

Potensi dan Karakteristik Bakteri Simbion Karang Lunak *Sinularia* sp. sebagai Anti Bakteri *Escherichia coli* dari Perairan Pulau Gili Labak Madura Indonesia

Eka Nurrahema Ning Asih*, Ary Giri Dwi Kartika

Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo Madura
Jl. Raya Telang, Telang-Kamal, Bangkalan, Jawa Timur 69162 Indonesia
*Corresponding author, e-mail: eka.asih@trunojoyo.ac.id

ABSTRAK: Gili Labak merupakan pulau kecil di Kabupaten Sumenep-Madura yang memiliki keanekaragaman karang lunak melimpah salah satunya *Sinularia* sp.. Beberapa studi literatur menyatakan bahwa *Sinularia* sp. memiliki berbagai jenis bakteri simbion yang berperan penting dalam siklus hidup karang lunak ini. Bakteri yang bersimbiosis dengan *Sinularia* sp. memiliki potensi besar sebagai agen anti bakteri khususnya bakteri gram negatif *Escherichia coli*. Identifikasi isolat bakteri yang bersimbiosis dengan *Sinularia* sp. ini merupakan alternatif upaya pemanfaatan sumberdaya karang lunak secara konservatif dan keberlanjutan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi anti bakteri dan mengidentifikasi jenis bakteri simbion dari ekstrak karang lunak *Sinularia* Sp. yang berasal dari perairan Gili Labak Madura. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji zona hambat bakteri menggunakan overlay dan metode difusi dengan media ZoBell 2216E. Karakteristik molekuler sampel diamati menggunakan metode PCR 16s rDNA dengan ekstraksi DNA menggunakan Chelex 100 dan Primer amplifikasi PCR 27F dan 1492R. Pohon filogenetik dibangun dengan menggunakan aplikasi MEGA 6. Hasil penelitian diketahui dari 4 isolat bakteri (L2.2, L2.3, L2.4, dan L2.5), terdapat 1 isolat yang memiliki aktivitas antibakteri *Escherichia coli* kuat yaitu Isolat L2.5. Isolat L2.5 memiliki diameter zona hambat terbesar yaitu 2.207 ± 0.401 cm. Strain bakteri aktif di Isolat L2.5 adalah *Virgibacillus marismortui* dengan kemiripan urutan 100%. Hasil penelitian ini menjadi informasi awal yang dapat digunakan sebagai referensi untuk mengoptimalkan potensi pemanfaatan bakteri *Virgibacillus marismortui* di bidang bioteknologi laut khususnya industri farmasi di masa yang akan datang.

Kata kunci: *Escherichia coli*; *Sinularia* sp.; *Virgibacillus marismortui*; Zona hambat bakteri

Potential and Characteristics of Bacteria Associated with *Sinularia* sp. as *Escherichia coli* Antibacterial from Gili Labak Madura Waters

ABSTRACT: Gili Labak is a small island in Madura district which has a diversity of soft coral *Sinularia* sp. Several literature studies state that *Sinularia* sp. has various types of symbiotic bacteria that play an important role in the life cycle of this soft coral. This symbiotic bacterium with *Sinularia* sp. has great potential as an antibacterial agent especially inhibiting of gram-negative bacteria *Escherichia coli*. Identification of bacterial isolates that are in symbiosis with *Sinularia* sp. is an alternative to conservative and sustainable use of soft coral resources. This study aims to determine the anti-bacterial potential and identify the type of bacteria from the soft coral extract of *Sinularia* sp. from the waters of Gili Labak-Madura. The method used in this research is bacterial inhibition zone test using overlay and diffusion methods with ZoBell 2216E media. Molecular characteristics of samples were observed using PCR 16s rDNA method with DNA extraction using Chelex 100 and PCR amplification primers 27F and 1492R. Phylogenetic trees were constructed using MEGA 6 application. The results showed that there were 4 isolates (L2.2, L2.3, L2.4, and L2.5), there was 1 isolate that had strong *Escherichia coli* antibacterial activity, namely Isolate L2.5. L2.5 isolate has the largest inhibitory zone diameter of 2.207 ± 0.401 cm. The active bacterial strain in the L2.5 isolate was *Virgibacillus marismortui* with 100% sequence similarity. The results of this study serve as initial information that can be used as a reference to optimize the potential utilization of *Virgibacillus marismortui* bacteria in marine biotechnology, especially the pharmaceutical industry in the future.

Keywords: *Escherichia coli*; *Sinularia* sp.; *Virgibacillus marismortui*; Bacterial inhibition zone.

PENDAHULUAN

Ekosistem terumbu karang merupakan ekosistem hayati laut kompleks yang bersifat multi peran diantaranya berperan penting bagi ekologis, ekonomi, wisata, kimia dan biologis (Salanggon dan Finarti, 2016). Salah satu peran penting terumbu karang khususnya karang lunak pada sektor ekonomi yaitu sebagai *marine natural product*, karena biota ini memiliki suatu substansi yang berperan sebagai bahan aktif yang disebut kandungan senyawa bioaktif (Rozirwan *et al.*, 2014). Kandungan senyawa bioaktif pada karang lunak terbentuk dari hasil metabolit sekunder. Senyawa bioaktif yang diproduksi oleh karang lunak ini digunakan sebagai alat mempertahankan diri dari acaman yang ada di sekitar ekosistem terumbu karang (Tanod *et al.*, 2019). Karang lunak juga memiliki sifat *allelopatik* yaitu kemampuan tubuh biota ini untuk mengeluarkan zat tertentu yang biasanya digunakan sebagai alat perlindungan diri dari predator (Chen *et al.*, 2012).

Salah satu genus karang lunak yang mendominasi dan banyak di temukan di perairan laut Indonesia adalah *Sinularia* (Dewanto *et al.*, 2019). Karang lunak *Sinularia* sp. tumbuh dan berkembang biak secara optimal pada rata-rata suhu perairan berkisar 23-25°C dan salinitas sebesar 32-35 ‰. *Sinularia* sp. memiliki potensi besar sebagai bahan baku farmasi karena biota ini menghasilkan beberapa senyawa bioaktif diantaranya terpen (Kamel dan Slattery, 2005), diterpenes flexibilide dan sinulariolide (Aceret *et al.*, 1998), senyawa sinugran-disterols A-D dan trihydroxysteroids (Ahmed *et al.*, 2007), cembrane diterpenoids (Lin *et al.*, 2009), steroid hurgadacin (Shaaban *et al.*, 2013) dan sesquiterpenoids capillosananes S-Z (Chen *et al.*, 2014). Senyawa-senyawa bioaktif pada *Sinularia* sp. ini berfungsi sebagai senyawa bioaktif yang berperan menghambat aktivitas bakteri atau dikenal sebagai anti bakteri (Rozirwan *et al.*, 2014), antivirus dan anti inflamasi (Cheng *et al.*, 2010), penghambat aktivitas NFκB dan iNOS (Riyadi *et al.*, 2019) dan penghambat aktivitas NO (Fattorusso *et al.*, 2011 dan Putra *et al.*, 2012).

Gili Labak adalah salah satu pulau kecil di Kabupaten Sumenep-Madura yang berdasarkan hasil foto citra LDCM (*Landsat Data Continuity Mission*) memiliki luas terumbu karang sebesar 66 ha dengan rincian luas terumbu karang hidup yaitu 49.089,6 cm² dan luas terumbu karang mati yaitu 51.654,6 cm² (Muhsoni, 2017). Pulau ini yang memiliki keanekaragaman karang lunak melimpah salah satunya *Sinularia* sp. Beberapa literatur menyatakan bahwa ekstrak *Sinularia* sp. memiliki aneka ragam senyawa bioaktif misalnya steroid. Steroid yang terkandung dalam *Sinularia* sp. tergolong senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai anti bakteri (Rajaram *et al.*, 2014) dan berpotensi menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* sebesar 80-90% (Salanggon *et al.*, 2020). Pemanfaatan *Sinularia* sp. sebagai sumber anti bakteri *Escherichia coli* membutuhkan kajian yang cermat karena kegiatan ini secara tidak langsung dapat mengancam populasi karang lunak *Sinularia* sp. di perairan khususnya perairan Gili Labak. Salah satu upaya konservatif dalam pemanfaatan *Sinularia* sp. sebagai anti bakteri *Escherichia coli* adalah dengan memanfaatkan mikroorganisme berupa bakteri yang bersimbiosis dengan karang lunak tersebut. Identifikasi potensi dan karakteristik bakteri simbion karang lunak *Sinularia* sp. sebagai anti bakteri *Escherichia coli* dari perairan pulau Gili Labak Madura perlu dilakukan sebagai upaya menemukan informasi tentang pemanfaatan bakteri simbion *Sinularia* sp. sebagai anti bakteri dengan tidak mengganggu populasi karang ini di alam. Hal inilah yang melatarbelakangi penelitian ini dilaksanakan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui potensi anti bakteri dan mengidentifikasi jenis bakteri simbion dari ekstrak karang lunak *Sinularia* sp. yang berasal dari perairan Gili Labak Madura.

MATERI DAN METODE

Sampel *Sinularia* sp. dikumpulkan dari perairan Gili Labak Kabupaten Sumenep-Madura menggunakan *Scuba diving* dengan kedalaman 7-11 meter pada titik koordinat 07°12'17.2" LS dan 114°02'59.9" BT (Gambar 1). Sampel yang telah dikolektif kemudian disimpan dengan cara dimasukkan kedalam plastik zip lock dan dimasukkan ke dalam *cool box*. Sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Prodi Ilmu Kelautan Universitas Trunojoyo Madura untuk dilakukan isolasi bakteri. Isolasi bakteri dilakukan dengan menghancurkan sampel *Sinularia* sp. menggunakan mortar dan alu steril. Sampel halus dihomogenkan dengan 9 mL air laut sebagai pengenceran 10⁻⁰, kemudian dilakukan pengenceran berkala yaitu dari pengenceran 10⁻¹ sampai

10^{-5} . Setiap pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} dicuplik sebanyak 100 μ L lalu disebar di atas media agar half strength zobell 2216E dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar (Benson, 2002).

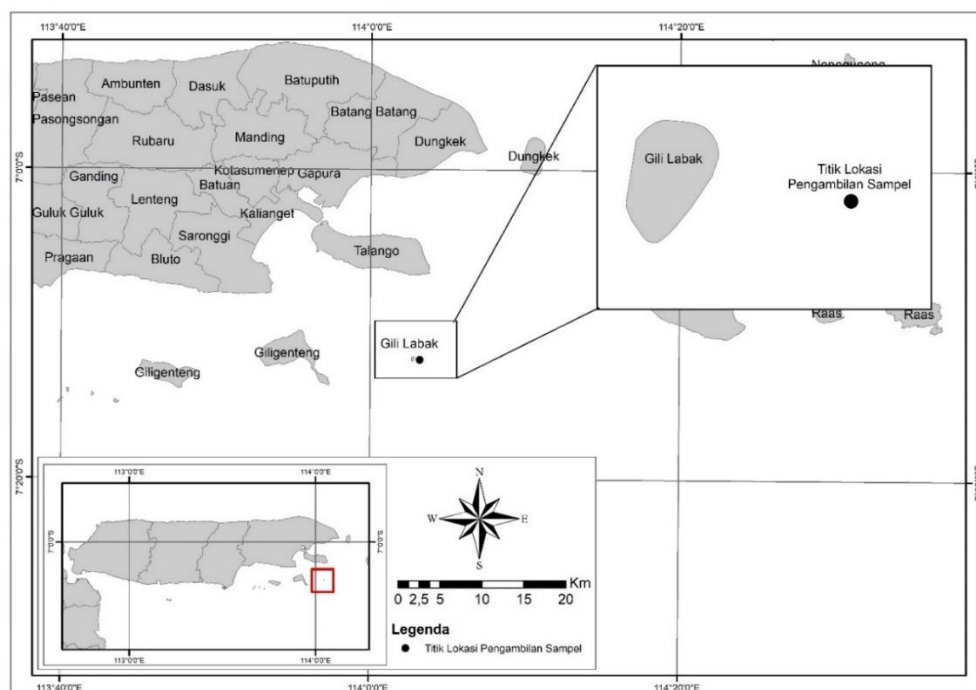
Uji Zona Hambat Bakteri (Sabdono dan Radjasa, 2006)

Uji zona hambat bakteri simbion karang lunak *Sinularia* sp. terhadap bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan metode overlay (Sabdono dan Radjasa, 2006) dan metode difusi agar (Radjasa *et al*, 2007). Metode overlay dimulai dengan cara mengambil satu ose bakteri simbion *Sinularia* sp. ditanam pada media ZoBell 2216E laut dengan bentuk bulatan kecil sebanyak 5 - 12 titik bakteri dalam 1 cawan petri. Sampel biakan tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama 2 hari. Isolat bakteri *Escherichia coli* ditanam pada media cair Zobell 2216E kemudian homogenkan dengan rotary shaker selama 2x24 jam. Suspensi bakteri *Escherichia coli* tersebut kemudian diambil 1 mL (1% dari total volume soft agar) dan dimasukkan ke dalam 100 mL media Zobell 2216E soft agar. Aktivitas zona hambat bakteri diamati dengan indikator terbentuknya zona bening pada biakan bakteri *Escherichia coli* pada media Zobell 2216E soft agar yang telah dituangkan kedalam cawan petri yang berisi biakan bakteri simbion *Sinularia* sp.

Metode difusi agar dimulai dari membuat biakan bakteri *Escherichia coli* dengan cara mengambil 100 μ L bakteri *Escherichia coli* pada fase log (10^9 sel/mL) disebar diatas media agar zobell 2216E. Biakan bakteri *Escherichia coli* tersebut kemudiaspn diberi sepuluh kertas cakram yang telah berisi bakteri *Sinularia* sp. di atas permukaannya dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya clear zone disekitar kertas cakram.

Ekstraksi DNA (Walsh *et al.*, 1991)

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Chelex 100 menurut Walsh *et al.*, (1991). Sel bakteri simbion *Sinularia* sp. diambil dan dimasukkan ke dalam mikrotube steril berisi 100 μ L Aquabides (ddH₂O) dan 1 mL Saponin 0,5% dalam PBS. Simpan sampel tersebut selama 24 jam pada suhu 40°C. Sampel bakteri dalam mikrotube yang telah disimpan 24 jam tersebut disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan pisahkan supernatannya. Sampel ditambahkan 1 mL ddH₂O steril dalam PBS kemudian dicentrifuge kembali dan pisahkan supernatannya untuk mencuci atau menghilangkan residu saponin. Pelet yang telah bebas dari residu saponin tersebut ditambahkan 100 μ L Aquabides (ddH₂O) dan 50 μ L Chelex 100 20%,



Gambar 1. Titik Lokasi Pengambilan Sampel *Sinularia* sp.

kemudian dipanaskan selama 10 menit pada suhu 90°C dan di homogenkan menggunakan vortex sesekali setelah 5 menit serta dicentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Konsentrasi DNA diukur menggunakan Spektrofotometer Nano Drop 2000m. Ekstraksi DNA disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C.

Amplifikasi PCR 16S rDNA (Sabdono dan Radjasa, 2006)

Amplifikasi PCR 16S rDNA adalah metode standar yang digunakan untuk mengecek filogenetik dan keanekaragaman mikroorganisme laut (Sabdono dan Radjasa, 2006) salah satunya bakteri simbiosis *Sinularia* sp. Primer yang digunakan dalam analisa filogenetik bakteri simbiosis *Sinularia* sp. untuk PCR 16s rDNA adalah primer universal 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik *eubacteria* 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') merujuk pada Lane (1991). Komposisi produk PCR yang digunakan GoTaq®Green Master Mix Promega (12,5 µL), primer 27 F (1 µL), primer 1492 R (1 µL), template DNA (1 µL) and ddH₂O (9,5 µL), sehingga total produk PCR yaitu 25 µL. Perlakuan temperatur yang digunakan PCR 16S rDNA ini yaitu tahap denaturasi awal menggunakan suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi menggunakan suhu 95°C selama 1 menit, tahap annealing menggunakan suhu 55°C selama 1 menit, dan tahap extension menggunakan suhu 72°C selama 1 menit. Pengujian dilakukan di laboratorium Tropical Marine Biotechnology, UNDIP.

Pembuatan Pohon Filogenetik (Altschul et al., 1997; Radjasa et al., 2008)

Produk PCR dilakukan dianalisis sekuen DNA kemudian produk dianalisa menggunakan koneksi internet melalui program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada laman *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* yaitu www.ncbi.nlm.nih.gov (Altschul et al., 1997; Radjasa et al., 2008). Sekuens yang diperoleh selanjutnya diolah menggunakan software MEGA 6. Pohon filogenetik dilakukan dengan cara mensejajarkan seluruh sekuens dan sekuens pembandingnya menggunakan analisis algoritma metode Neighbor-Joining (NJ) dan pengujian nilai bootstrap 10000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karang lunak secara alamiah memproduksi 60% substansi bioaktif (Higa et al., 2001; Sheu et al., 2002) berupa senyawa metabolit sekunder diantaranya steroid, steroid glikosida dan terpenoid yang berfungsi sebagai antibakteri patogen (Wang et al., 2012). Jenis dan struktur kimia metabolit sekunder yang dihasilkan oleh karang lunak beraneka ragam dan bersifat unik (Minh et al., 2011; Blunt et al., 2013). Senyawa ini diproduksi oleh organisme saat kebutuhan metabolisme primer tercukupi, sehingga senyawa metabolit sekunder cenderung digunakan untuk mekanisme evolusi dan bahan untuk adaptasi lingkungan (Yang et al., 2018). Kemampuan ekstrak *Sinularia* sp. dalam menghambat pertumbuhan bakteri tidak lepas dari peran kandungan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh biota laut ini. Salanggon et al., (2020) melaporkan *Sinularia* sp. memproduksi beberapa senyawa meatabolit sekunder diantaranya turunan dari golongan alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid. Senyawa steroid yang terkandung pada karang lunak digunakan sebagai materi biologis untuk menghambat aktivitas inflamasi, kanker, bakteri dan alergi (Jia et al., 2005).

Ekstrak karang lunak dari genus *Sinularia* sp. memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang kuat (Rozirwan et al., 2014). Berdasarkan studi literatur hasil penelitian yang pernah dilaksanakan sebelumnya menyatakan bahwa ekstrak *Sinularia* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif diantaranya menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dengan konsentrasi hambat minimum (MIC) mencapai 7,8 ug.L⁻¹ dan bakteri *Escherichia coli* mencapai 62,5 ug.L⁻¹ (Aboutabl et al., 2013). Karang lunak *Sinularia* sp. yang diekstrak menggunakan fraksi ethanol juga mampu menghambat aktivitas bakteri *Escherichia coli* dengan membentuk diameter zona hambat sebesar 1,763±1,74 cm dan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 1,743±2,29 cm Tanod et al., (2018). Beberapa hasil penelitian sebelumnya ini menunjukkan bahwa pemanfaatan ekstrak *Sinularia* sp. sebagai anti *Escherichia coli* sudah sering dikaji dan digunakan.

Hasil pengujian aktivitas anti bakteri *Escherichia coli* menggunakan isolat bakteri simbiosis karang lunak dari perairan pulau Gili Labak-Madura tertera pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan

bahwa zona hambat bakteri menggunakan metode overlay dan metode difusi menggunakan media ZoBell 2216E diperoleh dari 4 isolat bakteri dan hanya ada 1 isolat yang mengindikasikan adanya kemampuan menghambat aktivitas antibakteri *Escherichia coli*. Indikator terjadinya aktivitas anti bakteri *Escherichia coli* tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening yang di sekitar kertas cakram yang telah ditempatkan diatas permukaan biakan bakteri *Escherichia coli*. Hasil pengujian difusi agar ditemukan isolat dengan kode L2.5 memiliki diameter zona hambat lebih besar yaitu sebesar $2,207 \pm 0,401$ cm (Tabel 1). Diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* dari bakteri simbion *Sinularia* sp. yang berasal dari perairan Gili Labak ini termasuk kategori kuat dengan ukuran diameter yang lebih besar jika dibandingkan hasil penelitian sebelumnya. Katiandagho *et al.*, (2019) menyatakan karang *Sinularia* sp. yang diekstrak menggunakan fraksi metanol dapat menghasilkan daya hambat bakteri *Escherichia coli* sebesar 1,267 cm sedangkan pada fraksi kloroform sebesar 1,05 cm. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan bakteri yang bersimbion dengan karang lunak *Sinularia* sp. sebagai antibakteri bakteri *Escherichia coli* berpeluang besar dan konservatif dibandingkan penggunaan ekstrak karang lunak *Sinularia* sp. secara langsung.

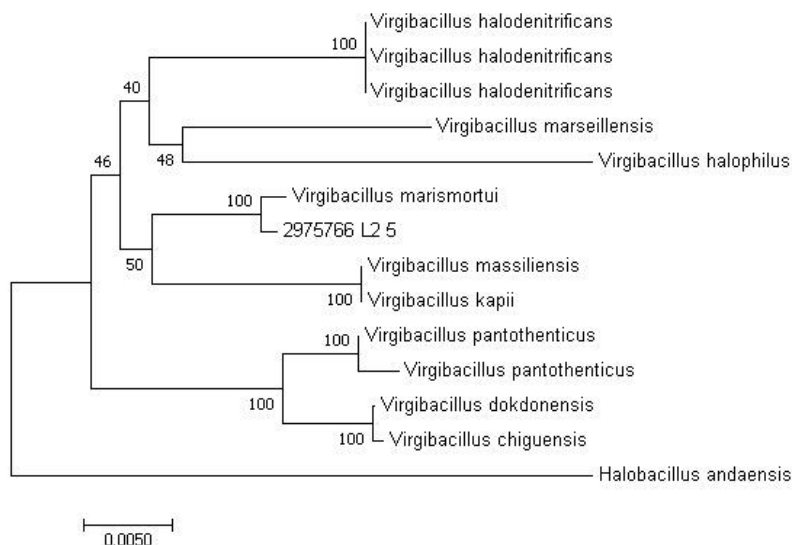
Identifikasi jenis bakteri simbion karang lunak *Sinularia* s. aktif pada isolat dengan kode L2.5 perlu dilakukan untuk memastikan jenis bakteri pada isolat tersebut. Pengujian jenis bakteri pada isolat ini dilakukan dengan uji molekuler berdasarkan pendekatan genetiknya menggunakan 16S rDNA. Hasil identifikasi secara molekuler ditunjukkan pada Tabel 2 dan Gambar 2.

Tabel 1 Hasil uji aktifitas anti bakteri dan uji difusi dari bakteri simbion *Sinularia* sp.

Kode Isolat	Uji aktifitas anti bakteri dan uji difusi bakteri simbion <i>Sinularia</i> sp.	
	Aktivitas antibakteri	Diameter Zona Hambat (cm)
L2.5	+	$2,207 \pm 0,401$

Tabel 2 Karakteristik molekuler dari bakteri simbion *Sinularia* sp.

Kode Isolat	Karakteristik molekuler dari bakteri simbion <i>Sinularia</i> sp.	
	Kerabat dekat	Kemiripan (Similarity)
L2.5	<i>Virgibacillus marismortui</i>	100%



Gambar 2. Pohon filogenetik 16s menggunakan metode Neighbor-joining dari simbion bakteri *Sinularia* sp. berpotensi sebagai antibakteri *Escherichia coli*.

Tabel 2 menunjukkan bahwa hasil analisis filogenetik molekuler menunjukkan bahwa isolat bakteri simbion karang lunak *Sinularia* sp. aktif sebagai anti bakteri *Escherichia coli* kuat tersebut adalah *Virgibacillus marismortui* dengan kemiripan 100%. *Virgibacillus marismortui* merupakan jenis bakteri yang berkerabat dekat dengan *Virgibacillus massiliensis* dan *Virgibacillus kapii* (Gambar 2). Genus *Virgibacillus* merupakan klasifikasi bakteri yang tergolong gram positif motil dan pembentuk endospora, serta memiliki sifat halofilik (Peng *et al.*, 2009). Terdapat 16 spesies yang ditemukan dari genus ini saat ini (Heyndrickx *et al.*, 1998).

Bakteri *Virgibacillus marismortui* merupakan kelompok bakteri yang bersifat motil. Bakteri ini memiliki karakter visual koloni yang melingkar dan tidak beraturan, menonjol, dan berwarna putih krem dengan diameter 2-6 mm (Tanasupawat *et al.*, 2010). *Virgibacillus marismortui* hidup pada kondisi aerobik pada kisaran suhu yang luas yaitu 15-50°C, pH berkisar 6,0-8,0 dan tumbuh optimal dengan kadar salinitas yang tinggi atau dikenal dengan sebutan bakteri halofilik (Arahal *et al.*, 1999). Bakteri halofilik adalah kelompok bakteri yang pertumbuhannya tergantung pada kadar NaCl (Pelczar dan Chan, 1988). Kadar NaCl yang didiami sebagai habitat bakteri halofilik ini berkisar antara 2% (setara dengan 0,3 M) hingga 30% (setara dengan 5 M) (Ford, 1993). Bakteri halofilik diklasifikasikan tiga yaitu spesies halofil rendah (spesies halofilik yang tumbuh optimal pada 2-5% NaCl), spesies halofil sedang (spesies halofilik yang tumbuh optimal pada 5-20 NaCl) dan jenis halofil yang ekstrim (spesies halofilik yang tumbuh optimal pada kadar garam sekitar 20-30% NaCl) (Dassarma dan Arora, 2001).

KESIMPULAN

Potensi bakteri simbion karang lunak *Sinularia* sp. sebagai anti bakteri *Escherichia coli* dari Perairan Pulau Gili Labak Madura teridentifikasi pada Isolat L2.5 dengan indikator terbentuknya diameter zona hambat sebesar 2,207±0,401 cm. Strain bakteri aktif di Isolat L2.5 adalah *Virgibacillus marismortui* dengan kemiripan 100%. Hasil penelitian ini menjadi informasi awal yang dapat digunakan sebagai referensi untuk mengoptimalkan potensi pemanfaatan bakteri *Virgibacillus marismortui* di bidang bioteknologi laut khususnya industri farmasi di masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Trunojoyo Madura melalui Program Hibah Penelitian Mandiri UTM 2017 dengan nomor kontrak penelitian: 2717/UN46.3.1/PN/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17):3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Aboutabl, E.S.A., Azzam, S.M., Michel, C.G., Selim, N.M., Hegazy, M.F., Ali, A.H. & Hussein, A.A. 2013. Bioactive Terpenoids from The Red Sea Soft Coral *Sinularia polydactyla*. *Natural Product Research*, 27(23):2224-2226. DOI: 10.1080/14786419.2013.805333.
- Aceret, T.L., Coll, J.C., Uchio, Y. & Sammarco, P.W. 1998. Antimicrobial Activity of The Diterpenes Flexibilide and Sinularioidide Derived from *Sinularia flexibilis* Quoy and Gaimard 1833 (Coelenterata: Alcyonacea, Octocorallia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 120(1):121-126. DOI: 10.1016/S0742-8413(98)00032-2.
- Ahmed, A.F., Tai, S.H., Wu, Y.C. & Sheu, J.H. 2007. Sinugrandisterols A-D, Trihydroxysteroids from The Soft Coral *Sinularia grandilobata*. *Steroids*, 72(4):368-374. DOI: 10.1016/j.steroids.2007.01.001
- Arahal, D.R., Marquez, M.C., Volcani, B.E., Schleifer, K.H. & Ventosa, A. 1999. *Bacillus marismortui* sp. nov., A New Moderately Halophilic Species from The Dead Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2):521-530. DOI: 10.1099/00207713-49-2-521.

- Benson, H.J. 2002. Microbiological Applications a Laboratory Manual in General Microbiology, Ed.8, The Mcgraw-Hill Companies, New York.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. 2013. Marine Natural Products. *Natural Product Report*, 30(2):237–323. DOI: 10.1039/c2np20112g.
- Chen, W., Li, Y. & Guo, Y. 2012. Terpenoids of *Sinularia* Soft Corals: Chemistry and Bioactivity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(3):227–237. DOI: 10.1016/j.apsb.2012.04.004.
- Chen, D., Cheng, W., Liu, D., Ofwegen, L. V., Proksch, P. & Lin, W. 2014. Capillosananes S–Z, New Sesquiterpenoids from The Soft Coral *Sinularia capillosa*. *Tetrahedron Letters*, 55(19):3077-3082. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.03.132.
- Cheng, S.Y., Chuang, C.T., Wen, Z.H., Wang, S.K., Chiou, S.F., Hsu, C.H., Dai, C.F., & Duh, C.Y., 2010. Bioactive Norditerpenoids from The Soft Coral *Sinularia gyrosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(10):3379-3386. DOI:10.1016/j.bmc.2010.04.012.
- DasSarma, S. & Arora, P. 2001, Halophiles: Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, USA.
- Dewanto, D.K., Finarti, Hermawan, R., Ndobe, S., Haryadi, P.H. & Tanod, W.A. 2019. Aktivitas antioksidan ekstrak karang lunak asal Teluk Palu, Sulawesi Tengah, Indonesia. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 14(2):163-178. DOI: 10.15578/jpbkp.v14i2.583
- Fattorusso, E., Luciano, P., Putra, M.Y., Tagliatela-Scafati, O., Ianaro, A., Panza, E. & Cerrano, C., 2011. Chloroscabrolides, Chlorinated Norcembranoids from The Indonesian Soft Coral *Sinularia* sp. *Tetrahedron*, 67(41):7983-7988. DOI: 10.1016/j.tet.2011.08.024.
- Ford, T.E. 1993. Aquatic Microbiology an Ecological Approach, Blackwell Scientific Publication, Boston.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De, V.P., Forsyth, G. & Logan, N.A. 1998. *Virgibacillus*: A New Genus to Accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom, Knight 1950) Emended Description *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1):99-106. DOI: 10.1099/00207713-48-1-99.
- Higa, T., Tanaka, J., Ohtani, I.I., Musman, M., Roy, M.C. & Kuroda, I., 2001. Bioactive Compounds from Coral Reef Invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*, 73(3):589-593. DOI: 10.1351/pac200173030589.
- Jia, R., Guo, Y., Mollo, E. & Cimino, G. 2005. Two New 19-oxygenated Polyhydroxy Steroids from The Hainan soft coral *Sinularia* sp.. *Natural Product Research*, 19(8):789–794. DOI: 10.1080/14786410500123833.
- Kamel, H.N. & Slattery, M. 2005. Terpenoids of *Sinularia*: Chemistry and Biomedical Applications. *Pharmaceutical Biology*, 43(3):253-269. DOI: 10.1080/13880200590928852.
- Katiandagho, L., Wewengkang, D.S. & Sudewi, S. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Karang Lunak *Sinularia* sp. di Teluk Manado. *Pharmacon*, 8(1):114-119. DOI: 10.35799/pha.8.2019.29244
- Lane, D.J, 1991. *16S/32S rRNA Sequencing*. In: Stackrbrandt, E. & Goodfellow M., 2013. *Nucleiuc Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons Inc, New York.
- Lin, Y.S., Chen, C.H., Liawa, C.C., Chen, Y.C., Kuo, Y.H. & Shen, Y.C. 2009. Cembrane Diterpenoids from The Taiwanese Soft Coral *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron*, 65(45):9157-9164. DOI: 10.1016/j.tet.2009.09.031.
- Minh, C.V., Kiem, P.V., Nhiem, N.X., Cuong, N.X., Thao, N.P., Nam, N.H., Anh, H.L.T., Tung, D.C., Thuy, D.T.T., Kang, H.K., Jang, H.D. & Kim, Y.H. 2011. Cytotoxic and Antioxidant Activities of Diterpenes and Sterols from The Vietnamese Soft Coral *Lobophytum compactum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(7):2155-2159. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.01. 072.
- Muhsoni, F.F. 2017. Potensi dan Pengelolaan Pulau Gili Labak dan Kajian Pulau di Sumenep, UTMpress, Bangkalan.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S., 1988, Dasar-dasar Mikrobiologi, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Peng, Q.Z., Chen, J., Zhang, Y.Q., Chen, Q. H., Peng, D.J., Cui, X.L., Li. W.J. & Chen, Y.G., 2009. *Virgibacillus zhangjiangensis* sp. nov., A Marine Bacterium Isolated from Sea Water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4):645-652. DOI: 10.1007/s10482-009-9381-0.

- Putra, M.Y., Lanaro, A., Panza, E., Bavestrello, G., Cerrano, C., Fattorusso, E. & Tagliatalata-Scafati, O., 2012. Sinularioside, A Triacetylated Glycolipid from The Indonesian Soft Coral *Sinularia sp.*, is An Inhibitor of No Release. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(8):2723–2725. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.02.102.
- Radjasa, O.K., Sabdono, A., Junaidi, A. & Zocchi, E., 2007. Richness of Secondary Metabolite-Producing Marine Bacteria Associated with Sponge *Haliclona Sp.* *International Journal of Pharmacology*, 3(3):275-279. DOI:10.3923/ijp.2007.275.279.
- Radjasa, O.K., Sabdono, A., Wiese, J. & Imhoff, J.F. 2008. Coral as Source of Bacteria with Antimicrobial Activity. *Journal of Coastal Development*, 11(3):121-130.
- Rajaram, S., Ramesh, D., Ramulu, U., Anjum, M., Kumar, P., Murthy, U.S.N., Sastry, G.N. & Venkateswarlu, Y. 2014. Chemical Examination of The Soft Coral *Sinularia kavarrattiensis* and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Indian Journal of Chemistry*, 53(8): 1086–1090.
- Riyadi, P.H., Wahyudi, D. & Tanod, W.A. 2019. Effects of Dichloromethane *Sarcophyton sp.p.* extract on the Lipopolysaccharide-induced Expression of Nuclear Factor-kappa B and Inducible Nitric Oxide Synthase Inmice. *Veterinary World*, 12(12):1897-1902. DOI: 10.14202/vetworld.2019.1897-1902.
- Rozirwan, Bengen, D.G., Zamani, N.P., Effendi, H. & Chaidir. 2014. Screening on The Potential Bioactive Compounds of Antibacterial Activity in Soft Coral Collected from South Bangka Island Waters and Lampung Bay. *Journal of Tropical Marine Science and Technology*, 6(2): 283-295. DOI: 10.29244/jitkt.v6i2.9005.
- Sabdono, A. & Radjasa, O.K. 2006. Anti-Bacterial Property of A Coral-Associated Bacterium *Bacillus sp* Against Coral Pathogenic BBD (Black Band Disease). *Journal of Coastal Development*, 9(3):175-182.
- Salanggon, A.M. & Finarti. 2016, Struktur Populasi Rekrut Karang Hermatifik pada Metode Fish Home di Teluk Palu. *Journal of Fisheries, Marine and Aquatic Science*, 1(1):33-38.
- Salanggon, A.M., Aswani, S., Hasanuddin, A., Hermawan, R., Riyadi, P.H., Dewanto, D.K. & Tanod, W.A. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sinularia sp.* dengan Metode Broth-Dilution. *Jurnal Kelautan Nasional*, 15(3):153-164.
- Shaaban, M., Shaaban, K.A. & Ghani, M.A. 2013. Hurgadacin: A New Steroid from *Sinularia polydactyla*. *Steroids*, 78(9):866-873. DOI: 10.1016/j.steroids.2013.05.006.
- Sheu, J.H., Ahmed, A.F., Shiue, R.T., Dai, C.F. & Kuo, Y.H. 2002. Scabrolides A-D, Four New Norditerpenoids Isolated from The Soft Coral *Sinularia scabra*. *Journal of Natural Product*, 65(12):1904-1908. DOI: 10.1021/np020280r
- Tanasupawat, S., Chamroensaksri, N., Kudo, T. & Itoh T. 2010. Identification of Moderately Halophilic Bacteria from Thai Fermented Fish (pla-ra) and Proposal of *Virgibacillus siamensis sp.nov.* *Journal of General and Applied Microbiology*, 56(5):369-379. DOI: 10.2323/jgam.56.369
- Tanod, W.A., Aristawati, A.T., Putra, M.Y. & Muliadin. 2018. Soft Coral (*Sinularia sp.*) Extracts with Antibacterial Activity. *Omni Akuatika*, 14(1):108-117. DOI: 10.20884/1.oa.2018.14.1.375.
- Tanod, W. A., Yanuhar, U., Maftuch, Wahyudi, D. & Risjani, Y. 2019. DPPH Scavenging Property of Bioactives from Soft Corals Origin Palu Bay, Central Sulawesi, Indonesia, *Proceeding of 1st International Conference on Fisheries and Marine Science*, Ternate, Oct 10-14.
- Wang, S.K., Hsieh, M.K. & Duh, C.Y. 2012. Three New Cembranoids from The Taiwanese Soft Coral *Sarcophyton ehrenbergi*. *Marine Drugs*, 10(7):1433-1444. DOI: 10.3390/md10071433.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*, 10(4):506-513.
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F., & Wang, Q., 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 23(762):1-26. DOI: 10.3390/molecules23040762.