

Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Sponge* Perairan Enepahembang Terhadap Bakteri Patogenik Ikan *Aeromonas Hydrophila* (Enepahembang Waters Antibacterial Activity of Sponge Extract Against Fish Pathogenic Bacteria *Aeromonas Hydrophila*)

Walter Balansa, Deidy Azhari, Desmi Babo, dan Aprelia Tomaso

Program Studi Teknologi Budidaya Ikan, Jurusan Perikanan dan Kebaharian

Politeknik Negeri Nusa Utara

Email: walterbalansa1@gmail.com

Abstrak: Ancaman menakutkan dari bakteri-bakteri resisten terhadap berbagai antibiotik, khususnya bakteri-bakteri Gram negatif, menjadikan penemuan antibiotik baru makin relevan dan mendesak. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antibakteri 12 sponge dari perairan terumbu karang Enepahembang Tahuna terhadap bakteri patogenik ikan *Aeromonas hydrophila*. Studi ini mencakup koleksi sponge dengan snorkling pada kedalaman 1.0-7.0 m, ekstraksi sampel dengan vacuum rotary evaporator dan uji antimikroba ekstrak kasar terhadap *A. hydrophila*. Ekstrak dari 5 spesimen yang belum teridentifikasi dengan kode EP-5, EP-12, EP-13, EP-15 dan EP-16 mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* pada konsentrasi 10.0 mg/mL (zona hambat = 12.0 mm - 14.0 mm) sedangkan EP-1 pada konsentrasi lebih rendah yakni 1.0 mg/mL (zona hambat = 15.0 mm). Pada konsentrasi 10.0 mg/mL, ekstrak kasar EP-1 berdaya hambat 28.0 mm, sedikit lebih besar dari zona hambat antibiotik pembanding (tetrasiklin, 27.0 mm) meskipun pada konsentrasi tetrasiklin lebih rendah (0.1 mg/mL). Studi lanjut berupa fraksinasi, pemurnian senyawa, penentuan struktur molekul dan uji antibakteri untuk ekstrak kasar EP-1 sangat diperlukan. Selain untuk memastikan potensi antibiotik sebenarnya, studi ini bermanfaat untuk memastikan kebaruan dari molekul-molekul terkandung pada spesimen EP-1, sebuah upaya strategis dalam menunjang penemuan antibiotik baru.

Kata Kunci: sponge, antibiotik, zona hambat, *Aeromonas hydrophila*, Enepahembang Sangihe

Abstract: The frightening threat of bacteria resistant to various antibiotics, especially negative gram bacteria, makes finding new antibiotics more relevant and urgent. This study aims to test the 12 sponge antibacterial activity of the reef waters of Enepahembang Tahuna against fish pathogenic bacteria of *Aeromonas hydrophila*. The study included a sponge collection with snorkeling at a depth of 1.0-7.0 m, sample extraction with a vacuum rotary evaporator and a crude extract antimicrobial test against *A. hydrophila*. Extracts from 5 specimens not yet identified with EP-5, EP-12, EP-13, EP-15 and EP-16 were able to inhibit the growth of *A. hydrophila* at a concentration of 10.0 mg/mL (inhibit zone = 12.0 mm - 14.0 mm) while EP-1 at a lower concentration of 1.0 mg/mL (inhibit zone = 15.0 mm). At a concentration of 10.0 mg/mL, the crude extract EP-1 was 28.0 mm inhibitory, slightly larger than the antibiotic inhibitory zone (tetracycline, 27.0 mm) although at lower tetracycline concentrations (0.1 mg/mL). Further studies of fractionation, purification of compounds, molecular structure determination and antibacterial assays for rough extract of EP-1 are necessary. In addition to ensuring the true antibiotic potential, this study is useful for ensuring the novelty of the molecules contained in EP-1 specimens, a strategic effort to support the discovery of new antibiotics.

Keywords: sponge, antibiotic, drag zone, *Aeromonas hydrophila*, Enepahembang Sangihe

Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* masih merupakan ancaman serius untuk budidaya ikan bahkan untuk kesehatan manusia. Menurut Praveen

et al. (2016), bakteri Gram negatif ini dapat menginfeksi bagian dalam maupun luar usus manusia. Berbagai hasil di bidang perikanan juga

telah membuktikan bahwa infeksi *A. hydrophilada* dapat menyebabkan penyakit bercak merah atau *motil aeromonas septicemia* (MAS) dengan berbagai karakteristik termasuk luka dan pembusukan pada bagian ekor dan sirip atau pendarahan pada tubuh ikan (Mahanty, *et al.*, 2013), kematian ikan secara masal (80-100%) dalam waktu singkat (Angka, 2001) serta kerugian jutaan dolar pada industri perikanan dunia (Pridgeon & Klesius, 2012).

Pemberian pakan berantibiotik untuk ikan terinfeksi *A. hydrophila* adalah praktek yang umum dilakukan (Pridgeon dan Kleisus, 2012). Tetapi praktek ini mulai memicu resistensi *A. hydrophila* terhadap berbagai antibiotik (Mahanty, *et al.*, 2013). Keadaan ini makin diperburuk oleh rendahnya penemuan antibiotik baru dalam beberapa dekade terakhir (Fisch & Scharbele, 2016) terutama akibat fokus penemuan antibakteri yang masih menitikberatkan pada sintesa antibiotik baru dari antibiotik lama (Theuretzbacher, *et al.*, 2015). Meskipun cara ini mampu menyediakan antibiotik sintetis baru dalam waktu relatif singkat serta mengatasi infeksi dalam waktu cukup cepat (Fischbach & Walsh, 2009), terbatasnya jumlah antibiotik di pasaran yakni *b-lactam*, *macrolide* dan *quinolone* saja (Abad, *et al.*, 2011), juga turut membatasi produksi antibiotik sintetis baru (Rogers, *et al.*, 2011).

Sebaliknya, *sponge* terkenal dengan kompleksitas, variasi dan kebaruan struktur molekul bioaktifnya, karakteristik yang ampuh meredakan resistensi bakteri (Clardy, *et al.*, 2006). Selain itu, molekul-molekul dari bahan alami lebih unggul dari molekul-molekul sintesis karena “keseperluan metabolit” antara bahan alami dengan sel target selain lebih aman bagi lingkungan karena mudah terurai dan tidak meninggalkan residu (Abbas & Abbas, 2011). Di samping itu, molekul alami juga menggunakan penetrasi memberan bakteri spesifik yang merupakan kunci penting dalam penemuan antibiotika baru (Tommasi, *et al.*, 2015). Jadi, molekul alami bukan saja aktif secara biologis tetapi juga merupakan substrat untuk satu atau lebih sistem transpor dalam sel yang dapat membawa molekul-molekul itu ke sisi intraseluler untuk memberikan pengaruh secara biologis (Harvey, *et al.*, 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan antibakteri baru dari 12 *sponge* perairan Enepahembang Tahuna terhadap bakteri patogenik ikan *A. hydrophila* yang telah menunjukkan resistensi terhadap berbagai antibiotika di pasaran dengan menggunakan uji metode difusi agar.

METODE PENELITIAN

Koleksi *Sponge*

Sponge dikoleksi selama 2 hari pada bulan Oktober 2016 dari daerah terumbu karang Desa Enepahembang Kecamatan Tahuna Timur, Kabupaten Kepulauan Sangihe. Sebanyak 12 jenis *sponge* dikoleksi pada kedalaman 1-7 meter dengan menggunakan *snorkeling*. Segera setelah diangkat dari laut, spesimen-spesimen ini dibawa ke laboratorium Teknologi Budidaya Ikan (TBI) Tahuna, diambil gambar, diberi kode dan dibekukan sebelum dibawa dalam *cool box* menggunakan transportasi laut ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut (BMFL) Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi (UNSRAT) Manado dimana spesimen-spesimen itu disimpanbeku sebelum diekstrak.

Bakteri Uji

Strain bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Balai Karantina Ikan Kabupaten Kepulauan Sangihe dan merupakan turunan galur ke-4 (F4).

Ekstraksi

Untuk mendapatkan ekstrak kasar, masing-masing *sponge* ditimbang, dipotong seukuran dadu, direndam dalam botol plastik aqua (600 mL berisi pelarut metanol pro-analisis (80%) selama 24 jam. Sebelum dipindahkan ke wadah yang lebih besar (botol plastik aqua 1.5 L), *sponge* dalam wadah diagitasi/dikocok. Proses yang sama diulang sebanyak tiga kali dan hasil rendaman digabung (terpisah untuk tiap *sponge*) sebelum proses evaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada temperatur ruangan. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan menggunakan *freeze dryer* dan sebanyak 1.0 mg ekstrak kasar diambil dari 12 spesimen diencerkan pada tiga konsentrasi berbeda (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL dan 10.0 mg/mL) dan siap diujikan pada bakteri *A. hydrophila*.

Skrining Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak *sponge* maupun antibiotik pembanding (tetrakislin) dilakukan dengan menggunakan metode standar difusi agar. Ringkasnya, cawan petri berisi agar (~15 mL) diinokulasi dengan inokulum *A. hydrophila* (10^6 CFU). Kemudian, sebanyak 5 kertas filter berbentuk cakram (diameter 6 mm) steril diletakan di atas

media dan di atas 4 kertas cakram dipipet masing-masing 60 mL ekstrak kasar berbeda dan 1 kertas cakram lainnya dipipet antibiotik pembanding. Tiga ulangan dari masing-masing ekstrak kasar untuk tiap konsentrasi ekstrak kasar diuji pada cawan petri berbeda. Meskipun pelarut kontrol (metanol) tidak diuji secara terpisah, sejumlah ekstrak tidak aktif menunjukkan bahwa aktivitas bakteri tidak dipengaruhi oleh pelarut. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu ruangan dan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada cawan petri dilakukan setelah 12 jam (Balouri, *et al.*, 2016).

Analisa Data

Setelah inkubasi, diameter dari tiap kertas cakram ditambah dengan zona bening di sekitar kertas cakram diukur hingga mm terdekat. Ekstrak kasar *sponge* dianggap aktif jika satu atau lebih dari ulangan ekstrak kasar (masing-masing dari sampel berbeda tapi dari spesies sponge yang sama) menghasilkan zona penghambatan bakteri lebih besar sama dengan 1.0 mm dari tepi kertas cakram (diameter = 3.0 mm). Dengan menggunakan mistar, diameter zona hambat (mm), berupa daerah bening yang terbentuk di sekitar ekstrak maupun antibiotik pembanding (tetrasiklin) diukur dan ditabulasikan.

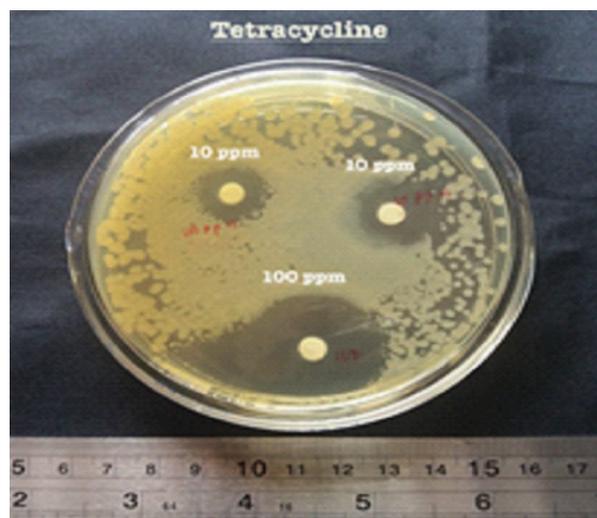
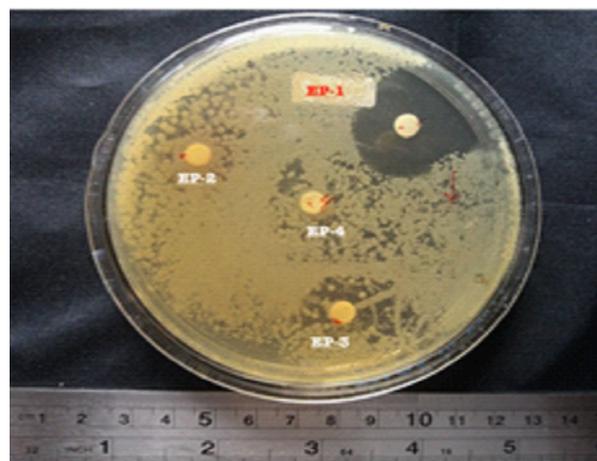
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian ekstrak kasar 12 *sponge* dari perairan Enepahembang memperlihatkan variasi aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila* dengan 41.6% ekstrak diantaranya menunjukkan aktivitas antibakteri (Tabel 1). Sebaliknya, ekstrak dari spesimen-spesimen dengan kode EP-2, EP-3, EP-4, EP-6, EP-7, EP-8, EP-9 dan EP-10 tidak memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila* hingga konsentrasi tertinggi dalam pengujian ini (10.0 mg/mL). Secara keseluruhan, 5 spesimen mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* yakni EP-1, EP-5, EP-12, EP-13, EP-15 dan EP-16 pada konsentrasi 10.0 mg/mL dengan zona penghambatan berkisar (11-28) mm.

Dari ke-5 spesimen aktif ini, hanya ekstrak kasar dari spesimen EP-1 yang mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* pada konsentrasi 1.0 mg/mL (Tabel 1) dengan zona hambat sebesar 13.0 mm yang dalam kategori Alves (2000) tergolong aktif. Menariknya, pada konsentrasi 10.0 mg/mL, zona hambat yang terbentuk oleh ekstrak kasar spesimen tergolong sangat aktif (28.0 mm) dan lebih besar daripada zona hambat yang dibentuk



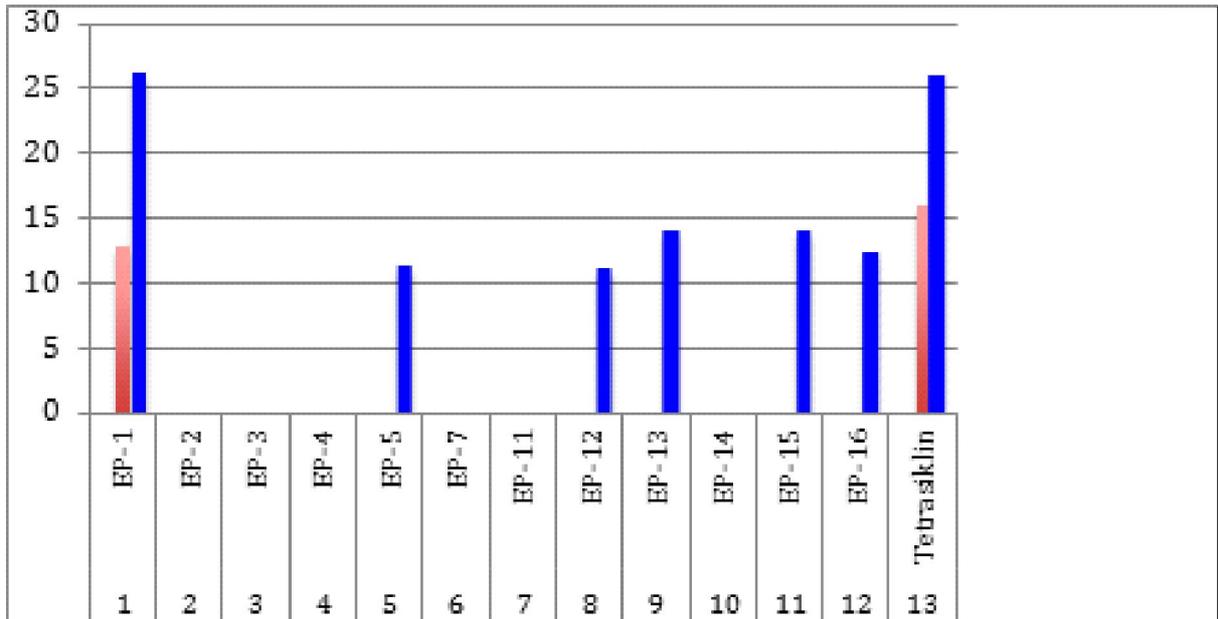
Gambar 1. Sponge EP-1 yang dikoleksi dari terumbu karang Enepahembang pada kedalaman 1.0 meter.



Gambar 2. Zona hambat (daerah bening di sekitar kertas cakram) yang merupakan indikasi aktivitas antibakteri.

oleh antibiotik pembanding (27.0 mm) sekalipun pada konsentrasi antibiotik pembanding yang lebih rendah (0.1 mg/mL) (Tabel 1). Hasil ini membuktikan ekstrak kasar EP-1 sebagai ekstrak paling aktif terhadap *A. hydrophila*.

terhadap bakteri-bakteri patogen ikan lain yang tidak diuji dalam penelitian ini. Berbagai hasil penelitian telah menunjukkan sejumlah ekstrak kasar sponge yang memperlihatkan aktivitas berbeda pada bakteri berlainan baik pada bakteri Gram negatif, Gram positif atau keduanya.



Gambar 2. Aktivitas antibakteri 12 sponge dari perairan Enepahembang terhadap *A. hydrophila* pada konsentrasi (0.5 mg/mL dan 10.0 mg/mL).

Tabel 1. Aktivitas antibakteri 12 spesimen sponge terhadap *A. hydrophila*

No	Kode Sample	Konsentrasi/ Daya Hambat (mm)			Konsentrasi/ Daya Hambat (mm)			Konsentrasi/ Daya Hambat (mm)			Antibiotik	
		0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	10 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	10 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	10.0 mg/mL	10	100
1	EP-1	-	14.0	26.5	-	12 mm	28.0	-	12.0	24.0	16.0	27.0
2	EP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.0	26.0
3	EP-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.0	28.0
4	EP-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	EP-5	-	-	10.0	-	-	12.0	-	-	12.0	14.0	25.0
6	EP-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.0	26.0
7	EP-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.0	28.0
8	EP-12	-	-	10.0	-	-	11.5	-	-	12.0	16.0	24.0
9	EP-13	-	-	13.0	-	-	16.5	-	-	13.0	13.0	23.0
10	EP-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.0	24.0
11	EP-15	-	-	15.0	-	-	14.5	-	-	12.5	14.0	27.0
12	EP-16	-	-	12.0	-	-	15.0	-	-	10.0	13.0	25.0

Meskipun demikian, hasil penelitian ini perlu diinterpretasi secara hati-hati. Pertama, meskipun ekstrak dari sejumlah sponge tidak memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila*, bisa saja ekstrak-ekstrak itu punya aktivitas antibakteri

Ketika ditantang pada sejumlah bakteri patogen lainnya seperti *E. coli*, *Vibrio hemolyticus*, *Edwardsiella tarda* (hasil tidak dilaporkan), tim peneliti menemukan ekstrak kasar dari sejumlah spesimen yang sebelumnya tidak aktif terhadap *A.*

hydrophila justru aktif terhadap sejumlah bakteri Gram negatif seperti *E. coli*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio parahaemolyticus* dll. Selanjutnya, peneliti seperti Fenical, *et al.* (1997), telah mengingatkan bahwa aktivitas antibakteri pada media agar juga sangat bergantung pada difusi dari senyawa-senyawa ke dalam media ini dengan senyawa bersifat non-polar biasanya memiliki difusi yang lebih baik dari molekul-molekul semi-polar maupun polar. Mengingat ekstrak yang digunakan masih berupa ekstrak kasar yang terdiri dari molekul non-polar, semi polar maupun polar, maka pernyataan Fenical dkk ini perlu mendapat perhatian. Selain itu, kita juga harus ingat bahwa ukuran zona hambat kemungkinan tidak dapat menggambarkan ukuran *insitu* dari sebuah aktivitas antibakteri karena beberapa faktor-faktor seperti laju difusi dll.

Selanjutnya, tingginya nilai penghambatan dari ekstrak-ekstrak kasar dan terbatasnya ekstrak kasar yang aktif terhadap *A. hydrophila* menggambarkan betapa menantang upaya penemuan antibiotik baru untuk bakteri-bakteri Gram negatif. Sejumlah peneliti juga telah tiba pada kesimpulan yang sama. Nikaido (1998), misalnya, menyimpulkan bahwa bakteri Gram negatif umumnya lebih resisten terhadap sejumlah besar antibiotik dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Ketika mengkaji aktivitas antibakteri tumbuhan daratan, Martins, *et al.*, 2013 juga menemukan bahwa lebih banyak ekstrak-ekstrak tumbuhan daratan (dari segi jumlah dan nilai penghambatan minimum lebih rendah) menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri Gram positif daripada bakteri-bakteri Gram negatif. Selain itu, dalam tinjauannya pada tahun 2015, Toomasi, *et al.* juga melaporkan bahwa meskipun beberapa jenis antibiotika mampu menghambat pertumbuhan sejumlah bakteri Gram positif, antibiotik-antibiotik ini sama sekali tidak aktif terhadap bakteri-bakteri Gram negatif.

Umumnya dua argumen yang selalu muncul terkait resistensi bakteri Gram negatif. Pertama, bakteri-bakteri Gram negatif memiliki membran luar pembatas permeabilitas yang biasanya menghambat bahan-bahan antibakteri untuk mencapai targetnya yakni inti sel-sel bakteri Gram negatif (Tommasi, *et al.*, 2015). Kedua, berbeda dengan bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif memiliki *multidrug efflux pump* yang dapat memompa antibiotik keluar dari sel bakteri sehingga menjadikan bakteri Gram negatif lebih kebal terhadap berbagai antibiotik (Nikaido, 1998; Tommasi, *et al.*, 2015).

Meskipun demikian, perlu dicatat bahwa dalam penelitian ini ada sejumlah ekstrak yang memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap terhadap *A. hydrophila* sekalipun hanya ekstrak kasar EP-1 memperlihatkan aktivitas antibakteri yang hampir menyamai antibiotik pembanding sekalipun masih berupa ekstrak kasar. Telah disinggung sebelumnya juga bahwa sejumlah ekstrak kasar dari ke-12 specimen itu juga memperlihatkan aktivitas antibakteri cukup menjanjikan terhadap berbagai bakteri Gram negatif seperti *Edwardsiella tarda*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*. Jadi, secara bersamaan, hasil-hasil penelitian ini membuktikan potensi *sponge* dari Kabupaten Kepulauan Sangihe dalam hal ini *sponge* dari perairan Enepahembang dalam menunjang upaya penemuan antibiotik baru untuk berbagai bakteri Gram negatif termasuk *A. hydrophila*.

Selain itu, terlepas dari konsentrasi hambatan yang tinggi, ekstrak kasar masih merupakan campuran kompleks. Meskipun sebagian molekul dalam ekstrak dapat memberikan hasil positif dalam uji biologis karena terdapat dalam jumlah yang cukup, sebagian molekul (molekul minor) kemungkinan terdapat dalam konsentrasi yang terlalu rendah untuk bisa memberikan dampak uji biologis (Harvey, *et al.*, 2015). Ternyata dalam banyak kasus, senyawa-senyawa bioaktif biasanya berupa molekul-molekul minor atau molekul-molekul dalam konsentrasi sangat rendah dari satu ekstrak. Walaupun sebagian dari senyawa itu telah menunjukkan aktivitas biologis saat masih berada dalam ekstrak kasar, sebagian baru memberikan aktivitas biologis setelah molekul-molekul itu telah dimurnikan seperti pada *spongolactam A-C* (Mori, *et al.*, 2007), *ircinialactam A-D* (Balansa, *et al.*, 2010) dan *ircinianinlactam A* maupun *oxo-ircinianinlactam* (Balansa, *et al.*, 2013).

Selanjutnya, efisiensi bahan bioaktif seperti antibakteri bisa saja terjadi akibat pengaruh aditif atau sinergetik dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam satu ekstrak bukan akibat pengaruh satu senyawa (Harvey, *et al.*, 2015). Menurut peneliti-peneliti ini, pengaruh dari senyawa bioaktif dari ekstrak kasar dapat berupa jumlah total dari pengaruh senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar itu (aditif) atau bisa saja pengaruh yang dihasilkan satu senyawa murni justru jauh lebih besar dari pengaruh gabungan senyawa dalam ekstrak (sinergetik). Hasil-hasil penelitian Martins, *et al.*, 2013 adalah contoh tipikal dimana mereka menemukan di satu pihak fraksi dan senyawa murni

menghasilkan aktivitas antibakteri lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak kasar dan di pihak lain, aktivitas antibakteri fraksi dan senyawa murni justru jauh lebih besar daripada aktivitas ekstrak kasar.

Itulah sebabnya, untuk mengetahui potensi antibakteri sebenarnya dari ekstrak-ekstrak kasar *sponge* perairan Enepahembang terhadap bakteri patogen *A. aeromonas*, fraksinasi dan pemurnian molekul serta uji lanjut perlu dilakukan. Selain akan memberikan informasi mengenai potensi antibakteri sebenarnya dari ekstrak-ekstrak itu terutama EP-1, upaya ini juga dapat menyingkap, lewat studi hubungan struktur dan aktivitas molekul, molekul-molekul mana yang sebetulnya bertanggung jawab untuk aktivitas antibakteri yang teramati pada ekstrak-ekstrak kasar aktif itu.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi antibakteri alami sejumlah *sponge* dari Enepahembang Tahuna Timur dalam upaya penemuan antibiotik baru untuk mencegah infeksi bakteri patogenik *A. hydrophila*. Secara khusus, ekstrak kasar dari EP-1 memperlihatkan hasil cukup menarik yang mewakili langkah penting dalam upaya pencarian antibiotik baru. Studi lanjut berupa fraksinasi, pemurnian senyawa, penentuan struktur molekul dan uji antibiotik yang lebih sensitif sangat diperlukan untuk memastikan potensi antibiotik sebenarnya dan kebaruan dari molekul-molekul terkandung pada ekstrak kasar EP-1, sebuah upaya strategis untuk menunjang upaya penemuan antibiotik baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi dan Pendidikan Tinggi untuk dukungan finansial dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LP₃M) Politeknik Negeri Nusa Utara Tahuna untuk berbagai dukungan selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

Abad, M.J., Bedoya, L.M., Bermejo, P. 2011. Marine Compounds and their Antimicrobial Activities. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances in Vilas*, M. A. (ed.). 2011. *Formatex*; 1293-1306.

Abbas, H.H., Abbas, W.T. 2011. Assessment Study on the Use of Pawpaw; *Carica papaya* Seeds to

Control *Oreochromis niloticus* Breeding. *J. Biol. Sci.* 14 (24): 1117-1123.

Alves, T.M.A., Silva, A.F., Brandão, M., Grandi, T.S.M., Smânia, E.F.A., Smânia Jr., A., Zani, C.L. 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 367–373.

Angka, S.L. 2001. Studi Karakterisasi dan Patologi *Aeromonas hydrophila* pada ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Makalah Falsafah Sains*. Bogor: Progam Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Balansa, W., Islam, R., Fontaine, F., Piggott, A. M., Zhang, H., Webb, T.I., Gilbert, F.D., Lynch, J.W., Capon, R.J. 2010. Ircinialactams: Subunit-Selective Glycine Receptor Modulators for Australian Sponges of the Family Irciniidae. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 2912-2919.

Balansa, W., Islam, R., Fontaine, F., Piggott, A. M., Zhang, H., Webb, T.I., Gilbert, F.D., Lynch, J.W., Capon, R.J. 2013. Sesterterpene glycinyllactams: a new class of glycine receptor (GlyR) modulator from Australian marine sponges of the genus *Psammocinia*. *Org. Boimol. Chem.* 11: 4695-4701.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6: 71-79.

Coates, A.R., Hu, Y. 2008. Targeting Non-multiplying Organisms as A Way to Develop Novel Antimicrobials. *Trends Pharmacol. Sci.* 29: 143-150.

Clardy, J., Fischbach, M.A., Walsh, C.T. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*. 24: 1541-1550.

Fischbach, M.A., Walsh, C.T. 2009. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*. 325: 1089-1093.

Fisch, K.M., & Schaberle. 2016. Toolbox for Antibiotics Discovery from Microorganisms. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 349, 1–9.

Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R.U., Quinn, R.J. The Re-emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. 2015. *Nat. Rev. Drug. Dis.* 111-129.

Mahanty, A., Mishra, S., Bosu, B., Maurya, UK., Netam, S.P., Sarkar, B. 2013. Phytoextracts-Synthesized Silver Nanoparticles Inhibit Bacterial Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Indian J. Microbiol.* 53: 438–446.

Martín, J., da Sousa, S.T., Crespo, G., Palomo, S., González, I., Tormo, J.R., de la Cruz, M., Anderson, M., Hill, R.T., Vicente, F. 2013. Kocurin, the true structure of PM181104, An Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) thiazolyl peptide from the marine-derived bacterium *Kocuria palustris*. *Mar. Drugs*. 11: 387-398.

Mori, D., Kimura, Y., Kitamura, S., Sakagami, Y., Yoshioka, Y., Shintani, T., Okamoto, T., Ojika, M. Spongolactams, Farnesyl Transferase Inhibitors

- from a Marine Sponge: Isolation through an LC/MS-Guided Assay, Structures, and Semisyntheses. 2007. *J. Org. Chem.* 72, 7190-7198.
- Nikaido, H. 1998. Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps. *Clinical Infectious Diseases*; 27 (Suppl 1):S32-41.
- Praveen, P.K., Debnath, C., Shekhar, S., Dalai, N., Ganguly, S. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Veterinary World.* 9(1): 6-11. www.veterinaryworld.org/Vol.9/January-2016/2.pdf
- Pridgeon, J.W., Klesius, P. H. 2012. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews.* 7. No. 048. <http://www.cabi.org/cabreviews>.
- Rogers, G.B., Carroll, M.P., Bruce, K.D. 2012. Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behavior? *Brit. J. Pharm.* 165: 845-857.
- Theuretzbacher, U., Bambeke, F. V., Canton, C. G., Mouton, W., Nation R, L., Paul, M., Turnidge, J. D., Kahleter, G. 2015. Reviving Old Antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 70: 2177-2181.
- Tommasi R., Brown, D.G, Walkup, G.K., Manchester, J. I., Miller, A. A. 2015. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug. Dis.* Advanced Online Publication. 1-14.
- Ventola, L.C. 2015. The Antibiotic Resistance and Crisis: Part 1 Causes and Threat. *J. Pharm. & Ther.* 4: 277-283.