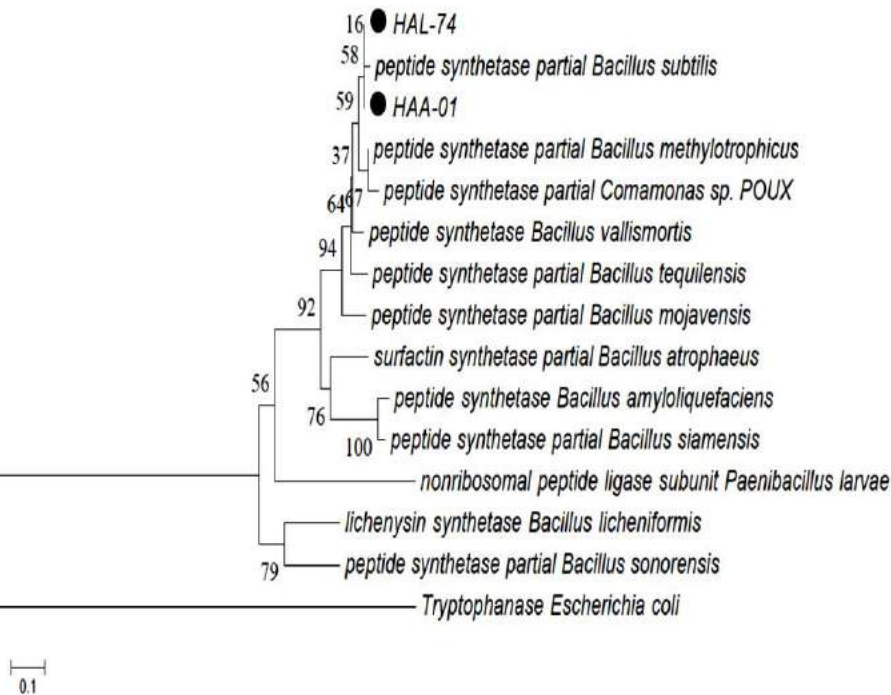
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hasil sekuensing DNA penyandi domain A yang teramplifikasi diedit dengan software Bioedit (Lampiran 3) sehingga didapatkan sekuen DNA penyandi domain A (Lampiran 4). Hasil analisis bioinformatika sekuen fragmen DNA penyandi domain A menggunakan program BLASTX menunjukkan bahwa sekuen fragmen pengkode domain A isolat HAL-74 memiliki homologi sebesar 96% dengan kluster gen NRPS *Comamonas* sp. POUX dan sekuen domain A isolat HAA-01 memiliki homologi sebesar 99% dengan peptida sintetase *B. Subtilis* (Tabel 9).

Tabel 9 Analisis bioinformatika sekuen fragmen DNA penyandi domain A menggunakan program BLASTX

Kode isolat	Homologi	Identitas (%)	<i>e-value</i>	No akses
HAL-74	NRPS <i>Comamonas</i> sp. POUX	96	0.0	AHG59387.1
HAA-01	Peptida sintetase <i>B. Subtilis</i>	99	0.0	WP_029317185.1

Hasil konstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuen asam amino domain A dengan metode *Neighbor-Joining* menunjukkan bahwa HAL-74 dan HAA-01 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan sekuen peptida sintetase dari *B. Subtilis* (Gambar 5).



Gambar 5 Pohon filogenetik berdasarkan sekuen asam amino domain A yang dikonstruksi dengan metode *Neighbor-Joining* dengan nilai ulangan bootstrap 1000. Keterangan: Angka 0.1 menunjukkan skala jarak kekerabatan (*distance scale*).

Pembahasan

Identifikasi kandungan metabolit sekunder merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian pencarian senyawa bioaktif baru dari bahan alam yang dapat menjadi prekursor bagi sintesis obat baru atau prototipe obat beraktivitas tertentu (Harborne 1987). Hasil identifikasi menunjukkan ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 mengandung flavonoid sedangkan ekstrak kasar metabolit isolat HAA-01 dan HAL-13 mengandung senyawa steroid. Flavonoid telah dikenal memiliki beragam aktivitas biologi, termasuk sebagai antibakteri dan antikanker. Aktivitas antibakteri flavonoid dipengaruhi oleh kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut serta dengan dinding sel bakteri (Tsuchiya *et al.* 1996). Pendapat lain menyebutkan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri (Estrela *et al.* 1995; DiCarlo *et al.* 1999). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenolik dari kelompok flavonoid telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan sel kanker. Flavonoid merupakan molekul bioaktif yang memiliki efek antikarsinogenik (Ramos 2007). Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis dan pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al.* 2003). Senyawa steroid memiliki aktivitas antibakteri, namun mekanisme steroid dalam menghambat pertumbuhan bakteri belum diketahui secara pasti.

Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Senyawa antibakteri ketiga ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons termasuk antibakteri berspektrum luas. Ekstrak kasar metabolit bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif (*S. aureus* dan *B. subtilis*) dan bakteri Gram negatif (*E. coli*, EPEC dan *P. aeruginosa*). Kemampuan setiap ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri berbeda-beda, hal ini terlihat dari perbedaan zona hambat yang terbentuk. Besarnya zona hambat yang dihasilkan senyawa bioaktif dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia dari senyawa tersebut. Semakin besar berat molekul senyawa bioaktif akan memperbesar zona hambat yang dihasilkan. Faktor lain yang mempengaruhi penghambatan terhadap mikroorganisme antara lain adalah kepadatan populasi sel, kepekaan mikroba target terhadap senyawa antimikrob, kandungan bahan organik dan lama waktu mikroba target terpapar bahan antimikrob (Lay 1994). Aktivitas penghambatan terjadi melalui banyak mekanisme. Mekanisme kerja senyawa antimikroba dapat berupa merusak dinding sel hingga terjadi lisis, mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga sel bocor, menyebabkan denaturasi protein sel, menghambat kerja enzim dalam sel, merusak molekul protein, merusak asam nukleat dan menghambat sintesis asam nukleat (Prescott *et al.* 2005).

Pengukuran KHM penting untuk mengetahui resistensi mikroorganisme terhadap suatu agen antimikrob dan untuk memantau aktivitas agen antimikrob baru. KHM umumnya dianggap sebagai pengukuran laboratorium aktivitas suatu agen antimikrob yang paling dasar. Secara klinis, KHM tidak hanya digunakan



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

untuk menentukan jumlah antibiotik yang akan diberikan kepada pasien tetapi juga digunakan untuk menentukan jenis antibiotiknya (Wahi *et al.* 2011). Uji KHM merupakan uji yang bersifat tidak konstan bergantung dari ukuran inokulum, bakteri uji, kuantitas bakteri target, komposisi kultur medium, pertumbuhan isolat yang berbeda dan kondisi inkubasi seperti temperatur, pH dan aerasi (Tokasaya 2010).

Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons mampu menghasilkan senyawa antibakteri. Anand *et al.* (2006) melaporkan bahwa *B. subtilis* yang bersimbiosis dengan spons dari perairan India menghasilkan senyawa antimikrob berspektrum luas. Bakteri *Chromohalobacter* sp. yang bersimbiosis dengan spons asal perairan Kepulauan Seribu menghasilkan senyawa inhibitor protease yang mampu menghambat aktivitas protease dari bakteri patogen *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* (Nurhayati *et al.* 2006). Selain itu, *Vibrio* sp yang bersimbiosis dengan *Hyatella* sp, menghasilkan senyawa peptida yang bersifat antibakteri (Oclarit *et al.* 1994).

Dalam pencarian bahan bioaktif yang mempunyai aktivitas antikanker digunakan beberapa uji yaitu uji penapisan bioaktivitas, uji sitotoksik *in vitro* dan *in vivo*. Penapisan bioaktivitas dapat menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan uji pendahuluan dan digunakan untuk penapisan aktivitas antikanker serta sebagai alternatif metode yang murah untuk uji toksisitas (Hamburger dan Hostettmann 1991). BSLT dianggap masih relevan dalam penapisan senyawa yang bersifat sitotoksik dan dibuktikan berkorelasi positif dengan hasil uji sitotoksik pada sel kanker (Carballo *et al.* 2002). Larva *A. salina* digunakan sebagai hewan uji karena mudah dibiakkan dan harganya yang murah, waktu siklus hidup yang cepat dan sifatnya yang peka terhadap bahan uji. Sifat peka *A. salina* disebabkan oleh keadaan membran kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Meyer *et al.* 1982). Larva *A. salina* yang digunakan sebagai hewan uji BSLT yang berumur 24 jam karena pembelahan *A. salina* pada rentang waktu 0-24 jam mengalami pembelahan sel yang cepat seperti pembelahan sel kanker (Anderson *et al.* 1991). Beberapa hal yang menentukan keakuratan nilai toksisitas yang didapatkan antara lain, suhu inkubasi telur dan suhu air laut, umur larva yang digunakan, dan salinitas air laut yang digunakan (Sargeloos *et al.* 1978).

Hasil BSLT menunjukkan ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker. Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 bersifat paling toksik, hal ini terlihat dari nilai LC_{50} . Nilai LC_{50} ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 lebih kecil dibanding ekstrak kasar metabolit HAL-13 dan HAA-01. Nilai LC_{50} berbanding terbalik dengan toksisitasnya, semakin kecil nilai LC_{50} semakin toksik suatu ekstrak. Hasil uji BSLT ini sesuai dengan hasil uji aktivitas antikanker. Ekstrak kasar metabolit HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 mampu menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa. Kemampuan tiap ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker berbeda-beda, hal ini terlihat dari perbedaan Nilai IC_{50} . Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74 menunjukkan aktivitas antikanker terbaik, diikuti HAL-13 dan HAA-01.

Uji sitotoksitas antikanker dapat dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan hewan model atau secara *in vitro* dengan menggunakan sel kultur



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

(*cellline*). Sel kultur adalah sel yang digunakan dalam penelitian yang dikembangkan dan ditumbuhkan atau berproliferasi pada media kultur secara *in vitro*. Pada penelitian ini digunakan sel HeLa sebagai model sel kanker serviks. Sel HeLa merupakan *continous cell line* yang terinfeksi oleh *Human Papiloma Virus* (HPV) yang memiliki gen p53 dan p105Rb dalam bentuk *wild type*. Protein E6 dan E7 yang berasal dari HPV memodulasi sejumlah protein seluler yang berperan dalam apoptosis dan proliferasi sel. Aktivitas proliferasi yang berlebihan pada sel HeLa diakibatkan oleh ikatan antara protein E6 yang berikatan dengan gen p53 sehingga mempercepat degradasi p53 dan stimulasi aktivitas enzim telomerase. Protein E7 berperan dalam meningkatkan aktivitas proliferasi sel melalui hiperfosforilasi p105Rb (DeFilipis *et al.* 2003).

Mekanisme aktivitas antikanker berbeda-beda tergantung dari jenis komponennya. Suatu senyawa bioaktif bersifat sitotoksik umumnya bersifat nukleofilik, sehingga dapat memblokir reaksi kovalen antara derivat karsinogen yang elektrofilik dengan DNA (Murakami *et al.* 1999). Mekanisme kerja antikanker melalui beberapa cara yaitu sebagai antimetabolit, membentuk ikatan kovalen dengan DNA, membentuk ikatan nonkovalen dengan DNA dan menghambat fungsi khromatin (Pratt *et al.* 1994). Senyawa antikanker mempunyai mekanisme yang berbeda dalam menghambat sel-sel kanker. Senyawa-senyawa antikanker dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan targetnya. Senyawa antikanker yang berkaitan dengan siklus sel dibagi menjadi 2 macam, yaitu senyawa antikanker yang membunuh atau menghambat terjadinya siklus sel tertentu dan pada fase tertentu saja, misalnya menghancurkan benang spindel sehingga pembelahan sel terhenti pada metafase (benang spindel terbentuk dari mikrotubul pada metaphase). Perhentian pada metafase menyebabkan kematian sel. Sedangkan mekanisme senyawa antikanker yang lain tidak hanya bekerja pada satu fase saja. Kerjanya adalah membunuh sel yang terlibat dalam siklus sel juga sel-sel di luar siklus sel dengan cara merusak kromosom, menghambat kerja hormon, meningkatkan fungsi sel T, mengikat DNA dan merusaknya (Stringer 2001).

Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa mikroba yang berasosiasi dengan spons menghasilkan senyawa antikanker. Mikroba tersebut diantaranya adalah bakteri dan fungi. Mikroba-mikroba ini diisolasi dari berbagai perairan di dunia. Salah satu bakteri yang menghasilkan senyawa antikanker adalah *Bacillus pumilus* AAS3 yang diisolasi dari spons *Acanthella acuta* (Ramm *et al.* 2004). Senyawa antikanker yang dihasilkan mikroba yang berasosiasi dengan spons termasuk dalam kelompok quinon, steroid, asam lemak ester, asam lemak, diketopiperazin, alkaloid, terpenoid, terpen, trikoverroid, trunan prodigiosin, diglukosil-gliserol, poliketid, siklopeptida, glikogliserolipid dan turunan asam benzoid (Thomas *et al.* 2010).

Bakteri yang menghasilkan senyawa bioaktif mempunyai gen yang menyandikan enzim Poliketida Sintase (PKS) dan Nonribosom Peptida Sintetase (NRPS). PKS dan NRPS merupakan dua jenis enzim yang berperan dalam sintesis bahan alam pada banyak bakteri, cendawan, dan tanaman (Cane *et al.* 1998; Moffit dan Neilan 2003). Banyak senyawa bioaktif yang dihasilkan termasuk ke dalam golongan peptida atau makrolida dan alkaloid dan sintesis oleh PKS dan atau NRPS (Kehr *et al.* 2011). Potensi genetik ketiga isolat bakteri asal spons dalam penelitian ini dipelajari dengan mendeteksi keberadaan gen penyandi

domain A dari kompleks NRPS, sedangkan deteksi keberadaan gen penyandi domain KS dari kompleks PKS telah dilakukan oleh Banoet (2011). Domain ketonase (KS) merupakan domain yang biasanya ada pada masing-masing modul dan menunjukkan tingkat konservasi yang paling tinggi di antara semua domain pada gen PKS (Kim dan Fuerst 2006). Domain adenilasi (A) merupakan domain dengan tingkat konservasi tertinggi dibanding domain yang lain pada gen NRPS (Schirmer *et al.* 2005). Hasil penelitian Banoet (2011) menunjukkan bahwa isolat bakteri HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 terdeteksi memiliki fragmen DNA penyandi domain ketosintase (KS) yang merupakan gen penyandi kompleks gen PKS. Analisis genetik gen penyandi domain A menunjukkan hanya isolat Hal-74 dan HAA-01 yang terdeteksi memiliki fragmen DNA penyandi domain A.

Keberadaan gen penyandi domain KS dan domain A pada isolat HAL-74 dan HAA-01 memungkinkan adanya hibrid PKS dan NRPS. Adanya hibrid PKS-NRPS ini sangat menarik karena akan menambah variasi kombinasi modul biosintesis dalam menghasilkan berbagai senyawa bioaktif karena jumlah dan jenis modul pada PKS maupun NRPS menentukan variasi struktur peptida dan poliketida yang dihasilkannya. Hibrid antara PKS dan NRPS terjadi apabila ditemukan domain PKS atau NRPS dalam satu jalur biosintesis yang sama dalam memproduksi senyawa bahan alam yang sama baik poliketida maupun peptida nonribosom. Banyak produk alam disintesis melalui hibrid PKS dan NRPS. Produk sistem hibrid PKS-NRPS antara lain sintesis antibiotik rapamicin yang terdiri dari 12 modul PKS dan 1 modul NRPS (Aparicio *et al.* 1996). Sintesis yersinia bactin juga melalui hibrid PKS dan NRPS yang terdiri dari 1 modul PKS dan 3 modul NRPS (Cane dan Walsh 1999). Bleomycin (BLM), suatu senyawa antibiotik antikanker yang dihasilkan *Streptomyces verticillus* dan diturunkan dari BLM megasynthetase yang mengandung 1 modul PKS dan 10 modul NRPS module (Shen *et al.* 2001).

Hasil analisis bioinformatika menunjukkan sekuen asam amino penyusun domain A isolat HAL-74 memiliki homologi sebesar 96% dengan domain peptida sintetase dari kluster gen NRPS *Comamonas* sp. POUX dan sekuen domain A isolat HAA-01 memiliki dengan homologi sebesar 99% dengan domain peptida sintetase *B. Subtilis* (Tabel 9). Genus *Bacillus* diketahui merupakan penghasil senyawa metabolit antimikrob dan sitotoksik. Awalnya genus ini sering ditemukan di darat namun juga dilaporkan diisolasi dari bentos laut dan karang lunak (Kapley *et al.* 2007) dan spons laut (Hentschel *et al.* 2001). *B. subtilis* telah dilaporkan oleh Deng *et al.* (2011) mampu menghasilkan senyawa antimikrob yang menghambat pertumbuhan *Erwinia carotovora*.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Ekstrak kasar metabolit isolat HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 memiliki aktivitas antibakteri berspektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan nilai KHM berkisar 0.1 sampai 1 $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit HAL-74 dan HAA-01 termasuk sedang (moderat) sedangkan aktivitas antibakteri ekstrak kasar metabolit HAL-13 termasuk lemah. Uji kandungan senyawa kimia terhadap ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons menunjukkan ekstrak kasar metabolit HAL-13 dan HAA-01 mengandung steroid dan HAL-74 mengandung flavonoid. Ekstrak kasar metabolit HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 bersifat toksik terhadap larva *A. salina* dengan nilai LC_{50} berkisar 345.37 sampai 556.55 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kasar metabolit HAL-74, HAA-01 dan HAL-13 mampu menghambat sel kanker *Hela*. Ekstrak HAL-74 memiliki aktivitas antikanker terbaik dengan nilai IC_{50} sebesar 134.9 $\mu\text{g/mL}$. Isolat HAL-74 dan HAA-01 terdeteksi memiliki DNA penyandi domain A dengan ukuran 1000 pasang basa. Sekuen domain A dari isolat HAL-74 memiliki homologi dengan *Comamonas* sp. POUX sebesar 96% dan HAA-01 memiliki homologi dengan *B. subtilis* sebesar 99%.

Saran

Perlu dilakukan pemurnian ekstrak kasar metabolit bakteri untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni dan dilakukan uji selektivitas terhadap sel normal untuk mengetahui keamanan dari ekstrak kasar metabolit bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand TP, Bhat AW, Shouche YS, Roy U, Siddarth J, Sarma SP. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol Res.* 161:252-262.
- Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, Suffness M. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Anal.* 2:107-111.
- Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay PF. 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene.* 169:9-16.
- Arancibia F, Bauer TT, Ewig S, Mensa J, Gonzalez J, Niederman MS, Torres A. 2002. Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk and prognosis. *Arch Intern Med.* 162: 1849–1858.

- Banoet Y. 2011. Aktivitas senyawa bioaktif antimikrob dari bakteri yang berasosiasi dengan spons *Haliclona* sp. dan telaah genetiknya [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Belarbi EH, Gomez AC, Chisti Y, Camacho FG, Grima EM. 2003. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnol Adv.*21: 585-598.
- Boyd MR, Paull KD, Rubinstein LR. 1992. *Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development*. Vleriote FA, Corbett TH, Baker LH, editor. Hingham (US): Kluwer Academic.
- Breidenstein EBM, Dela Fuente-Nuñez C, Hancock REW. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19:419-426.
- Cane DE, Walsh CT, Khosla C. 1998. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations and mutations. *Science.* 282:63-68.
- Cane DE, Walsh CT. 1999. This parallel and convergent universes of poliketide synthetase and nonribosomal peptide synthetase. *Chem Biol.* 6:319-325
- Carballido JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Gravalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assay to detect in vitro cytotoxicity in marine natural product (methodology article). *BMC Biotechnol.* 2:1-5.
- Castro P, Huber EM .2007. *Marine Biology*. 6th ed. New York (US): The McGraw-Hill Companies.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. 1994. *Pathologic basic of disease*. Philadelphia (PD): WB Saunders Company.
- Crane JK, Shulgina I, Naeher TM. 2007. Ecto-5'-nucleotidase and intestinal ion secretion by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Purinergic Signal.* 3:233–246. doi: 10.1007/s11302-007-9056-0.
- Crossley KB, Archer GL. 1997. The *Staphylococci* in human diseases. *Antimicrob Agents Chemo.* 37: 342–346.
- DeFilipis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. 2003. Endogenous human papilloma virus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation senescens and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cell. *J Virol.* 77(2):1551-1563.
- Deng Y, Zhu Y, Wang P, Zhu L, Zheng J, Li R, Ruan L, Peng D, Sun M. 2011. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSN5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Bacteriol.* 193: 2070-2071.
- DeVilliers EM. 2001. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Rep.* 12:57-63.
- Dhorajiya B, Malani M, Dholakiya B. 2012. Extraction and preservation protocol of anticancer agents from marine world. *J Chem Scien.* 38:1-12.
- DiCarlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65(4):37–53.
- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. 1995. Mechanism of action calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *J Brazil Dent.* 6:85–90.
- Fieseler L, Horn M, Wagner M, Hentschel U. 2004. Discovery of the novel candidate phylum “poribacteria” in marine sponges. *App Environ Microbiol.* 70:3724-3732.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Finking R, Marahiel MA. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptide. *Ann Rev Microbiol.* 58:53–88.
- Finney DJ, Stevens WL. 1948. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika.* 35:191-201.
- Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 3:948-958.
- Gibbs JB. 2000. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Scien.* 287:1969-1972.
- Hamburger M, Hostettmann. 1991. Bioactivity in plant: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* 12:3864-3874.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Niksolihin S, editor. Bandung (ID): ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Hentschel U, Schimid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, Hacker J. 2001. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol.* 55:167–177.
- Hoffmann F, Larsen O, Thiel V, Rapp HT, Pape T, Michelish W, Reither J. 2005. An anaerobic world in sponges. *J Geomic.* 22:1-10.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:35-47.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* 2:123-140.
- Kapley A, Siddiqui S, Misra K, Ahmad SM, Purohitp HJ. 2007. Preliminary analysis of bacterial diversity associated with the porites coral from the Arabian sea. *World J Microbiol Biotechnol.* 23:923-930.
- Kehr JC, Picchi DG, Dittmann E. 2011. Natural product biosynthesis in cyanobacteria : a treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J Org Chem.* 7:1622-1635
- Kim TK, Fuerst JA. 2006. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoseratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environ Microbiol.* 8:1460-1470.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med MalInfect.* 36:78–91.
- Lambert PA. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *JR Soc Med.* 95:22-26.
- Lay KM. 1994. The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in sponges from australia and the mediterranean. *Microb Ecol.* 48:167-177.
- Liu GY. 2009. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Ped Res.* 65:1-7
- Lopez JV, Peterson CL, Willoughby R, Wright AE, Wright E, Zoladz S, Reed JK, Pomponi SA. 2002. Characterization of genetic markers for in vitro cell line identification of the marine sponge *Axinella corrugate*. *The Am Gen Ass.* 93:27-36.
- Meyer BN, Ferrigini RN, Jacobsen LB, Nicholas DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-35.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB Institut Pertanian Bogor

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Meyer BN, Kuever J. 2008. Phylogenetic diversity and spatial distribution of the microbial community associated with the Caribbean deep-water sponge *Polymastia cf. corticata* by 16S rRNA, *aprA*, and *amoA* gene analysis. *Microb Ecol.* 56:306-321.
- Moffitt MC, Neilan BA. 2003. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthase reflect complex pathway association. *J Mol Evol.* 56:446-457.
- Morrison AJ, Wenzel RP. 1984. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 6(3):627-642.
- Müller WEG, Grebenjuk VA, Thakur NL, Thakur AN, Batel R. 2004. Oxygen-controlled bacterial growth in the sponge *Suberites domuncula*: toward a molecular understanding of the symbiotic relationships between sponge and bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 70: 2332-2341.
- Murakami A, Ohgashi A, Koshimazu K. 1999. Chemoprevention : insights into biological mechanisme and promising food factors. *J Food Rev.* 15(3):335-339.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11:142-201.
- Nurhayati T, Suhartono MT, Nuraida L, Poerwanto SB. 2006. Karakterisasi awal inhibitor protease dari bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Hayati J Biosci.* 13:58-64.
- Oclarit JM, Okada H, Ohta S, Kaminura K, Yamaoka Y, Lizuka T, Miyashiro S, Ikegami S. 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios.* 78:7-16.
- Patel S, Gheewala N, Suther A, Shah A. 2009. In-vitro cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line. *IJ pharma and pharmaceu scien.* 1:38-46.
- Peraud O. 2006. Isolation and Characterization of a Sponge-Associated Actinomycete that produces Manzamines. [dissertation]. Maryland (US): University of Maryland at College Park.
- Pratt WB, Ruddon RW, Ensminger D, Maybaum J. 1994. The anticancer drugs. Oxford (UK): Oxford University Press.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2005. *Microbiology*. 6th ed. New York (US): McGraw-Hill Co Inc.
- Proksch P, Edrada RA, Ebel R. 2002. Drugs from the seas-current status and microbial implications. *App Microbiol Biotechnol.* 59:125-134.
- Radjasa OK, Kencana DS, Sabdono A, Hutagalung RA, Lestari ES. 2007. Antibacterial activity of marine bacteria associated with sponge *Aaptos* sp. against multi drugs resistant (MDR) strains. *J Mat Sains.* 12:147-152.
- Ramm W, Schatton W, Wagner-Dobler I, Wray V, Nimtz M, Tokuda H, Enjyo F, Nishino H, Beil W, Heckmann R, Lurtz V, Lang S. 2004. Diglycosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 64:497-504.
- Ramos S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutri Biochem.* 18:427-442.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoid: Promising anticancer agents. *Med Research Rev.* 23(4):519-534.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Sambrook W, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York (US): Gold Spring Harbor Laboratory.
- Sargeloos P, Van Der Wielen CR, Persoone G. 1978. The use *Artemia* nauplii for toxicity test - a critical analysis. *Ecotoxicol and Environ Safety*. 2:249-255.
- Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, Ibrahim F, Delong EF, Hutchinson CR. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene cluster in microorganism associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *App Environ Microbiol*. 71:4840-4849.
- Schito GC . 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 12 (1): 3–8.
- Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*. 20: 275-287.
- Shen B, Du L, Sanchez C, Edwards DJ, Chen M, Murrell JM. 2001. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide–polyketide natural product biosynthesis. *J Industrial Microbiol Biotechnol*. 27:378-385.
- Sieuwert AM, Jan G, Klijn M, Harry A, Peters, Foekens JA. 1995. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay Reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 33:813-823.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonasaeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406:959-964.
- Stringer J . 2001. *Basic Concept of Pharmacology*. 2nd Ed. Singapore (SG): McGraw-Hill Book Co.
- Sudirman LI. 2010. Partial purification of antimicrobial compounds isolated from mycelia of tropical *Lentinus cladopus* LC4. *Hayati J Biosci*. 17:63-67.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol and Evol*. 28:2731-2739.
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71:295-347.
- Thakur AN, Thakur NL, Indap MM, Pandit RA, Datar VV, Muller WEG. 2005. Antiangiogenic, antimicrobial, and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. *Mar Biotechnol*. 7: 245-252.
- Thomas TRA, Kavlekar DV, LokaBharathi PA. 2010. Marine drugs from sponge microbe-association : a review. *Mar Drugs*. 8:1417-1468. doi:10.3390/md8041417
- Tokasaya P. 2010. Sponge-associated bacteria producing antimicrobial compounds and their genetic diversity analysis [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethno*. 50:27–34.

[WHO]^a. World Health Organization. 2014. *Infectious Diseases Health Topic* [Internet]. (diunduh 2014 Agustus 15). Tersedia pada http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/index.html

[WHO]^b. World Health Organization. 2014. *Cancer Health Topic* [Internet]. (diunduh 2014 Agustus 15). Tersedia pada: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>.

Wahi AK, Singh A, Singh AK. 2011. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of some novel triazole. *IJRPC*. 4:1108-1114.

Webster NS, Hill RT. 2001. The culturable microbial community of the great barrier reef sponges *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -proteobacterium. *Mar Biol*. 138:843–851.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Penghitungan % kematian dan nilai LC₅₀ BSLT ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons

HAL 74

Konsentrasi ekstrak (µg/mL)	Log konsentrasi	Rata-rata % kematian	Rata-rata probit
0	0	0	0
10	1	0	0
100	2	15	3.94
250	2.39	43.33	5.36
500	2.69	100	8.09
1000	3	100	8.09

HAA-01

Konsentrasi ekstrak (µg/mL)	Log konsentrasi	Rata-rata % kematian	Rata-rata probit
0	0	0	0
10	1	0	0
100	2	6.66	2.24
250	2.39	13.33	3.88
500	2.69	36.66	4.65
1000	3	100	8.09

HAL-13

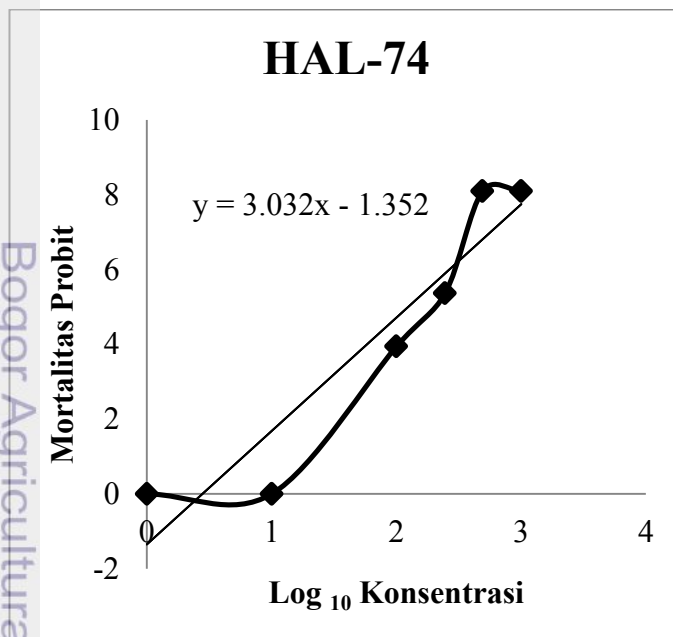
Konsentrasi ekstrak (µg/mL)	Log konsentrasi	Rata-rata % kematian	Rata-rata probit
0	0	0	0
10	1	6.66	3.48
100	2	16.66	4.02
250	2.39	40	4.75
500	2.69	58.33	5.21
1000	3	100	8.09

Contoh penghitungan persentase kematian larva *A. salina*

Jumlah larva awal (C) = 20
 Jumlah larva mati perlakuan (A) = 8
 Jumlah larva mati pada kontrol (B) = 0

$$\begin{aligned} \% \text{ kematian} &= \frac{(A-B)}{C} \times 100\% \\ &= \frac{(8-0)}{20} \times 100\% \\ &= 40\% \end{aligned}$$

Contoh Penghitungan LC₅₀



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Perhitungan LC_{50} :

$$y = 3.032x - 1.352$$

$$5 = 3.032x - 1.352$$

$$x = 2.094$$

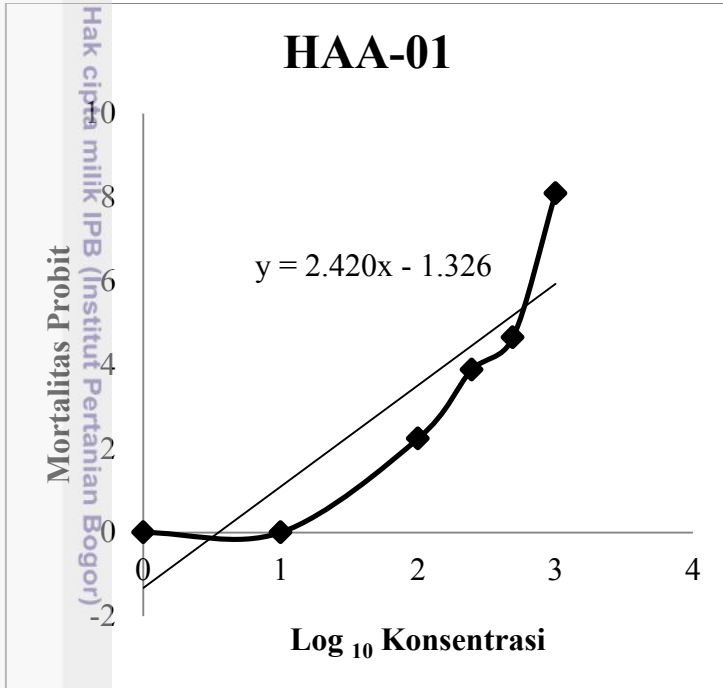
$$10x = 124.35$$

$$LC_{50} = 124.35 \mu\text{g/mL}$$

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang



Hak cipta ini milik IPB (Institut Pertanian Bogor)



Perhitungan LC_{50} :

$$y = 2.420x - 1.326$$

$$5 = 2.420x - 1.326$$

$$x = 2.614$$

$$10x = 556.55$$

$$LC_{50} = 556.55 \mu\text{g/mL}$$

Bogor Agricultural University

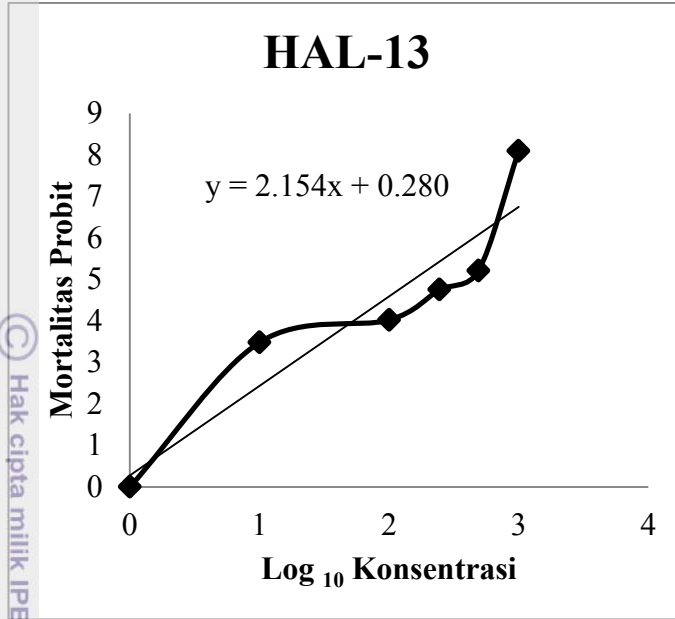
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Perhitungan LC₅₀ :

$$y = 2.154x + 0.280$$

$$5 = 2.154x + 0.280$$

$$x = 2.191$$

$$10^x = 448.437$$

$$LC_{50} = 448.437 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 2 Penghitungan persentase penghambatan sel HeLa dan IC₅₀

Konsentrasi ekstrak (μg/mL)	Rata-rata nilai absorbansi sel HeLa			Rata-rata % Penghambatan		
	HAL-74	HAA-01	HAL-13	HAL-13	HAL-74	HAA-01
7.812	0.396	0.505	0.389	28.82	27.48	7.61
15.625	0.382	0.477	0.376	31.26	30.04	12.67
31.25	0.333	0.439	0.361	33.94	39	19.62
62.5	0.317	0.414	0.341	37.65	42.04	24.25
125	0.303	0.402	0.327	40.21	44.54	26.5
250	0.037	0.371	0.287	47.41	93.17	32.11
500	0.034	0.305	0.21	61.6	93.78	44.18
1000	0.011	0.012	0.044	91.95	97.92	97.8

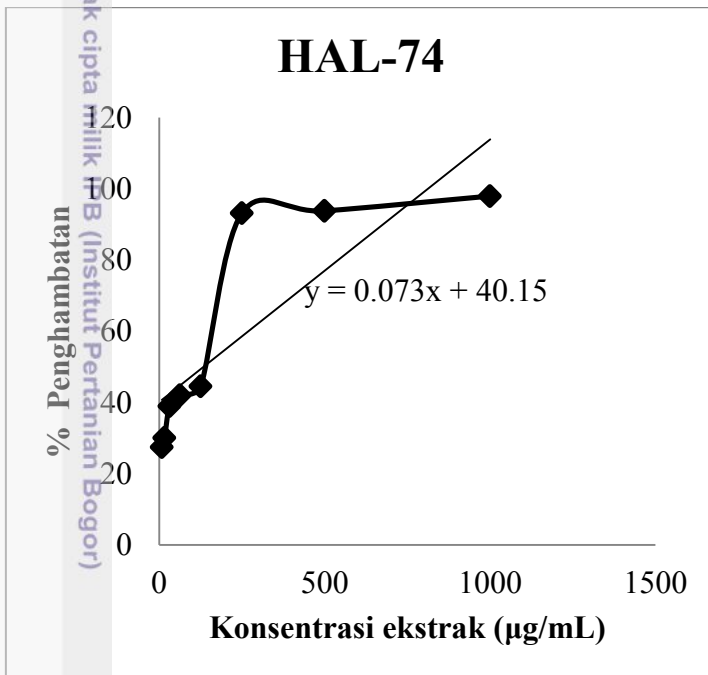
Contoh penghitungan % penghambatan

$$\text{Nilai absorbansi kontrol (B)} = 0.547$$

$$\text{Nilai absorbansi perlakuan (A)} = 0.287$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Penghambatan} &= 1 - \frac{A}{B} \times 100\% \\
 &= 1 - \frac{0.287}{0.547} \times 100\% \\
 &= 48\%
 \end{aligned}$$

Contoh Penghitungan IC₅₀



Perhitungan IC₅₀ :

$$y = 0.073x + 40.15$$

$$50 = 0.073x + 40.15$$

$$x = 134.9$$

$$IC_{50} = 134.9 \mu\text{g/mL}$$

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

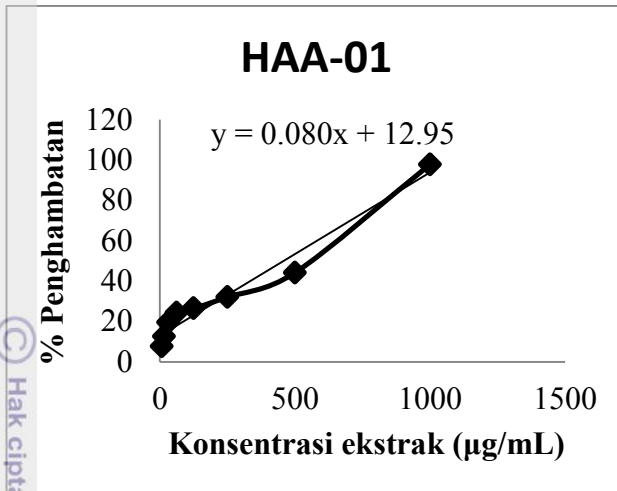
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



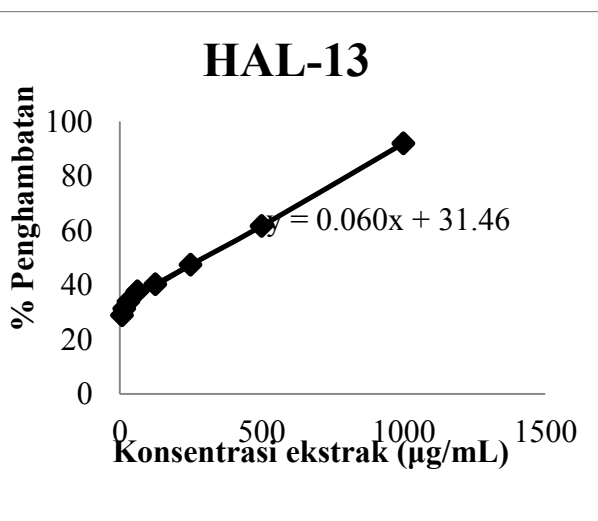
Perhitungan IC_{50} :

$$y = 0.080x + 12.95$$

$$50 = 0.080x + 12.95$$

$$x = 463.125$$

$$IC_{50} = 463.125 \mu\text{g/mL}$$



Perhitungan IC_{50} :

$$y = 0.060x + 31.46$$

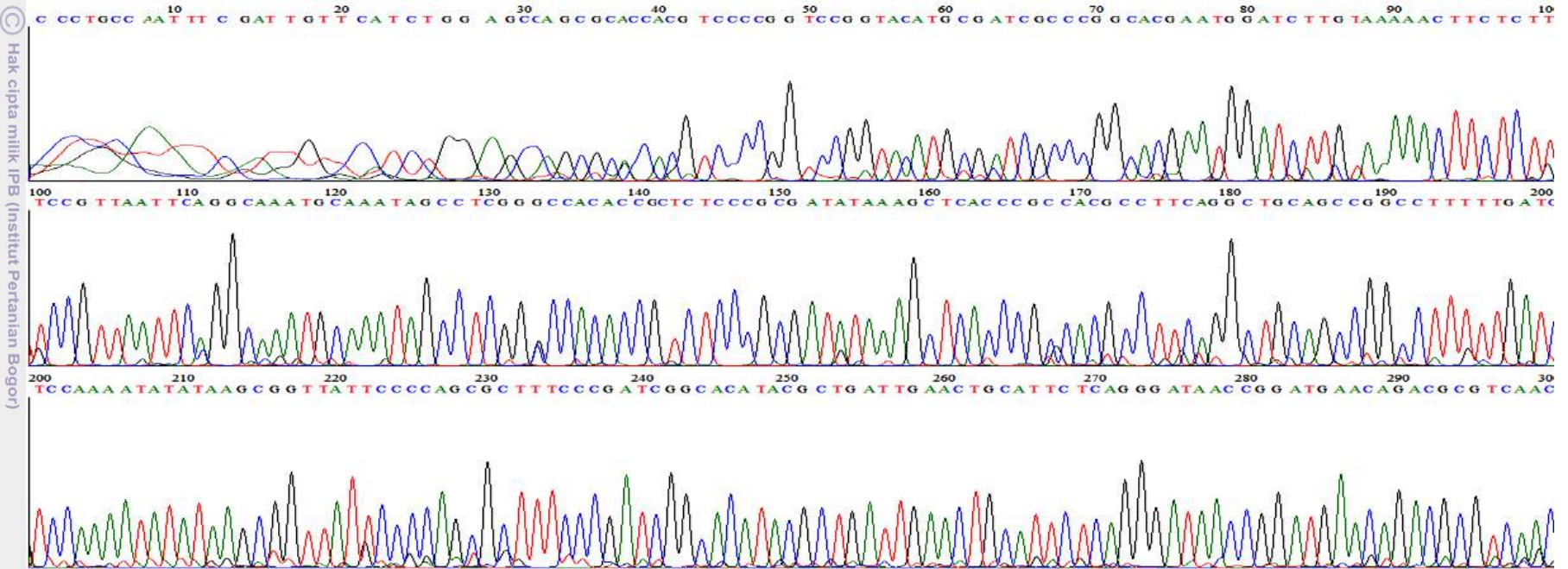
$$50 = 0.060x + 31.46$$

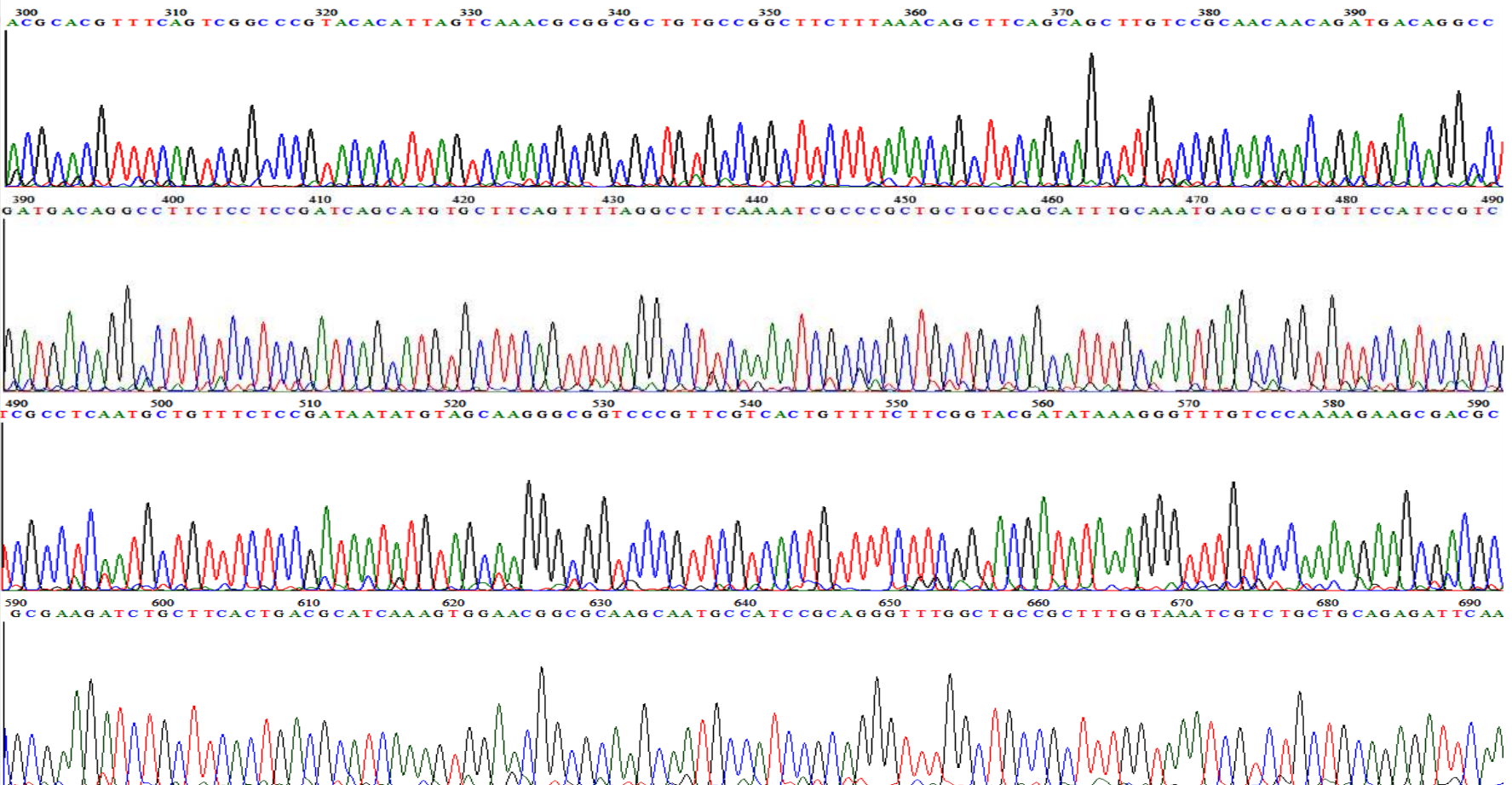
$$x = 309$$

$$IC_{50} = 309 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 3 Pengeditan Sekuen Nukleotida Gen Penyandi Domain A dengan Bioedit

HAL-74 FORWARD





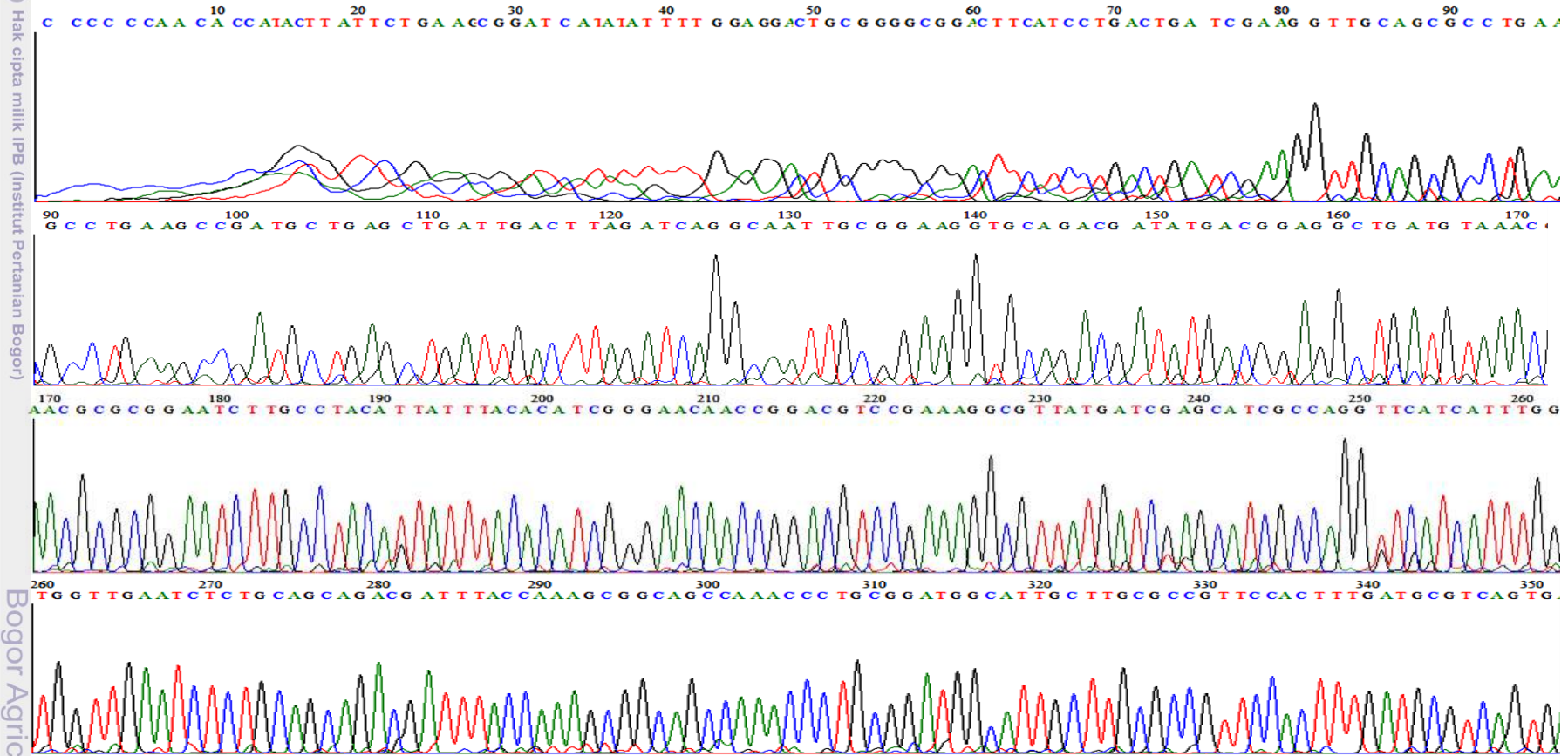
Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



HAL-74 REVERSE

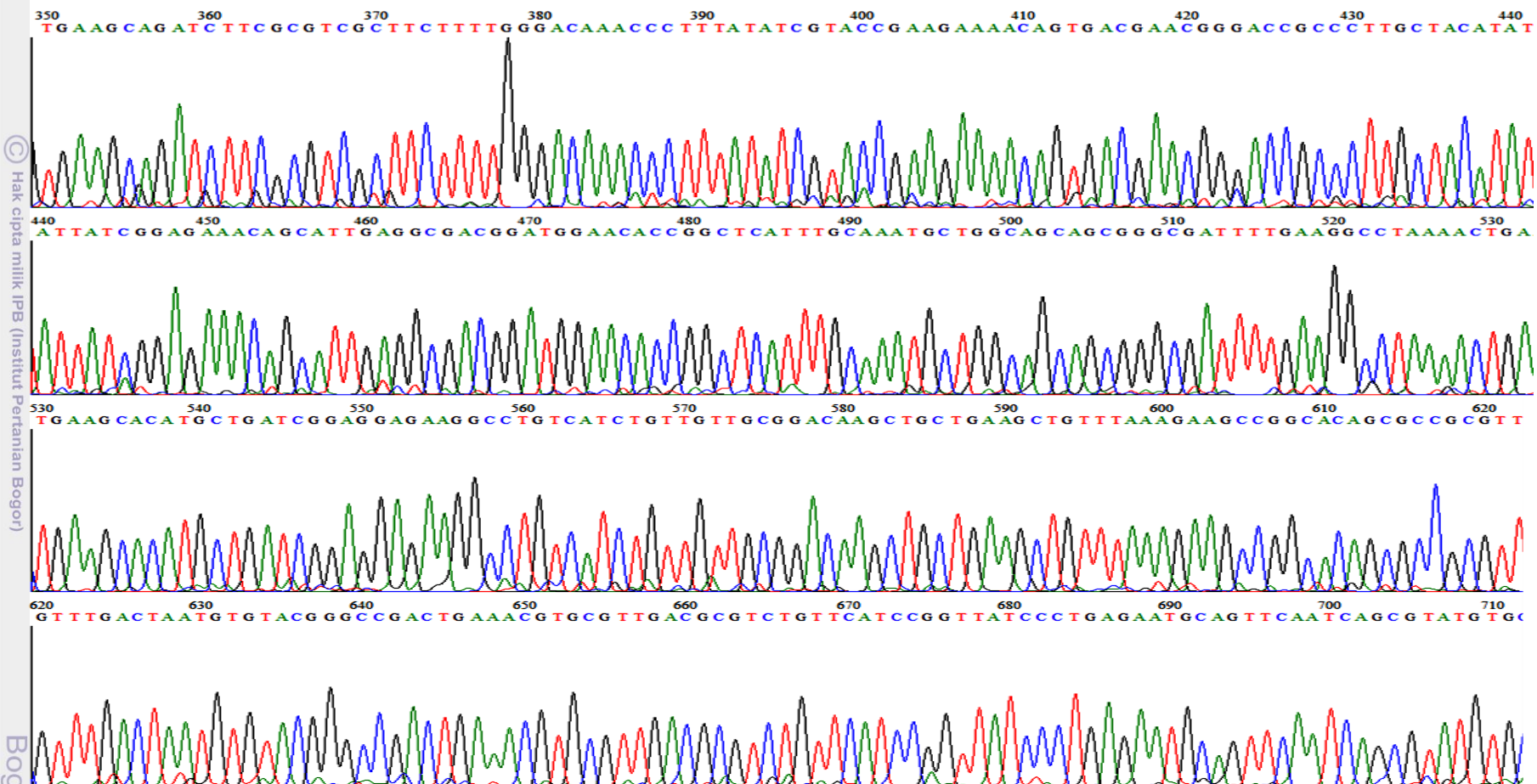


Bogor Agricultural University

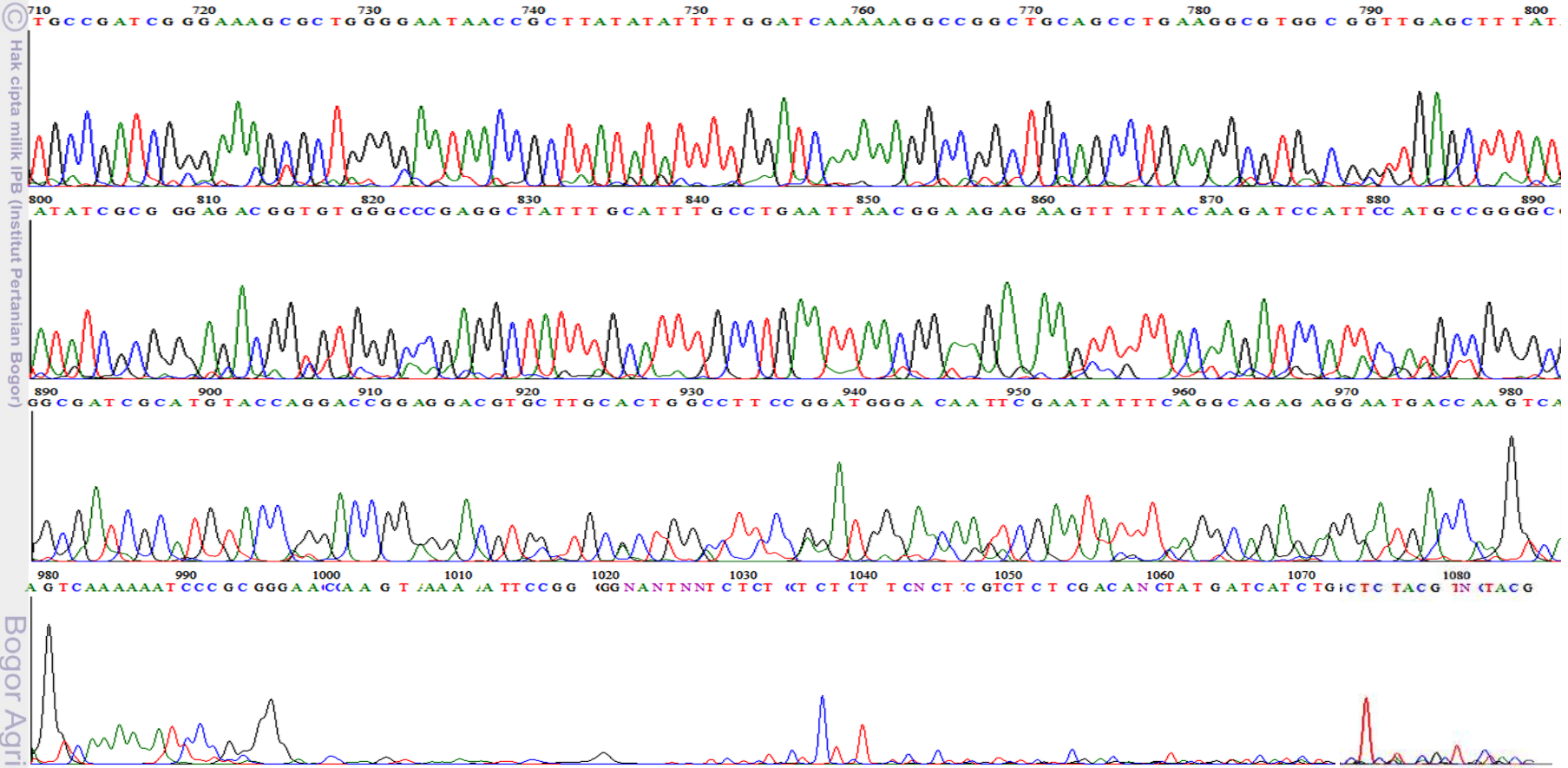
Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

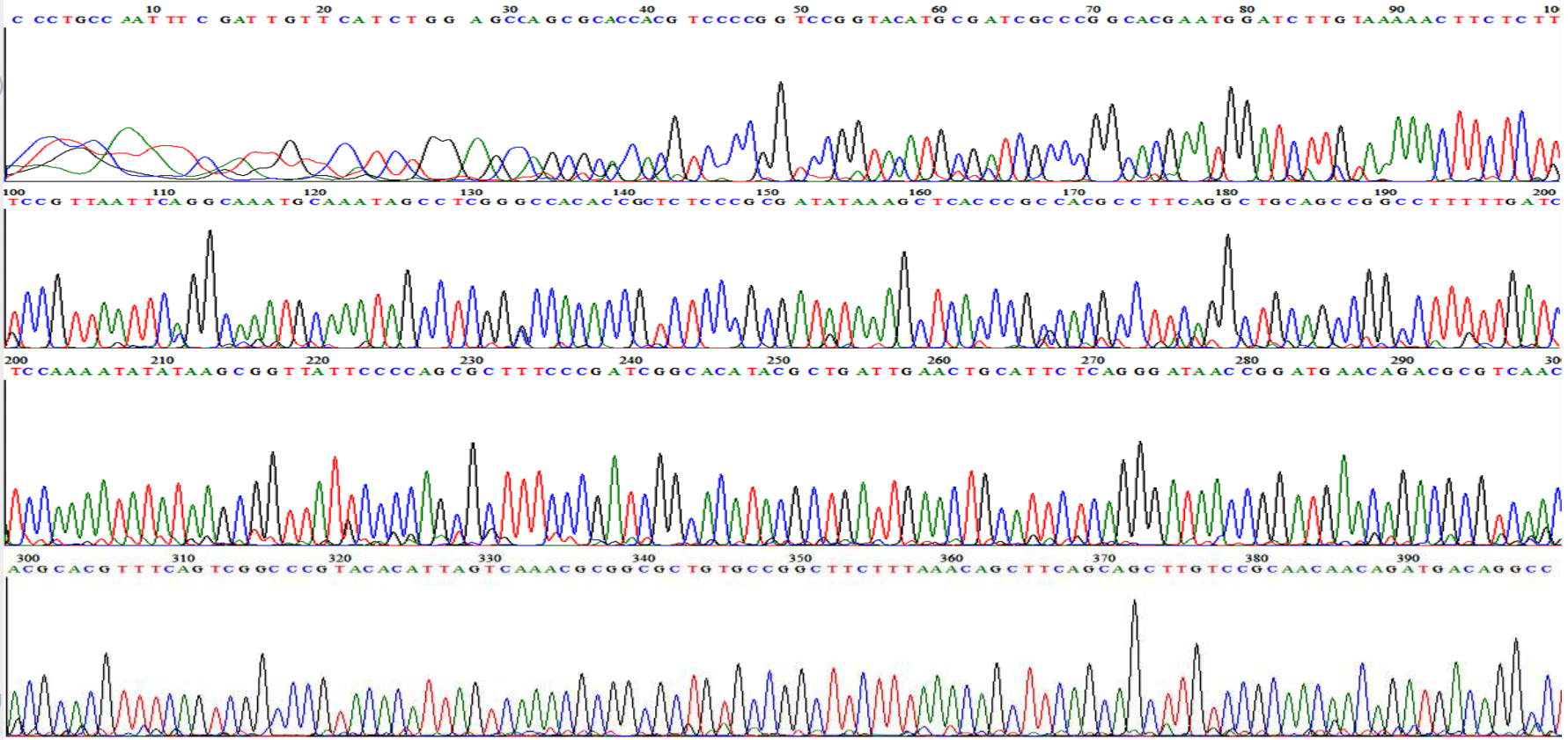
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



HAA-01 FORWARD



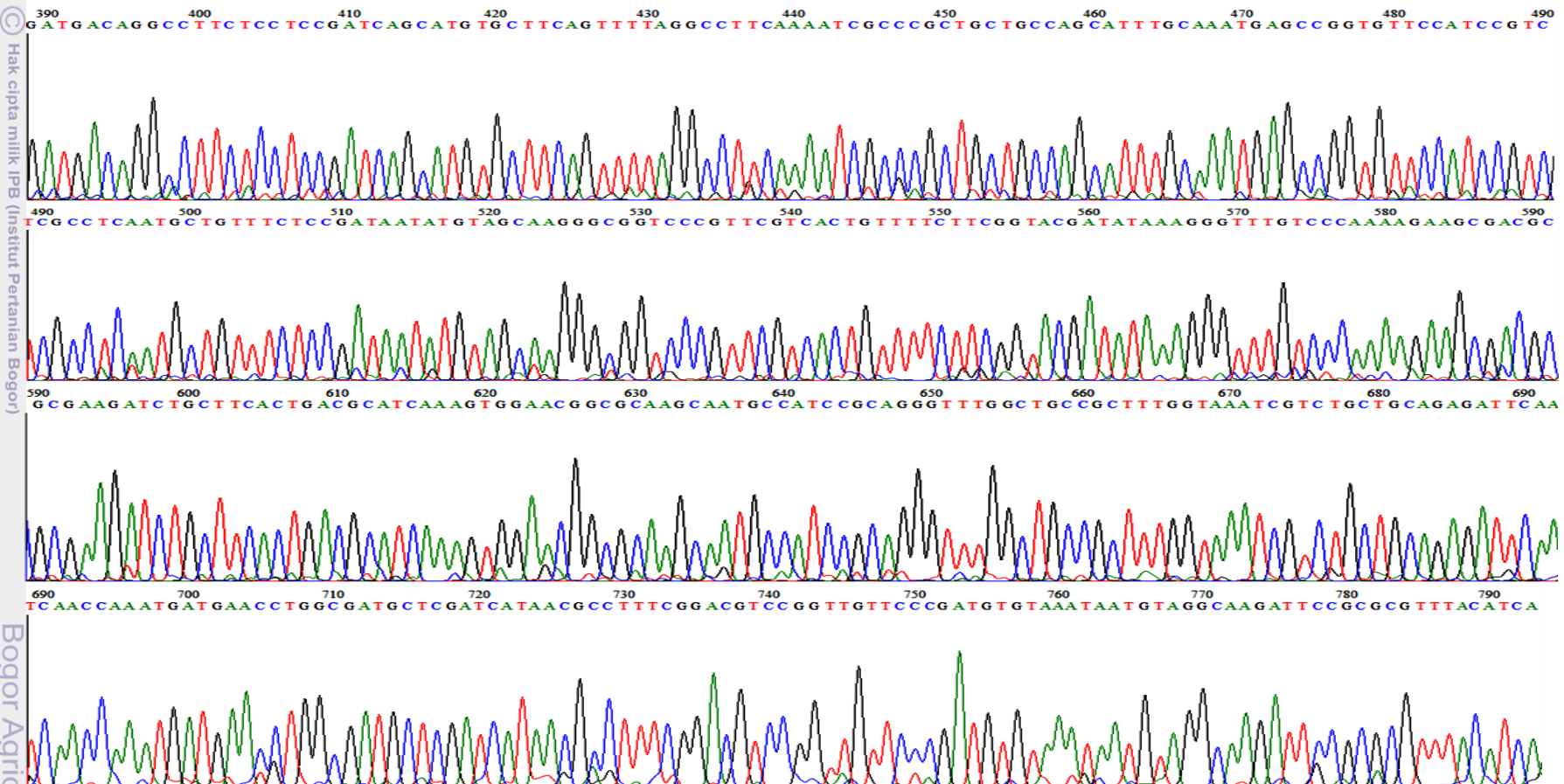
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

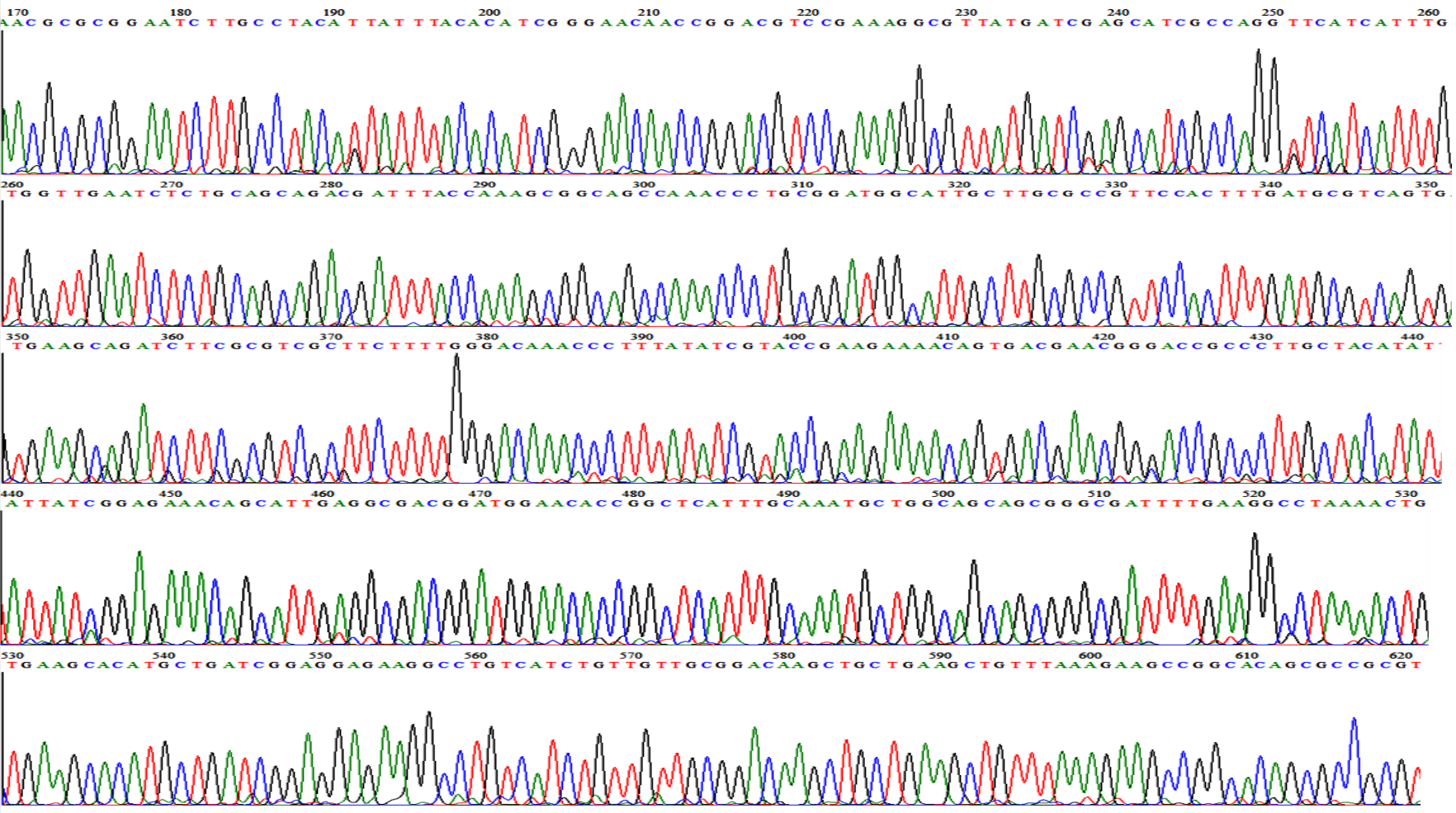
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.





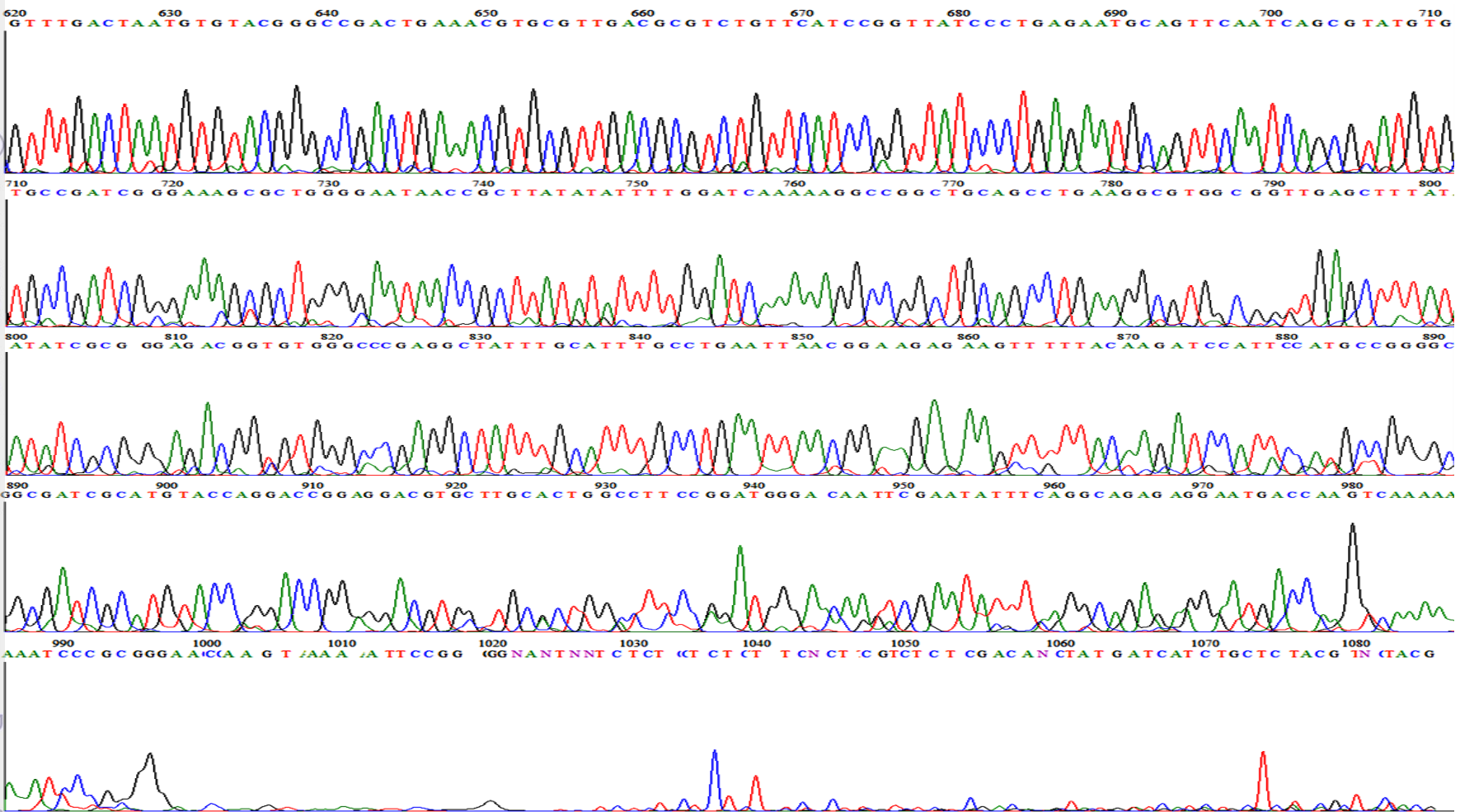
Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 4 Sekuen Nukleotida Gen Penyandi Domain A

Isolat HAL-74

ATCCGGAAGGCCAGTGCAAGCACGTCTCCGGTCCGGTACATGCGAT
CGCCCCGGCAGGGAATGGATCTTGTA AAAACTTCTCTTCCGTTAATTCA
GGCAAATGCAAATAGCCTCGGGCCACACCGCTCTCCCGCGATATAAA
GCTCACCCGCCACGCCTTCAGGCTGCAGCCGGCCTTTTTGATCCAAA
TATATAAGCGGTTATTCCCCAGCGCTTTCCCGATCGGCACATACGCTG
ATTGAACTGCATTCTCAGGGATAACCGGATGAACAGACGCGTCAACGC
ACGTTTCAGTCGGCCCGTACACATTAGTCAAACGCGGCGCTGTGCCGG
CTTCTTTAAACAGCTTCAGCAGCTTGTCCGCAACAACAGATGACAGGC
TTCTCCTCCGATCAGCATGTGCTTCAGTTTTAGGCCTTCAA AATCGCC
CGCTGCTGCCAGCATTGCAAATGAGCCGGTGTTCATCCGTCGCCTC
AATGCTGTTTCTCCGATAATATGTAGCAAGGGCGGTCCCGTTCGTCACT
GTTTTCTTCGGTACGATATAAAGGGTTTGTCCCAAAGAAGCGACGCG
AAGATCTGCTTCACTGACGCATCAAAGTGG AACGGCGCAAGCAATGCC
ATCCGCAGGGTTTGGCTGCCGCTTTGGTAAATCGTCTGCTGCAGAGAT
CAACCAAATGATGAACCTGGCGATGCTCGATCATAACGCCTTTCGGA
CGTCCGGTTGTTCCCGATGTGTAAATAATGTAGGCAAGATTCCGCGCG
TTACATCAGCCTCCGTCATATCGTCTGCACCTTCCGCAATTGCCTGAT
CTAAGTCAATCAGCTCAGCATCGGCTTCAGGCGCTGCAACCTTCGATT
CAGTCAGGATGAAGTCCGCCCCGCAGTCCTCCAAAATATATTGAATCC
GCTCTGCAGG

Isolat HAA-01

AAGCCAGTGCAGCACGTCTCCGGTCCGGTACATGCGATCGCCCCG
GCACGAATGGATCTTGTA AAAACTTCTCTTCCGTTAATTCAGGCAAAT
GCAAATAGCCTCGGGCCACACCGCTCTCCCGCGATATAAAGCTCACCC
GCCACGCCTTCAGGCTGCAGCCGGCCTTTTTGATCCAAAATATATAAG
CGGTTATTCCCCAGCGCTTTCCCGATCGGCACATACGCTGATTGAACTG
CATTCTCAGGGATAACCGGATGAACAGACGCGTCAACGCACGTTTCAG
TCGGCCCGTACACATTAGTCAAACGCGGCGCTGTGCCGGCTTCTTTAA
ACAGCTTCAGCAGCTTGTCCGCAACAACAGATGACAGGCCTTCTCCTC
CGATCAGCATGTGCTTCAGTTTTAGGCCTTCAA AATCGCCCCTGCTGC
CAGCATTGCAAATGAGCCGGTGTTCATCCGTCGCCTCAATGCTGTTT
CTCCGATAATATGTAGCAAGGGCGGTCCCGTTCGTCACTGTTTTCTTCG
GTACGATATAAAGGGTTTGTCCCAAAGAAGCGACGCGAAGATCTGCT
TCACTGACGCATCAAAGTGG AACGGCGCAAGCAATGCCATCCGCAGG
GTTTGGCTGCCGCTTTGGTAAATCGTCTGCTGCAGAGATTCAACCAA
ATGATGAACCTGGCGATGCTCGATCATAACGCCTTTCGGACGTCCGGTT
GTTCCCGATGTGTAAATAATGTAGGCAAGATTCCGCGCGTTTACATCA
GCCTCCGTCATATCGTCTGCACCTTCCGCAATTGCCTGATCTAAGTCAA
ATCAGCTCAGCATCGGCTTCAGGCGCTGCAACCTTCGATTCAGTCAGGA
ATGAAGTCCGCCCCGCAGTCCTCCAAAATATATTGAATCCGCTCTGCAG
GAAAACCCGGATCAATCGGGACATAAGCCC

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Desa Seleman Ulu pada tanggal 25 April 1990 sebagai anak pertama dari lima bersaudara dari pasangan ayah Kholid dan ibu Ermi. Pendidikan sarjana (S1) ditempuh di Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sriwijaya, lulus pada tahun 2011. Pada tahun 2012, penulis diterima di Program Studi Mikrobiologi (MIK) pada Program Pascasarjana IPB.

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains (MSi), penulis melakukan penelitian dengan judul “Aktivitas antibakteri dan antikanker ekstrak kasar metabolit bakteri yang berasosiasi dengan spons dan deteksi gen NRPS” Penelitian ini dibimbing oleh Prof Dr Aris Tri Wahyudi, MSi dan Dr Ir Ekowati Chasanah, MSc. Artikel penelitian ini telah disubmit ke jurnal Mikrobiologi Indonesia dengan judul “Antibacterial and Anticancer Activity of Extracts from Sponge-Associated Bacteria and Detection of Gene Required for Bioactive Compound Synthesis”.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.