

ISOLATION AND PHILOGENETIC ANALYSIS OF LUMINESCENCE BACTERIAL SYMBIOSIS IN LIGHT ORGAN OF SQUID *Loligo* sp

Delianis Pringgenies dan P. Apriliyani
Marine Science Dept. FPIK. Universitas Diponegoro Semarang
Email: pringgenies@ahoo.com

The squid *Loligo* sp. is one of the members of the mollusc phylum, which has potential economic value. It has the potency as the source of antibacterial compounds. The antibacterial source mainly comes from its bacterial symbionts within the light organ attaching the ink sack of the squid and have been suspected as the producer of antibacterial compounds. The aim of this research was to determine whether the bacterial symbionts of the light organ of squid *Loligo* sp. could play a role as the source of antibacterial agents MDR. The research was obtained from Semarang waters from July to October 2008. The MDR bacteria used was *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. 5, *Enterobacter* sp. 10, *CNS*, *Pseudomonas* sp., and *Escherichia coli* which were supplied by Microbiology Laboratory of dr. Karyadi Hospital, Semarang. The method used was the experimental laboratory method. Plating bacteria used was spread method. Whereas the process of the isolation used was streak method. Bacterial isolation resulted in the presence of 35 luminous isolates, and 5 non-luminous isolates. Results of the luminous isolates bacterial symbionts test revealed that a total of 14 bacterial isolates were found to be active against MDR bacteria, namely LDS 3-5, LDS 4-5, LDS 5-5, LDS 6-5, LDS 7-5, LDS 8-5, LDS 13-5, LDS 18-5, LDS 19-5, LDS 5-4, LDS 8-4, LDS 9-4, LDS 12-4, LDS 13-4. Whereas the best 2 bacteria based on the biggest zone of inhibition, were chosen further for subsequent sequencing and molecular identification, which showed that LDS 12-4 was mostly related to *Uncultured bacterium* clone 1P-1-G05 (98%) and LDS 18-5 was closely similar to *Uncultured bacterium* clone 3g10a (95%), respectively. The present research highlights the presence of new luminous bacteria other than previously reported isolates, *Vibrio* and *Photobacterium*.

Keywords : *Loligo* sp., the light organ, antibacterial compounds, antibacterial

PENDAHULUAN

Invertebrata laut merupakan sumber produk alami yang sangat potensial, terutama senyawa-senyawa bioaktif dengan berbagai aktivitas biologi (Faulkner, 2000). Berdasarkan hasil penelitian tentang skrining potensi bioaktif dari cumi-cumi yang telah dilakukan oleh Edward dan Murugan (2000) diketahui bahwa ekstrak kelenjar salivari dari *Octopus vulgaris*; tinta dan kelenjar salivari dari *Loligo duvauceli*; serta tinta, kelenjar salivari dan cangkang dalam (*backbone*) dari *Sepia pharaonis* memiliki potensi bioaktif sebagai agen antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen.

Edward dan Murugan (2000) menyatakan bahwa cumi-cumi *Loligo duvauceli* mampu menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai bahan antibakteri, sehingga bakteri *Photobacterium phosphoreum* yang bersimbiosis pada organ cahayanya diduga menghasilkan metabolit sekunder yang potensial sebagai bahan antibakteri. Mikroorganisme yang berasosiasi dengan biota laut mampu menghasilkan suatu senyawa yang serupa dengan senyawa yang dihasilkan oleh inangnya (Kelecom, 2001).

Pringgenies dan Hartati (2004) menyatakan bahwa cumi-cumi *Loligo duvauceli* mempunyai organ cahaya yang menempel pada kantong tintanya dan pada organ cahaya tersebut mengandung koloni bakteri. Analisis selanjutnya ditemukan bahwa bakteri luminesensi yang bersimbion pada organ cahaya cumi-cumi *Loligo duvauceli* adalah jenis bakteri *Photobacterium phosphoreum* (Pringgenies *et al.*, 2001). Pada penelitian yang dilakukan oleh Putriyani (2008) diketahui bahwa bakteri *P. phosphoreum* yang bersimbion dengan organ cahaya cumi-cumi *Loligo duvauceli* mampu menghasilkan senyawa bioaktif antibakteri.

Mengingat masih banyak jenis cumi-cumi yang belum tereksplorasi dan teridentifikasi maka diduga masih terdapat jenis bakteri luminesensi lain yang bersimbion pada organ cahaya cumi-cumi dan mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder sebagai sumber antibakteri. Seperti halnya dalam penelitian ini, ditelusuri potensi antibakteri yang berasal dari bakteri simbion cumi-cumi *Loligo* sp.

dan untuk mencari jenis-jenis bakteri luminesensi di laut yang mampu menjadi antibakteri. Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian adalah untuk menelusuri potensi antibakteri dan mengidentifikasi jenis-jenis bakteri luminesensi yang bersimbiosis dengan cumi-cumi *Loligo* sp. yang menghasilkan senyawa bioaktif terhadap bakteri MDR.

METODE

Koleksi Sampel Cumi-cumi *Loligo* sp.

Pengambilan sampel cumi-cumi dilakukan dengan teknik jaring pada bagan apung dengan kedalaman 1-2 m. Sampel cumi-cumi diambil seperlunya (5-10 ekor) dan dimasukkan dalam plastik. Sampel yang didapat kemudian dimasukkan pada *cool box* untuk penyimpanan sementara. Sampel selanjutnya disemprot dengan air laut steril untuk membersihkan bakteri perairan yang menempel pada permukaan cumi-cumi.

Isolasi Bakteri dari Organ Cahaya *Loligo* sp. dan Purifikasi Bakteri

Penanaman bakteri yang berasosiasi dengan *Loligo* sp. dilakukan dengan metode sebaran (*spread*) menurut Brock dan Madigan (1991). Adapun langkah-langkah pada isolasi ini yaitu: Sampel cumi-cumi dibelah menggunakan pisau steril secara aseptis kemudian diambil organ cahayanya. Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi air laut steril sebanyak 10 ml, dihancurkan dan digojog sampai homogen. Larutan sampel tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi lain yang berisi hingga 9 ml air laut steril sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran diulang dengan cara yang sama sampai diperoleh pengenceran 10^{-5} . Suspensi bakteri dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml dan ditetaskan pada media zobell 2216E yang telah disiapkan dalam cawan petri, lalu diratakan menggunakan *L glass*. Kultur bakteri tersebut diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh kemudian diisolasi. Koloni yang tumbuh dipurifikasi hingga diperoleh kultur murni berdasarkan penampakan koloninya (Madigan, 2000).

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode goresan (*streak*). Koloni-koloni bakteri dipisahkan dengan jarum ose. Dari masing-masing cawan petri pada tiap pengenceran diambil beberapa koloni bakteri yang berbeda (Radjasa *et al.*, 2003). Koloni yang diambil yaitu koloni yang memancarkan cahaya (berpendar) pada media zobell 2216E dalam cawan petri. Pemurnian (purifikasi) isolat bakteri dilakukan secara berulang-ulang sehingga didapatkan isolat yang benar-benar murni. Setelah didapatkan isolat murni maka disimpan pada media agar miring (Taslihan, 2001).

Kultur Bakteri Pada Media Cair

Sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri patogen terlebih dahulu dilakukan kultur bakteri uji dan bakteri cumi-cumi yang akan digunakan. Kultur ini dilakukan dengan memasukkan satu ose biakan bakteri dari agar miring pada media Zobell 2216E laut cair. Kemudian digojog dengan *shaker* selama 4 hari dan dibandingkan dengan kontrol yaitu media Zobell 2216E cair yang tidak diberi kultur bakteri. Apabila media menjadi keruh berarti bakteri telah berhasil ditumbuhkan.

Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode *Overlay*

Proses ini dilakukan dengan metode *overlay* (Terkina *et al.*, 2005). Untuk setiap isolat bakteri cumi-cumi yang telah murni, digores pada media padat Zobell 2216E laut, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 4 hari. Pada hari ke-4, isolat bakteri MDR *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.5, *Enterobacter* sp.10, CNS, *Pseudomonas* sp. dan *Escherichia coli* digores dan ditumbuhkan pada media cair Zobell 2216E tawar lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang sambil digoyang 90 rpm. Suspensi bakteri MDR diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam 100 mL soft agar Zobell 2216E tawar (1% dari total volume), kemudian dituang ke media padat Zobell 2216E laut yang telah ditumbuhi isolat bakteri cumi-cumi, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1-2 hari. Isolat bakteri yang membentuk zona hambat diambil dan diuji kembali. Setelah dilakukan uji ulang dan hasilnya tetap baik, isolat diambil dan disimpan untuk analisa selanjutnya. Zona hambat yang terbentuk selanjutnya diukur dengan jangka sorong.

Seleksi Bakteri Aktif

Hasil pengujian dipilih isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR yang dapat dilihat dari adanya zona bening dan yang tidak kemudian disisihkan. Setelah itu isolat bakteri tersebut diukur diameter zona hambatnya menggunakan jangka sorong digital.

Uji Pendar Cahaya Bakteri Luminesensi

Isolat bakteri yang aktif terhadap bakteri MDR diuji kekuatan pendarnya dengan menumbuhkan bakteri pada media cair zobell 2216E laut dalam tabung reaksi. Selanjutnya isolat bakteri pada media cair *dishaker* selama 1 x 24 jam. Tahap selanjutnya yaitu dilakukan pengamatan pendar cahaya dari bakteri tersebut. Kekuatan pendar diamati visual dan dinyatakan dalam notasi +. Pengamatan dibagi menjadi tiga tingkatan, yaitu pendar kuat, pendar sedang, dan pendar lemah. Pendar kuat jika cahaya yang tampak sangat terang dinotasikan dengan +++, pendar sedang jika cahaya yang tampak sedikit terang dinotasikan dengan ++, dan pendar lemah jika cahaya yang tampak tidak terang cenderung tidak tampak dinotasikan dengan +.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menurut Radjasa *et al.* (2007a.). Langkah-langkah ekstraksi DNA adalah koloni diambil kemudian disuspensikan di dalam tabung effendorf berisi 100 μ L air steril (Sigma, Jerman) dengan metode *freeze* (-80°C) and *thaw* (90°C), siklus ini diulang 5 kali. Ekstrak DNA yang diperoleh dapat disimpan pada suhu -20°C .

Identifikasi Spesies Isolat Bakteri Symbion *Loligo* sp. dengan Analisis Sekuen 16S rDNA

Radjasa *et al.* (2007a) identifikasi spesies isolat bakteri symbion *Loligo* sp. dengan menggunakan analisis sekuen 16S rDNA. Teknik yang digunakan yaitu dengan PCR. Master mix untuk PCR ini ialah 1 μ L DNA template hasil isolasi, 1 μ L primer 27F, 1 μ L primer 1492R, 5 μ L Megamix Royal, dan 2 μ L ddH₂O. Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan DNA thermal cycler (Mini cycler TM, MJ Research Inc, Watertown, MA, USA) dengan perlakuan temperatur sebagai berikut: Denaturasi awal pada 94°C selama 2 menit, kemudian 30 siklus denaturasi (94°C selama 1 menit), annealing (50°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C

selama 2 menit), serta ekstensi terakhir pada 72 °C selama 5 menit. Elektroforesis dilakukan dengan cara memasukkan 3 µL alikuot produk PCR ke dalam sumur gel 1% gel agarosa yang direndam di dalam buffer TAE1X.

Hasil dari PCR kemudian dipurifikasi dan disekuen dengan menggunakan *Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer*. Hasil elektroferogram disejajarkan dengan metode bioinformatika NCBI-BLASTN untuk mengetahui nama spesies bakterinya dan juga perbandingan dengan sekuen 16S rDNA bakteri lain sehingga dapat diketahui kekerabatan melalui pohon

HASIL

Isolasi Bakteri yang Bersimbiosis dengan Organ Cahaya *Loligo* sp.

Hasil isolasi bakteri yang bersimbiosis dengan organ cahaya *Loligo* sp. diperoleh 40 isolat bakteri. Setelah dilakukan pengamatan pendar cahaya dari bakteri didapatkan 35 isolat yang memiliki kemampuan untuk berpendar dan 5 isolat yang tidak berpendar.

Uji Kualitatif dan Kuantitatif Antibakteri

Terhadap 35 isolat bakteri berpendar dilakukan uji kualitatif kepada bakteri MDR *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp.5, *Enterobacter* sp. 10, *Coagulase Negative Staphylococcus*, *Klebsiella* sp., dan *Pseudomonas* sp. dimana terdapat 14 isolat yang mampu menghasilkan zona hambat dengan rincian yang terdapat pada Tabel 1

Tabel 1. Aktivitas Penghambatan Bakteri dari Cumi-cumi *Loligo* sp. terhadap Pertumbuhan Bakteri MDR

| No. | Bakteri <i>Loligo</i> sp. | Aktifitas antimikroba terhadap Bakteri MDR (mm) | | | | | |
|-----|------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|-----|-----------------------|---------------------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>Enterobacter</i> sp. 5 | <i>Enterobacter</i> sp. 10 | CNS | <i>Klebsiella</i> sp. | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| 1 | LDS 3-5 | - | - | - | - | + | - |
| 2 | LDS 4-5 | - | + | - | - | + | - |
| 3 | LDS 5-5 | - | + | - | - | - | - |
| 4 | LDS 6-5 | - | + | - | - | + | - |
| 5 | LDS 7-5 | - | + | - | - | + | - |
| 6 | LDS 8-5 | - | + | - | - | + | - |
| 7 | LDS 13-5 | - | - | - | + | - | - |

| | | | | | | | |
|----|----------|---|---|---|---|---|---|
| 8 | LDS 18-5 | - | + | - | - | - | - |
| 9 | LDS 19-5 | - | - | - | - | - | + |
| 10 | LDS 5-4 | - | - | + | - | - | - |
| 11 | LDS 8-4 | + | - | - | - | - | - |
| 12 | LDS 9-4 | + | - | - | - | - | - |
| 13 | LDS 12-4 | + | - | - | - | - | - |
| 14 | LDS 13-4 | + | - | - | - | - | - |

Keterangan : + : mampu menghambat bakteri uji
 - : tidak mampu menghambat bakteri uji

Pada uji kuantitatif diameter zona hambat diperoleh hasil sebagaimana ditunjukkan seperti dibawah ini (Tabel 2 sampai Tabel 6):

Tabel 2. Hasil uji aktifitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*

| No. | Kode Isolat Bakteri | Diameter Zona Hambat (mm) |
|-----|---------------------|---------------------------|
| 1 | LDS 8-4 | 14,09 |
| 2 | LDS 9-4 | 13,97 |
| 3 | LDS 12-4 | 32,59 |
| 4 | LDS 13-4 | 9,74 |

Hasil uji diameter zona hambat bakteri terhadap *Escherichia coli* memperlihatkan terdapat 4 isolat bakteri yang berpotensi yaitu LDS 18-5, LDS 9-4, LDS 12-4, dan LDS 13-4.

Keempat isolat bakteri memperlihatkan bahwa isolat LDS 12-4 menghasilkan diameter zona hambat tertinggi (32,59 mm) dan isolat LDS 13-4 menghasilkan zona hambat terendah (9,74 mm) dibandingkan isolat lainnya.

Tabel 3. Hasil uji aktifitas antibakteri terhadap *Klebsiella sp.*

| No. | Kode Isolat Bakteri | Diameter Zona Hambat (mm) |
|-----|---------------------|---------------------------|
| 1 | LDS 3-5 | 15,33 |
| 2 | LDS 4-5 | 19,00 |

| | | |
|---|---------|-------|
| 3 | LDS 6-5 | 17,12 |
| 4 | LDS 7-5 | 17,43 |
| 5 | LDS 8-5 | 17,78 |

Hasil uji diameter zona hambat bakteri terhadap *Klebsiella* sp. memperlihatkan terdapat 4 isolat bakteri yang berpotensi yaitu LDS 3-5, LDS 4-5, LDS 6-5, LDS 7-5 dan LDS 8-5.

Kelima isolat bakteri memperlihatkan bahwa isolat LDS 4-5 menghasilkan diameter zona hambat tertinggi (19,00 mm) dan isolat LDS 3-5 menghasilkan zona hambat terendah (15,33 mm) dibandingkan isolat lainnya.

Tabel 4. Hasil uji aktifitas antibakteri terhadap *Enterobacter* sp. 5

| No. | Kode Isolat Bakteri | Diameter Zona Hambat (mm) |
|-----|---------------------|---------------------------|
| 1 | LDS 4-5 | 23,64 |
| 2 | LDS 5-5 | 21,65 |
| 3 | LDS 6-5 | 27,07 |
| 4 | LDS 7-5 | 25,06 |
| 5 | LDS 8-5 | 25,97 |
| 6 | LDS 18-5 | 28,44 |

Pada hasil uji diameter zona hambat bakteri terhadap *Enterobacter* sp. 5 memperlihatkan terdapat 6 isolat bakteri yang berpotensi yakni LDS 4-5, LDS 5-5, LDS 6-5, LDS 7-5, LDS 8-5 dan LDS 18-5.

Keenam isolat bakteri memperlihatkan bahwa isolat LDS 18-5 menghasilkan diameter zona hambat tertinggi (28,44 mm) dan isolat LDS 5-5 menghasilkan zona hambat terendah (21,65 mm) dibandingkan isolat lainnya.

Tabel 5. Hasil uji aktifitas antibakteri terhadap *Staphylococcus* sp. CNS, *Enterobacter* sp.10, dan *Pseudomonas* sp.

| No. | Kode Isolat Bakteri | Bakteri Uji | Diameter Zona Hambat (mm) |
|-----|---------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | LDS 13-5 | <i>Staphylococcus</i> sp. CNS | 10,92 |
| 2 | LDS 5-4 | <i>Enterobacter</i> sp.10 | 11,42 |
| 3 | LDS 19-5 | <i>Pseudomonas</i> sp. | 13,01 |

Pada tabel di atas diketahui bahwa bakteri uji (*Staphylococcus* sp. CNS, *Enterobacter* sp.10 dan *Pseudomonas* sp.) berhasil dihambat oleh masing-masing 1 isolat bakteri yaitu LDS 13-5, LDS 5-4, dan LDS 19-5.

Tabel 6. Hasil Pengamatan Zona Hambat Terbaik Untuk Masing-masing Bakteri MDR

| No. | Kode Isolat Bakteri | Jenis Bakteri MDR | Diameter Zona Hambat (mm) |
|-----|---------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | LDS 12-4 | <i>Escherichia coli</i> | 32,59 |
| 2 | LDS 18-5 | <i>Enterobacter</i> sp. 5 | 28,44 |
| 3 | LDS 4-5 | <i>Klebsiella</i> sp. | 19,00 |
| 4 | LDS 19-5 | <i>Pseudomonas</i> sp. | 13,01 |
| 5 | LDS 5-4 | <i>Enterobacter</i> sp. 10 | 11,42 |
| 6 | LDS 13-5 | <i>Staphylococcus</i> sp. CNS | 10,92 |

Tabel 6 menunjukkan isolat yang memiliki zona hambat terbesar yaitu LDS 12-4 dan LDS 18-5 dengan diameter zona hambat masing-masing 32,59 mm dan 28,44 mm yang mampu menghambat *Escherichia coli* dan *Enterobacter* sp. 5.

Hubungan Antara Kekuatan Pendar Dengan Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini dilakukan uji pendar cahaya dari masing-masing isolat bakteri simbion *Loligo* sp. yang dimaksudkan untuk mengetahui pendar cahaya yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri luminesensi dan adakah hubungan saling mempengaruhi antara pendar cahaya yang dikeluarkan isolat bakteri dengan zona hambat yang terbentuk. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri dan Uji Pendar

| No. | Isolat Bakteri | Bakteri uji | | | | | Pendar |
|-----|----------------|-------------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | | Ec | En 5 | En 10 | CNS | Klebsi | |
| 1 | LDS 3-5 | | | | | 15.33 | +++ |
| 2 | LDS 4-5 | | 23.64 | | | 19 | + |
| 3 | LDS 5-5 | | 21.65 | | | | +++ |
| 4 | LDS 6-5 | | 27.07 | | | 17.12 | + |
| 5 | LDS 7-5 | | 25.06 | | | 17.43 | + |
| 6 | LDS 8-5 | | 25.97 | | | 17.78 | + |
| 7 | LDS 13-5 | | | | 10.92 | | ++ |
| 8 | LDS 18-5 | | 28.44 | | | | + |
| 9 | LDS 19-5 | | | | | 13.01 | + |
| 10 | LDS 5-4 | | | 11.42 | | | + |
| 11 | LDS 8-4 | 14.09 | | | | | +++ |
| 12 | LDS 9-4 | 13.97 | | | | | + |
| 13 | LDS 12-4 | 32.59 | | | | | ++ |
| 14 | LDS 13-4 | 9.74 | | | | | + |

Keterangan :

Ec : *Escherichia coli*

En 5 : *Enterobacter* sp. 5

En 10 : *Enterobacter* sp. 10

CNS : *Coagulase Negative Staphylococcus*

Klebsi : *Klebsiella* sp.

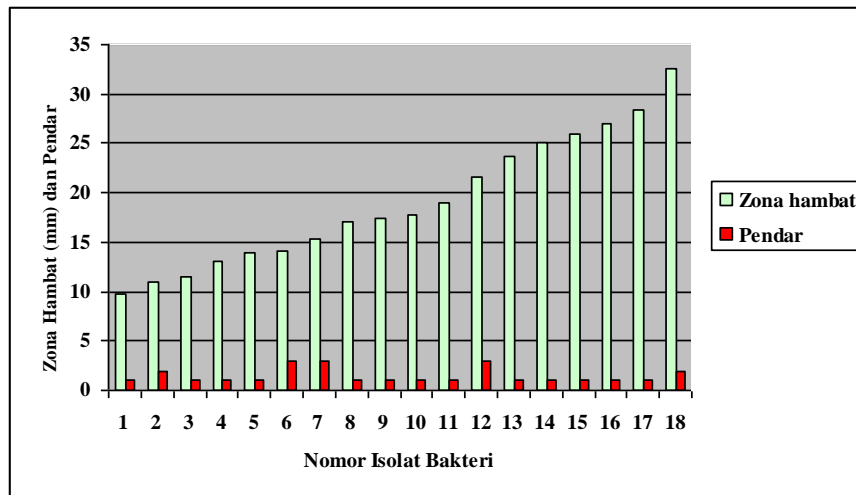
Pseudo: *Pseudomonas* sp.

+++ : Pendar Kuat

++ : Pendar Sedang

+ : Pendar Lemah

Berdasarkan hasil penelitian tentang hubungan antara zona hambat dan kekuatan pendar cahaya bakteri luminesensi memperlihatkan tidak adanya hubungan antara kekuatan pendar dan zona hambat yang dihasilkan, seperti tertera pada Gambar 1



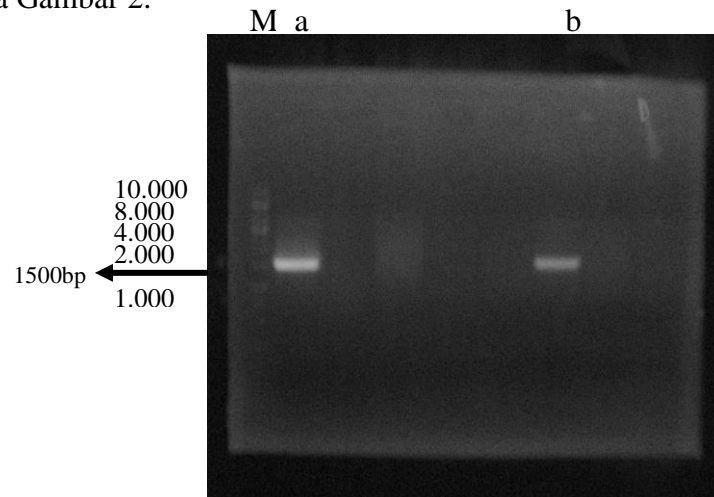
Gambar 1. Hasil Zona Hambat dan Kekuatan Pendar Cahaya Bakteri Luminesensi

Keterangan :

Nomor isolat bakteri : (1) LDS 13-4, (2) LDS 13-5, (3) LDS 5-4, (4) LDS 19-5, (5) LDS 9-4, (6) LDS 8-4, (7) LDS 3-5, (8) LDS 6-5, (9) LDS 7-5, (10) LDS 8-5, (11) LDS 4-5, (12) LDS 5-5, (13) LDS 4-5, (14) LDS 7-5, (15) LDS 8-5, (16) LDS 6-5, (17) LDS 8-5, (18) LDS 12-4

Identifikasi Molekuler dengan Analisis PCR 16S rDNA

Hasil amplifikasi DNA 16S rDNA dari 2 isolat, LDS 18-5 dan 12-4 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA menggunakan PCR 16S rDNA, (a) : isolat LDS 18-5, (b) : LDS 12-4, dan M : Marker 1500 bp.

Gambar 2 menunjukkan bahwa hasil amplifikasi DNA 16S rDNA menghasilkan pita tunggal dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari sekuen 16S rDNA bakteri.

Hasil sekuensing dari LDS 12-4 dan LDS 18-5 adalah sebagai berikut :

LDS 12-4 (765R)

```
CGACGGTTGGGTTTAAAGACCAAAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTA
CACGTGGAATTCACCTCTCCTTCTGTACTCAAGTCCTCCAGTTTCCAATGGCCCTCCACGGTTAAGCCGTGGGC
TTTACATCAGACTTAAAG
```

LDS 18-5 (765R)

```
CCCCTCGTTCGACAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGA
ATTCCACTCTCCTTCTGTACTCAAGTCCTCCAGTTTCCAATAGGCCCTCCACGGTTAAGCCGTGGGC TTTCACAT
CAGACTTAAAGGACCGCCTGCGCGCGCGCTTTACGCCGAATAATTCCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACC
GCGGGTGTGGCAGGTAGTTAGCCGGGCTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGCCGCGGTATTGAAACGGCACT
TGTCTTCCCTGACAACAAAGTTTACAATCCAAAAACCTTCATCACTACGCGGGCGTGTGCTCCGTCAAATTTTCG
TCCATTGCGAAAATCCCTACTGCTGCCTCCGGAAGGAGTCGGGGCCGGGTCTCATTCCAGGGGGGCCAATCAC
CGTCTCAGGTCGGCTACCCATCGTCCCCTTGGTAA
```

Analisis homologi dengan menggunakan BLAST dapat dilihat pada Gambar 3

dan 4.

```

> gb|EU873764.1 Uncultured bacterium clone 3g10a 16S ribosomal RNA gene,
    partial
sequence
Length=824

Score = 749 bits (405), Expect = 0.0
Identities = 454/477 (95%), Gaps = 5/477 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 13  CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACG 72
          |||
Sbjct 760  CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACG 701

Query 73  TGGAATTCCTCTCTCTGTACTCAAGT-CCTCCAGTTTCCAATAGGCCCTCCACG 131
          |||
Sbjct 700  TGGAATTCCTCTCTCTGTACTCAAGTCCCT-CAGTTTCCAAT-GACCCCTCCACG 643

Query 132  GTTAAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGGACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAA 191
          |||
Sbjct 642  GTTAAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGGACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAA 583

Query 192  TAATTCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG 251
          |||
Sbjct 582  TAATTCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG 523

Query 252  GGGCTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGC-CGCCTATTCGAACGGCACTTGTCTTCC 310
          |||
Sbjct 522  GGGCTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGT-CACGCCCTATTCGAACGGCACTTGTCTTCC 464

Query 311  CTGACAACAAAGTTTACAAATCCAAAACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAA 370
          |||
Sbjct 463  CTGACAACAGAGTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAA 404


Query 371  ACTTTCGTCCATTGCGAAAAATTCCTACTGCTGCTCCCGAAGGAGTCGGGGCCGGGTC 430
          |||
Sbjct 403  ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTC 344

Query 431  TCATTCACAGGGGGCCAATCACCTCTCAGGTCGGCTACCCATCGTCCCTTGGA 487
          |||
Sbjct 343  TCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGA 287

```

Gambar 3. Hasil analisis homologi sekuen isolat LDS 18-5 dengan menggunakan BLAST database. Simbol | menunjukkan nukleotida yang identik.

```

>  gb|EU704793.1| Uncultured bacterium clone 1P-1-G05 16S ribosomal RNA gene,
partial
sequence
Length=1257

Score = 278 bits (150), Expect = 7e-72
Identities = 156/159 (98%), Gaps = 0/159 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 13  TTAAAGACCAAAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCCACC 72
      ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 663  TTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCCACC 604

Query 73  GCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGTACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGGCCC 132
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 603  GCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGTACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCC 544

Query 133 TCCACGGTTAAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAG 171
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 543 TCCACGGTTAAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAG 505

```

Gambar 4. Hasil analisis homologi sekuen isolat LDS 12-4 dengan menggunakan BLAST database. Simbol | menunjukkan nukleotida yang identik.

Hasil penelusuran sekuen masing-masing isolat bakteri menggunakan sistem BLAST dan pohon filogenik. Pohon filogenik digunakan untuk mengetahui kekerabatan terdekat dari isolat bakteri sampel dengan homolognya. Hasil penelusuran dapat dilihat pada Tabel 8

Tabel 8. Hasil penelusuran sekuen DNA isolat bakteri dengan sistem BLAST.

| No | Isolat | Hasil identifikasi | Homologi (%) | No. akses |
|----|----------|--|--------------|------------|
| 1. | LDS 12-4 | <i>Uncultured bacterium</i> clone 1P-1-G05 | 98 | EU704793.1 |
| 2. | LDS 18-5 | <i>Uncultured bacterium</i> clone 3g10a | 95 | EU873764.1 |

Pembahasan

Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Organ Cahaya *Loligo* sp.

Hasil isolasi pada organ cahaya cumi-cumi *Loligo* sp. didapatkan sebagian besar merupakan bakteri berpendar. Dari 40 isolat bakteri yang berhasil diisolasi, 35 adalah bakteri yang berpendar dan 5 lainnya tidak berpendar. Kelima bakteri yang tidak berpendar tersebut diduga merupakan bakteri asosiasi lain yang ikut berkembang selama proses isolasi. Sedangkan 35 isolat bakteri yang berpendar merupakan bakteri simbiosis murni dari organ cahaya cumi-cumi *Loligo* sp. Bakteri simbiosis yang terdapat dalam organ cahaya cumi-cumi merupakan bakteri yang spesifik. Dalam penelitian ini bakteri spesifik yang dimaksud adalah bakteri berpendar. Jika bakteri tidak mampu melakukan bioluminesensi atau menghasilkan cahaya maka bakteri tersebut akan tereliminasi dari organ cahaya (Nyhlom dan McFall-Ngai, 2004).

Uji Kualitatif dan Kuantitatif Antibakteri

Cumi-cumi *Loligo* sp. diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai bahan antibakteri. Pada penelitian ini, potensi tersebut berasal dari bakteri yang bersimbiosis dengan organ cahaya cumi-cumi *Loligo* sp. Pada uji antibakteri dari bakteri simbiosis cumi-cumi digunakan bakteri golongan MDR yaitu *Escherichia coli*, *Coagulase Negative Staphylococcus*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. 5 dan *Enterobacter* sp.10.

Hasil skrining bakteri yang berasosiasi dengan organ cahaya *Loligo* sp. terhadap enam bakteri uji tersebut menunjukkan bahwa dari 35 bakteri berpendar hasil isolasi yang diujikan, 14 diantaranya dapat menghambat pertumbuhan bakteri MDR. Sebagian besar bakteri isolat menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* sp. 5. Hal ini membuktikan bahwa isolat-isolat bakteri tersebut mempunyai potensi untuk menghasilkan senyawa antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri uji sebagai usaha mereka untuk mendapatkan ruang dan nutrisi.

Duapuluh satu (21) isolat bakteri lainnya yang tidak menunjukkan adanya aktivitas dalam penghambatan bakteri uji boleh dikatakan tidak menghasilkan

senyawa metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Coagulase Negative Staphylococcus*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. 5 dan *Enterobacter* sp.10. Tidak adanya aktivitas antimikroba pada 21 isolat bakteri dapat disebabkan oleh beberapa kemungkinan. Pertama, isolat bakteri tidak mempunyai kemampuan untuk mensintesa metabolit sekunder untuk melawan bakteri uji. Bakteri yang tidak mempunyai gen penghasil senyawa metabolit sekunder tersebut tidak mampu melawan bakteri uji MDR karena produksi metabolit sekunder diatur oleh gen. Hal ini sesuai dengan Sastradipraja dan Mathius (1990) dalam Habibie (2005), yang menyebutkan bahwa produksi metabolit sekunder dalam organisme diatur oleh gen. Kedua, bakteri uji mampu menetralkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri dari cumi-cumi *Loligo* sp. Menurut Conception *et al.* (1994), bakteri yang tidak mampu menetralkan senyawa tersebut tidak akan mampu bertahan dalam lingkungan, sedangkan bakteri lainnya mengembangkan suatu mekanisme pertahanan diri untuk menghadapi kehadiran zat atau senyawa asing yang dapat mengganggu aktivitas sel bakteri. Ketiga, konsentrasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan terlalu kecil sehingga tidak mampu menghambat bakteri uji. Mekanisme kerja suatu bahan antimikroba tergantung pada tinggi rendahnya konsentrasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Seperti yang dinyatakan oleh Lay (1994) dalam Habibie (2005), bahan antimikroba dapat bersifat menghambat jika digunakan dalam konsentrasi rendah dan dapat bersifat membunuh jika digunakan dalam konsentrasi tinggi.

Masing-masing isolat bakteri memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Melalui penelitian yang dilakukan, dari 6 isolat bakteri MDR yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri, semua bakteri MDR berhasil dihambat pertumbuhannya. Untuk bakteri MDR *E. coli* terdapat 4 isolat yang mampu menghambatnya. Bakteri MDR *Enterobacter* sp. 5 dan *Klebsiella* sp. terdapat 4 isolat yang sama yang mampu menghambat. Sedangkan untuk bakteri MDR *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* sp.10 masing-masing berhasil dihambat oleh 1 isolat yang berbeda.

Beberapa isolat mampu menghambat pertumbuhan lebih dari satu bakteri MDR yang diujikan sekaligus, yaitu isolat LDS 4-5, LDS 6-5, LDS 7-5, dan LDS 8-5. Kemampuan suatu isolat untuk menghambat lebih dari satu jenis bakteri uji dapat terjadi karena senyawa bioaktif yang dihasilkan isolat bakteri hanya satu namun aktif terhadap beberapa bakteri uji atau suatu isolat bakteri mampu menghasilkan beberapa senyawa bioaktif antibakteri. Menurut Lay dan Hastowo (1992) bahan antimikrobia dengan kisaran luas adalah bahan antimikrobia yang mampu menghambat atau mematikan berbagai mikroorganisme, sedangkan antimikrobia dengan kisaran sempit adalah bahan antimikrobia yang mampu menghambat atau mematikan hanya beberapa mikroorganisme. Kelly dan Hite (1955) menambahkan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri memiliki sifat yang selektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain, sehingga hal ini memungkinkan bakteri yang satu dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain, tetapi bakteri ini tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang lainnya.

Pada uji kuantitatif diperoleh zona hambat yang berbeda pada masing-masing bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Berdasarkan pengamatan zona hambat yang terbentuk, isolat bakteri dengan zona hambat terbesar yaitu isolat dengan kode LDS 12-4 sebesar 32,59 mm. Namun isolat ini hanya mampu menghambat satu bakteri uji yakni bakteri MDR *E. coli*. Hal ini diduga karena konsentrasi senyawa antibakteri yang dihasilkan isolat bakteri tersebut dalam jumlah yang cukup tinggi. Isolat yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri dengan konsentrasi lebih banyak akan mempunyai zona hambat yang lebih luas. Dari luas zona hambat yang terbentuk, isolat LDS 12-4 mampu menghasilkan konsentrasi yang lebih banyak daripada isolat lainnya. Seperti yang dikemukakan oleh Dwidjoseputro (1989), hal ini terkait dengan mekanisme difusi agen antibiotik ke dalam media agar. Konsentrasi antibiotik yang tinggi akan berdifusi lebih jauh ke dalam media. Selain itu sifat fisika dan kimia dari metabolit sekunder yang dihasilkan juga akan berpengaruh terhadap laju difusi molekul pada media agar (Brock dan Madigan, 1991).

Pada pengamatan kecerahan zona hambat yang terbentuk, tampak beberapa bakteri isolat menghasilkan zona hambat yang bening. Hal ini berarti isolat tersebut bersifat bakterisidal, dimana bakteri tersebut tidak hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji tetapi senyawa yang dihasilkan oleh bakteri isolat dapat membunuh bakteri uji. Sedangkan beberapa isolat lainnya menghasilkan zona hambat yang keruh. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa yang dihasilkan oleh bakteri isolat tersebut bersifat bakteristatik, dimana bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji namun tidak membunuhnya Menurut Wattimena *et al.* (1991), zat antibakteri dikatakan bersifat bakteristatik bila menunjukkan penyempitan dan pengurangan kecerahan zona hambat setelah inkubasi 24 jam, sedangkan bakterisidal mampu membentuk zona hambatan yang bening sampai inkubasi 48 jam. Bakteri isolat yang bersifat bakteristatik adalah LDS 13-5 terhadap bakteri MDR *Coagulase Negative Staphylococcus (CNS)*; LDS 3-5, LDS 4-5, LDS 6-5, LDS 7-5, LDS 8-5 terhadap bakteri MDR *Klebsiella* sp.; LDS 3-5, LDS 4-5, LDS 5-5, LDS 7-5, LDS 8-5, LDS 18-5 terhadap bakteri MDR *Enterobacter* sp.5. Sedangkan isolat bakteri yang bersifat bakterisidal adalah LDS 19-5 terhadap bakteri MDR *Pseudomonas* sp.; LDS 8-4, LDS 9-4, LDS 12-4, LDS 13-4 terhadap bakteri MDR *Escherichia coli*; LDS 5-4 terhadap bakteri MDR *Enterobacter* sp. 10.

Pada umumnya metabolit sekunder diproduksi oleh bakteri pada akhir fase stasioner pertumbuhan. Menurut Manitto (1981), fase stasioner pertumbuhan dicapai pada umur kultur 4 sampai 5 hari. Untuk itu isolat bakteri ditanam pada media sampai umur 5 hari sebelum diujikan terhadap bakteri MDR untuk mendapatkan metabolit sekunder yang maksimal sehingga mampu bekerja dengan baik.

Uji Pendar Cahaya dari Bakteri Luminesensi

Pada penelitian ini diuji pula ada tidaknya hubungan antara pemancaran cahaya dari isolat bakteri dengan zona hambat yang dihasilkannya. Kekuatan pendar dibagi dalam tiga tipe yaitu pendar kuat, pendar sedang, dan pendar lemah. Antara bakteri luminesensi yang satu dengan yang lainnya diduga akan memancarkan cahaya dengan kerapatan yang berbeda-beda. Bakteri yang bersimbiosis dengan organ

cahaya cumi-cumi *Loligo duvauceli* akan memancarkan cahaya bila kerapatannya mencapai jumlah $4,6 \times 10^9$ CFU/mL (Pringgenies dan Sedjati, 2004), apabila kerapatannya kurang dari jumlah tersebut bakteri tidak dapat memancarkan cahaya. Hasil uji pendar cahaya dari isolat bakteri pada penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang disebabkan oleh pertumbuhan yang berbeda pada masing-masing isolat bakteri. Pengkulturan dilakukan selama 1 x 24 jam kemudian diamati pendar cahayanya. Pengamatan dilakukan pada saat 24 jam karena pada saat itu cahaya yang dikeluarkan berada pada posisi maksimal. Pemancaran cahaya oleh bakteri simbion *Loligo* sp. akan mampu bertahan selama 3 hari, setelah itu cahaya akan menghilang karena *enzim luciferase* yang menjadi katalisator reaksi kimia yang memungkinkan pemancaran cahaya ini sudah mencapai kondisi yang tidak aktif yaitu karena senyawa *luciferin* dalam media sudah habis. *Luciferase* bertindak sebagai enzim yang mengontrol kecepatan reaksi sehingga terbentuk *luciferase* tereksitasi. Ketika terjadi reaksi elektron menyerap energi, elektron tersebut akan dieksitasikan dari tingkat energi terendah (*ground electron state*) ke tingkat energi di atasnya. Pada tingkat energi yang lebih tinggi, elektron akan tidak stabil dan akan kembali lagi ke keadaan dasarnya yang disebut relaksasi (*resting rate*) sambil melepaskan paket energi yang disebut foton dalam bentuk cahaya (Werbiewe *et al.*, 1970 dalam Pringgenies dan Sedjati, 2004).

Hasil penelitian dapat dilihat bahwa antara zona hambat dan kekuatan pendar cahaya bakteri isolat. Hasil memperlihatkan tidak ada hubungan antara zona hambat yang terbentuk dan kekuatan pendarnya. Kekuatan pendar cahaya isolat bakteri tidak mempengaruhi mekanisme kerja antimikrobal dari isolat bakteri.

Identifikasi Bakteri

Keanekaragaman bakteri laut khususnya yang bersimbiosis dengan cumi-cumi masih terbatas diteliti, maka perlu penelitian lebih lanjut tentang keanekaragaman bakteri yang terdapat pada cumi-cumi.

Mengingat hanya 1% bakteri laut yang baru berhasil diisolasi dengan media dan teknik yang ada, maka terdapat kemungkinan ditemukan jenis bakteri berpendar

lain yang terdapat di alam dan mampu bersimbion dengan cumi-cumi jenis *Loligo* sp. selain dari *Photobacterium phosphoreum* yang telah berhasil diisolasi dari bakteri simbion *Loligo duvauceli* (Pringgenies *et al.*, 2001). Untuk mengestimasi diversitas dari 99% bakteri laut lainnya maka pendekatan non kultur atau metagenomik pun dilakukan.

Tabel homologi sekuen 16S rDNA masing-masing isolat bakteri dengan sekuen 16S rDNA dari database *Gen Bank* menunjukkan bahwa sekuen 16S rDNA yang tinggi kekerabatannya. Hagstrom *et al.* (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93% - 97% dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus tetapi berbeda spesies.

Hasil identifikasi dengan menggunakan BLAST, menunjukkan bahwa LDS 12-4 memiliki homologi terdekat sebesar 98% dengan *Uncultured bacterium* clone 1P-1-G05 dan LDS 18-5 memiliki homologi terdekat sebesar 95% dengan *Uncultured bacterium* clone 3g10a. Kedua isolat tersebut memiliki tingkat kemiripan tertinggi masing-masing 98% dan 95% dengan clone bakteri. Sedangkan kedua clone (klon) tersebut merupakan hasil dari studi metagenomik dimana keduanya berasal dari campuran ekstrak DNA yang diisolasi dari alam dan belum berhasil diisolasi sebagai ekstrak murni.

Dari 8 sekuen DNA yang membentuk cabang yang sama pada pohon filogenik, terlihat bahwa isolat LDS 12-4 memiliki kekerabatan tertinggi dengan 3 klon yang tidak dapat dikultur (*Uncultured bacterium* clone 1P-1-G05, *Uncultured bacterium* clone 1P-1-E15 dan *Uncultured virgibacillus* sp. clone 1P-2-P11) dan terhadap bakteri genus *Bacillus* dan *Virgibacillus*. Sedangkan isolat LDS 18-5 memiliki kekerabatan tertinggi dengan 2 klon yang tidak dapat dikultur (*Uncultured bacterium* 3g10a dan *Uncultured virgibacillus* sp. clone C-94-19) dan juga terhadap bakteri genus *Virgibacillus*. Pohon filogenik juga mengkonfirmasi bahwa meskipun kedua isolat memiliki kekerabatan dengan klon, tetapi percabangannya menunjukkan bahwa kedua isolat berada pada grup *Virgibacillus*.

Menurut Nensis (1982) *dalam* Pringgenies dan Sejati (2004) kelompok bakteri luminesensi yang terdapat dalam air laut yaitu genus *Vibrio* dan *Photobacterium*. Pada penelitian ini diperoleh bakteri berpendar yang memiliki kekerabatan terdekat dengan kelompok *Virgibacillus*. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini telah berhasil diisolasi bakteri-bakteri laut yang selama ini terdeteksi berada di alam berdasarkan studi metagenomik. Keberhasilan isolasi bakteri simbiosis cumi-cumi *Loligo* sp. memperkuat pentingnya pendekatan metagenomik dalam mengestimasi diversitas bakteri laut.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa hasil uji terhadap 35 isolat bakteri simbiosis organ cahaya *Loligo* sp. diperoleh 14 isolat yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR yaitu : LDS 3-5, LDS 4-5, LDS 5-5, LDS 6-5, LDS 7-5, LDS 8-5, LDS 13-5, LDS 18-5, LDS 19-5, LDS 5-4, LDS 8-4, LDS 9-4, LDS 12-4, LDS 13-4. Selanjutnya bahwa isolat LDS 12-4 dan LDS 18-5 mempunyai kemampuan paling besar dalam menghambat bakteri uji MDR.

DAFTAR PUSTAKA

- Brock, T.D. and Madigan, M.T. 1991. *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International Inc. London. 874 pp.
- Conception, G. P., G. B. Caraan and J. E. Lazaro. 1994. Biological Assays for Screening of Marine Samples. In : *Workbook Second Natural Products Workshop: Strategies in the Quest for Novel Bioactive Compounds from the Sea*. Marine Science Institute and Institute of Chemistry, University of Philippines. Deliman, Quezon City, Philippines.
- Edward, J.K. Patterson and Murugan, A. 2000. Screening of Cephalopods for Bioactivity. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*. 21 : 253-256.
- Habibie, M. N. 2005. *Eksplorasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Lunak Lobophyton sp. Sebagai Kandidat Probiotik Pengendali Vibriosis*. Jurusan Ilmu Kelautan FPIK UNDIP Semarang. Skripsi.(Tidak dipublikasikan). 67 hlm.
- Hagström, A., J. Pinhassi and U.L. Zweifel. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21 : 231-244
- Kelecom, A. 2001. Secondary Metabolites from Marine Microorganism. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 74 (1) : 151-170.
- Kelly, F and E.K. Hite. 1955. *Microbiology*. Appleton Century Crofts Inc. New York. 615 pp.
- Lay, B. W. dan S. Hastowo. 1992. *Mikrobiologi*. Edisi I. Radjawali. Jakarta.
- Manitto, P. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. IKIP Semarang Press. Semarang. 597 hlm (Alih Bahasa : Koensoemardiyah)
- Nyhlmom, S. V. and McFall-Ngai, M. J. 2004. The Winnowing : Establishing The Squid- *Vibrio* Symbiosis. *Nature Rieviews. Microbiology* 2 : 632-642.
- Pringgenies, D. dan Hartati, R. 2004. Gross Structure Of Luminous Of The Squid *Loligo duvauceli* d'Orbigny, 1835. *Majalah Ilmu Kelautan*. Pringgenies *et al.*, 2001).
- Pringgenies, D. dan Sedjati, S. 2004. Isolasi dan Determinasi Bakteri Luminesensi yang Bersimbiosis pada Cumi-cumi *Loligo duvauceli*. *Ilmu Kelautan*. 9 (1) : 26-30.
- Radjasa, O. K., Agus S., Subagyo, Wilis A.S., Agus Trianto, dan Ali Djunaedi. 2003. *Skrining Organisme Laut Pada Ekosistem Terumbu Karang Penghasil Senyawa Bioaktif*. Laporan Penelitian Program Studi Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro Semarang. (Tidak dipublikasikan).
- Radjasa, O.K., Martens T, Brinkoff, Grossart HP, Sabdono A, Simon M. 2007a. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J Biol Sci* 7: 239-246.

- Taslihan, A. 1991. Vibriosis pada Udang Windu. BPAP. Jepara. (Tidak dipublikasikan).
- Terkina, I. A., V. V. Parfenova, and T. S. Ahn. 2006. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology*: 42 (2), pp. 173–176.
- Wattimena, J.R., Nelly, C., Sugiarto, Widiyanto, M.A., Sukandar, E.Y., Soemardji, A.A. dan Setiadi, A.R. 1991. Farmakodinamika dan Terapi Antibiotik. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 168 hlm.