



**SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI PADA EKSTRAK *Sargassum polycystum* TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi* DAN *Micrococcus luteus* DI PULAU PANJANG JEPARA**

**Erwin Ivan Riyanto<sup>\*)</sup>, Ita Widowati dan Agus Sabdono**

Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698  
email : Journalmarineresearch@gmail.com

**Abstrak**

*Sargassum polycystum* mempunyai berbagai macam zat senyawa bioaktif yang memiliki potensi sebagai antibakteri, antivirus, antijamur, serta antikanker. Pemanfaatan bahan hayati laut sebagai obat antibakteri adalah terobosan baru sebagai alternatif, obat yang sifatnya alami mempunyai efek samping lebih rendah dari pada obat sintetis, karena obat alami bisa tereduksi oleh tubuh ikan budidaya dan mudah terdegradasi lingkungan, sehingga dapat menambah nilai ekonomi *Sargassum polycystum* tersebut. Pelarut etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri paling baik terhadap bakteri *Vibrio harveyi* dan *Micrococcus luteus*. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai MBC (*minimum bacteriosidal concentration*) mencapai konsentrasi 0,5 µg/disk dengan nilai diameter 1.67 mm terhadap bakteri *V. harveyi* dan 4.55 mm terhadap bakteri *M. luteus*. Ekstrak *Sargassum polycystum* positif mengandung senyawa alkaloid pada ekstrak menggunakan pelarut heksana dan senyawa steroid pada pelarut metanol, Etil asetat, dan heksana. Uji toksisitas ekstrak *Sargassum polycystum* memiliki efek toksik terhadap *Artemia salina* dengan kategori toksik golongan kronis pada pengamatan ke-24 jam, dengan kata lain ekstrak *Sargassum polycystum* bersifat racun pada organisme hidup.

**Kata Kunci :** Skrining, Aktivitas antibakteri, *Sargassum polycystum*, *Vibrio harveyi*, *Micrococcus luteus*

**Abstract**

*Sargassum polycystum* have a wide variety of substances bioactive compounds that have potential as an antibacterial, antiviral, anti- fungal, and anticancer. Utilization of marine biological materials as antibacterial drugs is a new as an alternative, natural medicine nature has lower side effects than synthetic drugs, because the drug can be reduced naturally by the body and easy degradation on aquaculture, thus increasing the economic value of *Sargassum polycystum*. The solvent ethyl acetate has the most excellent antibacterial activity against bacteria *V. harveyi* and *M. luteus*. This is evidenced by the value of the MBC (*minimum bacteriosidal concentration*) reached a concentration of 0.5 ug/disk with a diameter of 1.67 mm against *V. harveyi* and 4.55 mm against *M. luteus*. Extract *Sargassum polycystum* containing positive alkaloid compounds in the extract using the solvent hexane and steroid compounds in methanol, ethyl acetate, and hexane. *Sargassum polycystum* extract toxicity test have toxic effects on *Artemia salina* with toxic chronic categories in the 24th hour of observation, in other words *Sargassum polycystum* extract is toxic to living organisms .

**Keywords:** Screening, antibacterial activity, *Sargassum polycystum*, *Vibrio harveyi*, *Micrococcus luteus*

<sup>\*)</sup> Penulis penanggung jawab



## Pendahuluan

Berbagai filum makroalga laut (rumput laut merah, coklat dan hijau) sudah dikenal sebagai penghasil molekul menarik untuk berbagai industri. Produksi biomassa alga telah diaplikasikan untuk pangan, pakan, bahan bakar, kosmetik, farmasi, pigmen, dan suplemen makanan. Rumput laut memiliki potensi sebagai sumber atau senyawa bioaktif baru dalam manusia, hewan, kesuburan tanaman, serta sumber *synthons* dan *biocatalysts* dalam studi kimia berkelanjutan (Widowati *et al.*, 2013). Budidaya perikanan sebagai salah satu sektor yang berpotensi menambah pendapatan negara, perlu perhatian lebih untuk menunjang kelancaran kegiatan budidaya tersebut, khususnya pada penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme. Contoh penyakit yang menyerang dalam budidaya perikanan adalah bakteri *vibriosis* (air payau/laut) dan bakteri *Micococcus luteus* (air tawar).

Efek dari penempelan bakteri ini dapat menyebabkan parasit, penyakit, dan pembusukan yang dapat menyebabkan kematian ikan budidaya tersebut. Secara umum tingkat tingkat kematian mencapai 90% dan menimbulkan kerugian besar dalam budidaya perikanan, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian supaya dapat memberikan solusi yang tepat untuk kasus ini.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *S. polycystum* terhadap bakteri *V. harveyi* dan *M. luteus* serta mengetahui golongan senyawa bioaktif dan tingkat toksisitas terhadap *Artemia salina*.

## MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Sargassum polycystum* yang diambil di Perairan Pulau panjang, Jepara. Isolat bakteri uji yang dipergunakan adalah *V. harveyi* dan *M. luteus* yang diperoleh dari

Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara. Penelitian ini dilakukan pada tanggal 9 September 2012 – 31 Februari 2013.

### 1. Pengambilan sampel

Tempat pengambilan sampel rumput laut *Sargassum polycystum* di tentukan secara purposive sampling method di perairan Pulau Panjang, Jepara. Sampel diambil dengan cara dipotong. Didalam penentuan titik stasiun menggunakan pendekatan fisiografi kemudian tagging menggunakan GPS diatas perahu, kemudian dicuci dengan air tawar sampai 5 kali pencucian untuk menghilangkan kotoran dan organisme yang menempel. Langkah selanjutnya sampel dikeringkan dengan cara di angin-anginkan dan dibolak-balik selama 1 minggu serta dihindarkan dari sinar matahari langsung.

### 2. Ekstraksi sampel *Sargassum polycystum*

Sampel dipotong dalam keadaan basah +/-5 cm kemudian di kering anginkan tanpa terkena sinar matahari selama 1 minggu. *S. polycystum* yang telah kering diblender supaya bisa muat didalam wadah ekstraksi. Perbandingan pelarut dengan sampel 4:1 (Modifikasi Vijayabaskar *et al.*, 2012). Serbuk rumput laut sebanyak 500 gr dilarutkan dalam 2 L pelarut. Maserasi dilakukan selama 1 x 24 jam pada suhu ruang. Pelarut yang digunakan ada 3 jenis yaitu etil asetat, heksana, dan metanol dengan 2 kali pengulangan. Setelah itu di saring dengan kertas saring, selanjutnya ekstrak dipisahkan antara zat terlarut dari pelarutnya dengan cara diuapkan menggunakan rotary evaporator.

### 3. Sterilisasi alat

Uji aktivitas antibakteri memerlukan peralatan dan bahan yang steril. Sterilisasi alat dan bahan dilakukan supaya semua dalam kondisi aseptis.



#### **4. Pembuatan Media**

##### **Air Laut steril 70 %**

Air laut steril 70 % digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan media biakan bakteri untuk uji aktivitas antibakteri.

##### **Media Nutrien Broth**

Media Nutrien Broth adalah media dalam bentuk cair yang digunakan untuk kultur bakteri.

##### **Media ZoBell 2261E**

Media ZoBell 2261E merupakan media universal dalam bentuk agar. Dalam penelitian ini digunakan sebagai media uji aktivitas antibakteri.

#### **5. Uji Aktivitas Antibakteri**

##### **Stok bakteri *V. harveyi* dan *M. luteus***

Penanaman bakteri pada media dengan teknik penggoresan bertujuan untuk mendapatkan bakteri yang murni dan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri.

##### **Uji Kualitatif Aktivitas Antibakteri**

Uji kualitatif dilakukan untuk membandingkan potensi senyawa antibakteri pada *Sargassum polycystum* dengan *Dictyota* sp., *Padina* sp., *Gracilaria* sp., *Halimeda* sp., dan *Eucheama* sp.. Uji kualitatif menggunakan metode difusi agar, interaksi hambatan diketahui dengan adanya zona hambatan di sekeliling paper disk kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong (Radjasa *et al.*, 2004). Sampel ditumbuk menggunakan mortar sampai halus kemudian diambil sebanyak 1 gr, kemudian ditempelkan secara aseptis ke permukaan media yang berisi bakteri uji, diinkubasi selama 1x24 jam dan diamati.

##### **Uji Kuantitatif Aktivitas Antibakteri**

Uji kuantitatif dilakukan menggunakan metode difusi agar, dengan perlakuan perbedaan pemberian konsentrasi ekstrak *Sargassum polycystum* pada *Paper disk* sebesar 100; 50; 25; 15; 5; 1; 0,5; dan 0,1 µg/disk (modifikasi Dashtiannasab *et al.*, 2012). Masing – masing konsentrasi ekstrak

tersebut diuji dengan bakteri *Vibrio harveyi* (gram negatif) dan *Micrococcus luteus* (gram positif). *Paper disk* yang sudah ditetesi senyawa antibakteri diletakkan pada media padat yang telah ditanami bakteri uji. Adanya zona hambat di sekeliling *paper disk* merupakan hasil interaksi hambatan, kemudian diukur menggunakan jangka sorong (Radjasa *et al.*, 2004). Kemudian diinkubasi selama 1x24 jam dan 2x48 jam, zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong dengan 3 kali ulangan sebagai ukuran kekuatan senyawa terhadap bakteri uji dan menentukan nilai MBC (*Minimum Bacteriosidal Concentration*).

#### **6. Uji Fitokimia**

Harbone (1987) berpendapat bahwa Identifikasi senyawa kimia yang berperan sebagai antibakteri dalam ekstrak etil asetat *Sargassum polycystum* yang difragmentasi dan tidak difragmentasi dilakukan terhadap senyawa-senyawa, yaitu alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin.

##### **(a) Alkaloid**

Ekstrak *Sargassum polycystum* dilarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan tiga pereaksi alkaloid, yaitu pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner. Hasil uji dinyatakan positif apabila terdapat endapan merah sampai jingga dengan pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer terbentuk endapan putih kekuningan, endapan coklat dengan pereaksi Wagner.

##### **(b) Flavonoid**

Sebanyak 0.1 g ekstrak *Sargassum polycystum* ditambah 10 mL dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Setelah itu filtrat ditambahkan 0.5 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Campuran dikocok kuat. Sampel dinyatakan positif apabila timbul warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

### (c) Steroid dan triterpenoid

Sejumlah sampel ekstrak *Sargassum polycystum* dilarutkan dalam 2 ml kloroform dalam tabung reaksi yang kering, kemudian ditambahkan 10 tetes anhidrida asetat dan 3 tetes asam sulfat pekat. Uji dinyatakan positif jika terbentuk larutan warna merah untuk pertama kali, kemudian berubah menjadi biru dan hijau.

### (d) Saponin (uji busa)

Uji Saponin dapat diketahui dengan uji busa dalam air panas. Busa harus stabil selama 30 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, uji tersebut dinyatakan positif.

### (e) Tanin

Sebanyak 0.1 g ekstrak *Sargassum polycystum* ditambahkan ke dalam 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat ditambahkan 10 ml FeCl<sub>3</sub> 1% b/v. Uji positif ditandai munculnya warna hijau kehitaman.

## 7. Uji BSLT (*Brine shrimp lethality test*)

Menurut Carballo *et al.* 2002. Metode ini ada dua tahap, yaitu proses penetasan *Artemia* yang masih dalam bentuk kista dan uji toksisitas. *Artemia* dipilih karena murah dan efisien.

### Penetasan *Artemia salina*

*Artemia salina* yang berbentuk telur yang sering disebut kista perlu melewati proses penetasan sebelum digunakan. *Artemia salina* ditimbang sebanyak 0,625 gram kemudian dikultur dalam wadah (botol air minum bekas) yang berisi air laut sebanyak 250 ml, pH air laut 7,5 dengan salinitas 30 ppt. Kultur *Artemia salina* tersebut diaerasi dan diberi pencahayaan cukup selama 24 jam.

### Uji toksisitas

*Artemia salina* yang telah berumur 24 jam diambil sebanyak 10 ekor dengan pipet tetes yang ujungnya telah dimodifikasi, kemudian dimasukkan ke dalam wadah-wadah yang berisi campuran metanol,

ekstrak, dan air laut dengan konsentrasi ekstrak 1000, 500, 100, 50, dan 10 ppm (Suryono dan Yudhiati, 2011). Kontrol negatif menggunakan campuran air laut dan metanol diberi pencahayaan yang cukup. Pengamatan dilakukan 3 kali ulangan dengan rentang waktu 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, dan 36 Jam dengan cara menghitung jumlah *Artemia* yang mati (Suryono dan Yudhiati, 2011). Tingkat toksisitas ditentukan berdasarkan nilai LC50 sangat toksik < 30 µg/ml, toksik 30-1000 µg/ml, dan tidak toksik > 1000 µg/ml (Meyer *et al.* 1982).

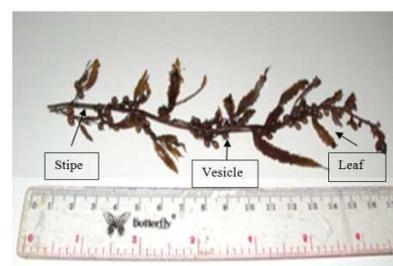
## 8. Analisis data

Analisis deskriptif secara kuantitatif menggunakan software SPSS 16 dengan analisis GLM (*General Linier Model*) supaya mengetahui pengaruh ekstrak, bakteri uji, dan konsentrasi yang digunakan terhadap diameter zona hambat. Uji lanjut MBC (*Minimum Bacteriosidal Concentration*), Uji fitokimia (dinotasikan dengan (-) / (+)), dan Uji toksisitas dengan nilai LC50 dianalisis dengan regresi linier Microsoft excel 2007.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rumput laut *Sargassum polycystum*

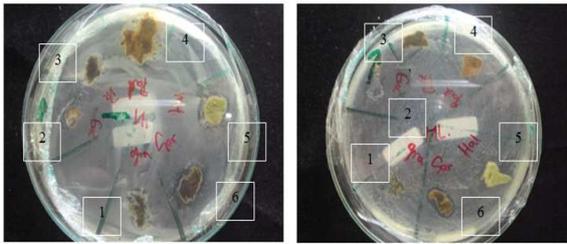
Rumput laut jenis *Sargassum polycystum* yang terdapat di perairan Pulau Panjang Jepara memiliki ciri-ciri thalli silindris berduri-duri kecil rapat, daun kecil, lonjong, panjang 3 cm, lebar 1 cm, pinggir bergerigi, dan ujungnya runcing (Atmadja *et al.*, 1988). Hasil sampling *Sargassum polycystum* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Sargassum polycystum*

### Uji kualitatif (pendahuluan)

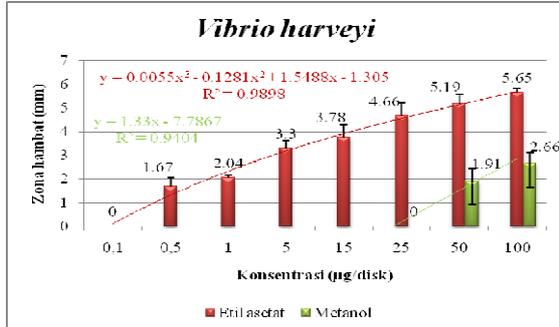
*Sargassum polycystum* mempunyai aktivitas antibakteri yang baik dibandingkan genus rumput laut lain (*Dictyota sp.*, *Padina sp.*, *Gracilaria sp.*, *Halimeda sp.*, dan *Eucheama sp.*). Hasil dari uji kualitatif dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Uji kualitatif

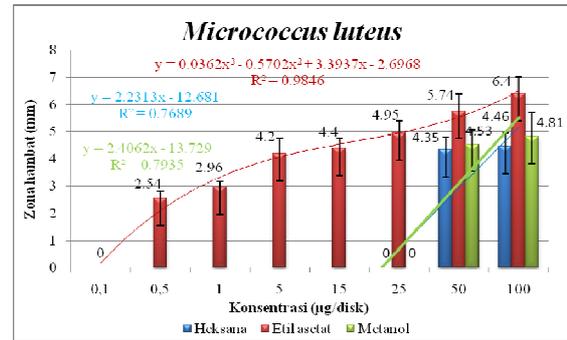
### Uji kuantitatif Antibakteri

Hasil uji antibakteri ekstrak *Sargassum polycystum* terhadap bakteri *Vibrio harveyi* dan *Micrococcus luteus* dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.



**Gambar 3.** Uji Antibakteri *Sargassum polycystum* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*

Pelarut heksana tidak membentuk zona hambat bakteriosidal, sedangkan pelarut etil asetat membentuk zona hambat bakteriosidal dari konsentrasi 0,5-100 µg/disk dan pelarut metanol membentuk zona hambat bakteriosidal dari konsentrasi 50-100 µg/disk.



**Gambar 4.** Uji Antibakteri *Sargassum polycystum* terhadap bakteri *Micrococcus luteus*

Pelarut heksana dan metanol membentuk zona hambat bakteriosidal dari konsentrasi 50-100 µg/disk, sedangkan pelarut etil asetat membentuk zona hambat bakteriosidal dari konsentrasi 0,5-100 µg/disk. Diameter zona hambat yang terbentuk akan besar apabila konsentrasi perlakuan semakin besar. Data hasil uji aktivitas antibakteri selanjutnya di analisis dengan *General Linier Model* menggunakan software SPSS 16.

Source of variation	df	F	P	Tukay p < 0.05
Pelarut	2	1421.12	0.00	Hexana <sup>a</sup> < Metanol <sup>b</sup> < Etil asetat <sup>c</sup>
Bakteri	1	226.78	0.00	<i>V. harveyi</i> <sup>a</sup> < <i>M. luteus</i> <sup>b</sup>
Konsentrasi	7	379.23	0.00	0,1 <sup>a</sup> < 0,5 <sup>b</sup> < 1 <sup>b</sup> < 5 <sup>c</sup> < 25 <sup>d</sup> < 50 <sup>e</sup> < 100 <sup>f</sup>

Keterangan: 100-0,1 = Konsentrasi ekstrak, df = Derajat bebas, F = F hitung, P = Probabilitas, Tukey P < 0,05 = Post Hoc Test signifikansi kurang dari 5%.

**Tabel 1.** Analisis keragaman Aktivitas Antibakteri ekstrak *Sargassum polycystum*

Analisis data diatas menunjukkan bahwa pelarut yang paling bagus ada pada ekstrak menggunakan pelarut etil asetat, bakteri *V. Harveyi* merupakan bakteri lebih resisten dibandingkan *M. Luteus*, dan konsentrasi 100 µg/disk adalah konsentrasi yang dapat membentuk zona hambat paling besar. Perbedaan terbentuknya zona hambat diduga disebabkan oleh sifat resistensi



bakteri *Vibrio harveyi* lebih kuat dibanding bakteri *Micrococcus luteus*.

Menurut Chytanya *et al.* (1999) Sifat resisten terjadi karena ada 5 faktor:

1. Bakteri itu tidak memiliki dinding sel sehingga menjadi resisten terhadap antibiotik yang bekerja dengan cara merusak dinding sel,
2. Bakteri itu tidak permeabel terhadap beberapa jenis antibiotik,
3. Bakteri itu mempunyai kemampuan untuk menginaktifkan komponen-komponen yang ada didalam antibiotik,
4. Bakteri itu memiliki sistem metabolisme yang dapat memblokir antibiotik tertentu,
5. Bakteri itu memiliki kemampuan untuk memompa antibiotik tertentu keluar dari dinding sel.

### Uji Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 2.

Jenis senyawa	Hasil			Tanda
	Metanol	Etil asetat	Heksana	
Alkaloid	(-)	(-)	(+)	Terdapat endapan putih kekuningan
Steroid	(+)	(+)	(+)	Terdapat warna merah untuk pertama, kemudian menjadi warna hijau
Triterpenoid	(+)	(+)	(+)	Terbentuk larutan berwarna jingga atau ungu untuk pertama kali
Flavonoid	(-)	(-)	(-)	Tidak ada tanda
Saponin	(-)	(-)	(-)	Tidak ada tanda
Tanin	(-)	(-)	(-)	Tidak ada tanda

**Tabel 2.** Hasil uji fitokimia

Ekstrak positif mengandung Senyawa Alkaloid adalah ekstrak dari pelarut Heksana. Senyawa steroid dan triterpenoid positif pada pelarut Metanol, etil asetat, dan heksana. Senyawa Alkaloid pada ekstrak bersifat racun, senyawa tersebut menunjukkan aktivitas fisiologi yang luas, hampir tanpa terkecuali bersifat basa (Sastrohamidjojo, 1996). Senyawa steroid yang paling banyak ditemukan adalah sterol yang merupakan steroid alkohol. Senyawa sterol pada

tumbuhan disebut dengan fitosterol, yang umum terdapat pada tumbuhan tinggi adalah sitosterol, stigmasterol dan kampesterol. Senyawa ini dapat digunakan dalam pembuatan obat (Harborne, 1987). Senyawa Triterpenoid, adalah triterpena yang dapat dijumpai pada tumbuhan berfungsi sebagai pelindung untuk menolak serangga dan serangan mikroba (Harborne, 1987). Diduga kandungan senyawa steroid dan triterpenoid pada pelarut etil asetat lebih banyak dibandingkan pelarut metanol dan etil asetat, oleh karena itu aktivitas antibakteri masih terbentuk pada konsentrasi terkecil 0,5 µg/disk dengan kategori bakteriosidal.

### Uji toksisitas (BSLT)

Uji toksisitas (BSLT) merupakan uji invitro untuk mengetahui seberapa besar efek keracunan yang ditimbulkan ekstrak terhadap *Artemia salina*. Hasil uji toksisitas dapat dilihat pada Tabel 3.

waktu	$y = a + b \cdot x$	$R^2$	R	% kelai	y	a	b	X	LC50 (ppm)	
1 Jam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3 Jam	$y = 1.0201x + 6.616$	0.990	0.9951	99.51	50	6.676	0.0201	2155	2155	Tidak Toksik
5 Jam	$y = 1.0139x + 12.147$	0.689	0.8299	82.99	50	12.047	0.0139	2730	2730	Tidak Toksik
7 Jam	$y = 1.0225x + 12.118$	0.856	0.9250	92.50	50	12.518	0.0225	1666	1666	Tidak Toksik
8 Jam	$y = 1.0369x + 15.18$	0.961	0.9802	98.02	50	15.08	0.0369	946	946	Toksik
14 Jam	$y = 1.1606x + 22.669$	0.895	0.9459	94.59	50	22.669	0.1606	170	170	Toksik
10 Jam	$y = 1.1511x + 29.343$	0.743	0.8620	86.20	50	29.243	0.1511	137	137	Toksik
16 Jam	$y = 1.1447x + 32.399$	0.706	0.8402	84.02	50	32.799	0.1447	119	119	Toksik

**Tabel 3.** Hasil uji toksisitas

Interaksi dapat berlangsung karena *Artemia* merupakan udang renik yang makan dengan cara menyaring makanannya (*filter feeder*) (Dobbeleir, 1980). Ekstrak yang terkandung dalam medium *Artemia salina* terbawa kedalam tubuh dan mengganggu proses metabolisme dan enzimatis seperti respirasi dan osmoregulasi sel individu tersebut lalu terjadi efek toksik (Putranti, 2013). Nilai LC50 jatuh pada pengamatan ke-24 jam, dengan kategori toksik golongan kronis, yaitu 170 ppm.



## Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum polycystum* dari pelarut etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri paling baik terhadap bakteri *Vibrio harveyi* (diameter 1,67 mm) dan *Micrococcus luteus* (diameter 4,55 mm) dengan MBC (*minimum bacteriosidal concentration*) 0,5 µg/disk. Ekstrak *Sargassum polycystum* mengandung senyawa alkaloid pada ekstrak menggunakan pelarut Heksana serta senyawa steroid dan triterpenoid pada pelarut metanol, etil asetat, dan heksana. Ekstrak *Sargassum polycystum* memiliki efek toksisitas terhadap *Artemia salina* dengan kategori toksik golongan kronik pada pengamatan ke-24 jam dengan nilai 170 ppm.

## Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Dr. Ir. Ita Widowati, DEA dan Prof. Dr. Ir. Agus Sabdono, MSc sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dalam menyelesaikan jurnal ilmiah ini serta semua pihak dan instansi terkait yang telah memberikan bantuan dan fasilitas dalam penulisan jurnal ilmiah ini.

## Daftar Pustaka

- Atmadja W.S., Soelistijo. 1988. Beberapa aspek vegetasi dan habitat tumbuhan laut bentik di pulau-pulau Seribu. Jakarta : Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi-LIPI.
- Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural product (methodology article). *Bioorganic Mar Chem Biotech* 2(1):1-5.
- Chytanya R., Nayak D.K., Venugopal M.N. 1999. Antibiotic resistance in aquaculture. News from around the world. *Infotish International*. 6:30- 32.
- Dashtiannasab A., Kakoolaki S., Sharif R.M., Yeganeh V. 2012. In vitro effects of *Sargassum latiofillum* (Agardeh, 1948) against selected bacterial pathogens of shrimp, *Iranian Journal of Fisheries Sciences* (4): 765-775
- Dobbeleir, J., N. Adam, E. Bossuyt, E. Bruggeman, and P. Sorgeloos. 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of the Brine Shrimp. P 167-183. In *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, and jaspers. Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.
- Harborne J.B. 1987. *Phytochemical methods*. Ed ke-2. New York: Chapman and Hall.
- Putranti R.I., Ambariyanto, dan Widowati I. 2013. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan Ekstrak rumput laut *sargassum duplicatum* dan *turbinaria ornata* Dari jepara. Program studi magister manajemen sumberdaya pantai. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Radjasa O.K., Torben M., Thorsten B., Hans-Peter G., Sabdono A., Meinhard S. 2004. Antibacterial Activity of secondary metabolite producing coral bacterium TAB4.2 against pathogenic *Vibrio harveyi*. Prosiding Pengendalian Penyakit pada ikan dan Udang berbasis Imunisasi dan Biosecurity, Purwokerto, 18-19 Mei 2004.
- Sastrohamidjojo H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Suryono dan Yudiati E. 2011. Toksisitas Ekstrak Metanol *Spirulina sp* terhadap *nauplii Artemia sp. vol.1 1 - 6*
- Vijayabaskar P., Shiyamala V. 2011. Antibacterial Activities of Brown Marine Algae ( *Sargassum wightii* and *Turbinaria ornate*) From The Gulf of Mannar Biosphere Reserve. *Adv. Biol. Res.* 5:99-102 p.
- Widowati I., Susanto A.B., Stiger-Pouvreau V., Bourgougnon N. 2013. Potentiality of using spreading *Sargassum* species from Jepara, Indonesia as an interesting source of antibacterial and antioxidant compounds: a preliminary study. Seminar IIS Bali, April 2013.