Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Etil Asetat Bakteri *Bacillus sp.3* (A1) yang Bersimbiosis dengan Spon Laut *Haliclona fascigera*

(Isolation and characterization of antibacterial compounds of ethyl acetate fraction of bacteria *Bacillus sp.3* (a1) that symbiotic with marine sponge *Haliclona fascigera*)

Rafky Putra, Friardi Ismed, Dian Handayani*

Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Keywords:

symbiotic bacteria;
Bacillus sp.;
antibacterial activity;
marine sponge;
Haliclona fascigera.

Kata Kunci:

bakteri simbiosis;
Bacillus sp.; aktivitas
antibakteri; spon laut;
Haliclona fascigera.

ABSTRACT: *Bacillus sp. 3* is one of symbiotic bacteria of marine sponge *Haliclona fascigera* obtained from Mandeh Island, Pesisir Selatan, West Sumatra that can produce antibacterial compounds. This study aims to isolate the antibacterial compounds produced by *Bacillus sp.3* (A1). The methods that has been used were bacterial cultivation on Nutrient Broth medium using Shaker Incubator at 150 RPM at 37°C for 48 hours and isolation of antibacterial compound. The isolation method of the compound was carried out by column chromatography method. The testing of antibacterial activity was done by using agar diffusion method. Characterization of isolated compounds were performed using UV and IR spectrophotometer. From this research, two compounds RJ1 and RJ2 were obtained. The compound RJ1 was yellow oily (2.8 mg). The compound RJ1 can inhibit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 at a 1% of Minimum Inhibition Concentration (KHM). RJ2 compound was yellow oily (3.1 mg). The RJ2 compound can inhibit *Escherichia coli* ATCC 25922 at a 1% of Minimum Inhibition Concentration (MIC).

ABSTRAK: *Bacillus sp. 3* (A1) merupakan salah satu isolat bakteri simbiosis spon laut *Haliclona fascigera* asal Pulau Mandeh, Pesisir Selatan, Sumatra Barat yang dapat memproduksi senyawa antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa aktif sebagai antibakteri yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.3* (A1). Metoda yang digunakan yaitu kultivasi bakteri pada media Nutrient Broth menggunakan Inkubator Shaker dengan kecepatan 150 RPM pada suhu 37°C selama 48 jam dan isolasi senyawa antibakteri. Metode pemisahan senyawa dilakukan dengan metoda kromatografi kolom. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metoda difusi agar. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV dan spektrometer IR. Dari penelitian ini didapatkan dua senyawa RJ1 dan RJ2. Senyawa RJ1 berupa minyak berwarna kuning (2,8 mg). Senyawa RJ1 dapat menghambat bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada Konsentrasi Hambat Minimum 1%. Senyawa RJ2 berupa minyak berwarna kuning (3,1 mg). Senyawa RJ2 dapat menghambat bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 pada konsentrasi hambat minimum 1%.

Access this article

DOI: [10.29208/jsfk.2017.4.1.146](https://doi.org/10.29208/jsfk.2017.4.1.146)

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi telah menyebabkan kematian sebesar 13 juta orang di seluruh dunia setiap tahun, terutama di negara-negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Pemakaian antibakteri merupakan keharusan dalam penanganan penyakit infeksi. Dalam beberapa tahun terakhir terdapat peningkatan angka resistensi terhadap antibiotika [1]. Terdapat sejumlah laporan bahwa

bakteri Gram positif dan Gram negatif telah resisten terhadap antibiotika yang kerap kali digunakan. Beberapa bakteri yang dimaksud adalah *Salmonella typhi* [2], *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter calcoaceticus* [3], dan *Staphylococcus epidermidis* [4].

Fakta di atas menjelaskan bahwa perlunya penemuan senyawa antibakteri atau senyawa bioaktif baru yang berasal dari sumber daya alam di Indonesia. Indonesia dikenal sebagai negara bahari dengan luas 75 % berupa lautan,

*Corresponding Author: Dian Handayani

Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Kampus Limau Manis,
Padang, Sumatera Barat, 21563.
Email: dianh_17@yahoo.com

Article History:

Received: 14 May 2017

Accepted: 20 Oct 2017

Published: 30 Nov 2017

memiliki kekayaan sumber daya hayati yang melimpah, antara lain ditemukan berbagai jenis spon. Beberapa jenis spon tersebut dilaporkan memiliki senyawa bioaktif yang dapat digunakan dalam bidang farmasi [5].

Spon laut diketahui menjadi tempat hidup beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40% dari biomassa spon. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dengan spon laut menyebabkan invertebrata laut ini memiliki potensi antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan organisme darat dan laut lainnya [6].

Salah satu contoh senyawa aktif yang telah ditemukan dan dilaporkan dari genus *Haliclona* adalah haliclotriol A dan B (triterpen ketida), papuamine, dan haliclonadamine A (alkaloid) yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba [7]. Senyawa yang telah ditemukan dari spon *Haliclona fascigera* yaitu helianane yang merupakan golongan seskuiterpen [8]. Aktivitas antibakteri juga ditemukan pada hasil ekstraksi *Haliclona fascigera* dimana pada konsentrasi ekstrak metanol 5% memperlihatkan aktivitas antibakteri dengan diameter hambat 14 mm terhadap *E. coli* dan 15 mm terhadap *S. aureus*, pada konsentrasi ekstrak methanol 3% diameter hambatnya 13 mm terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, dan pada konsentrasi ekstrak metanol 1% diameter hambatnya 11 mm terhadap *E. coli* dan *S. aureus* [9].

Terdapat 16 bakteri yang telah diisolasi dan 4 diantaranya memiliki aktivitas antibakteri pada penelitian Febrianto (2014). Salah satu bakteri yang memiliki aktivitas adalah isolat bakteri A1. Ekstrak etil asetat bakteri A1 (*Bacillus sp.3*) memiliki aktivitas terhadap bakteri uji *S. aureus* dengan diameter hambat sebesar 10 mm, 12 mm dan 18 mm pada konsentrasi berturut-turut 0.5%, 1% dan 2% serta memiliki aktivitas terhadap bakteri uji *E. coli* dengan diameter hambat 8 mm, 9 mm dan 11 mm pada konsentrasi berturut-turut 0.5%, 1%, dan 2% [10]. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk mengisolasi dan karakterisasi awal senyawa antibakteri dari isolat *Bacillus sp.3*. (A1), simbion dari *Haliclona fascigera*.

METODE PENELITIAN

Bakteri dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Bacillus sp.3* (A1) simbiosis dari spon laut *Haliclona fascigera* yang diperoleh dari peneliti sebelumnya [10]. media pembenihan padat (Nutrient Agar) (Merck®), media pembenihan cair (Nutrient Broth) (Merck®), silika gel 60 (Merck®), antibiotik kloramfenikol 0.3% (Sigma®), pelarut etil asetat, metanol, dan n-heksan.

Penentuan waktu kultivasi optimum isolat *Bacillus sp.3* (A1)

Koloni bakteri yang telah diinkubasi pada media Nutrient Agar (NA) (Merck®), selama 24 jam pada suhu 37 °C, diambil 1 ose dan dipindahkan kedalam 10 mL media Nutrient Broth (NB) (Merck®), dan dihomogenkan. Kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C dengan kecepatan 150 RPM dan digunakan sebagai starter inoculum.

Starter inoculum bakteri sebanyak 10 mL kemudian dicukupkan menjadi 100 mL dengan media NB, dan dikultivasi dengan alat Incubator Shaker Series pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 96 jam. Setiap 0, 24, 30, 48, 72, dan 96 jam waktu inkubasi, dilakukan pengukuran Optical Density (OD) media kultivasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS Pharmaspec 1700 (Shimadzu®), pada panjang gelombang 600 nm. Data pengukuran tersebut digambarkan sebagai kurva pertumbuhan bakteri.

Kultivasi isolat *Bacillus sp.3* (A1)

Kultivasi isolat *Bacillus sp.3* (A1) dilakukan menggunakan media NB. Satu ose kultur bakteri dimasukkan ke dalam 54 labu Erlenmeyer ukuran 250 mL yang berisi 150 mL media NB dan diinkubasi dengan alat Incubator Shaker Series dengan kecepatan 150 RPM pada suhu 37°C selama 48 jam (waktu kultivasi optimum).

Ekstraksi senyawa metabolit sekunder isolat *Bacillus sp.3* (A1)

Kultur *Bacillus sp. 3* (A1) sebanyak 8 L dimaserasi menggunakan pelarut etil asetat perbandingan 1:1 dan disonikasi selama 10 menit. Ekstrak etil asetat dipisahkan dari media kultur menggunakan corong pisah dan disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak organik yang didapat kemudian diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator (Buchi®).

Isolasi dan pemurnian senyawa antibakteri

Untuk menentukan eluen yang akan digunakan untuk kolom kromatografi maka dilakukan monitoring pola noda dengan plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Merck®), Hasil pemeriksaan dengan plat KLT menunjukkan pola penyebaran senyawa-senyawa yang baik menggunakan fasa gerak etil asetat : metanol (19:1) dengan penampak noda lampu UV254nm. Selanjutnya dilakukan isolasi senyawa antibakteri ekstrak etil asetat *Bacillus sp.3* (A1) menggunakan kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silica gel 60 (0.2-0.5 mm) dan fasa gerak etil asetat:metanol dengan perbandingan 19:1 secara isokratik. Hasil kromatografi kolom ditampung dengan vial ukuran

10 mL sebanyak 71 vial. Eluen tersebut dimonitor dengan KLT dan penampak noda lampu UV254 nm. Fraksi dengan pola noda yang sama kemudian digabung sehingga diperoleh 8 fraksi yaitu fraksi A (1-4), B (5-8), C (9-13), D (14-16), E (17-20), F (21-37), G (38-54) dan H (55-71). Selanjutnya dari 8 fraksi tersebut diuji aktivitas antibakteri dengan metoda difusi menggunakan *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922. Dari hasil uji aktivitas antibakteri diketahui bahwa fraksi A dan B memiliki aktivitas antibakteri yang ditandai dengan adanya zona bening pada cawan petri.

Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode swab (bakteri uji digoreskan secara merata) kemudian kertas cakram steril yang telah ditetesi larutan fraksi senyawa yang didapatkan diletakkan di atas permukaan media NA yang sudah memadat. Inkubasi bakteri dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang muncul setelah diinkubasi diamati dan diukur diameternya. Sebagai kontrol negatif digunakan pelarut etil asetat dan sebagai kontrol positif digunakan antibiotik kloramfenikol 0,3% (Sigma®).

Karakterisasi senyawa hasil isolasi

Karakterisasi senyawa hasil isolasi, meliputi pemeriksaan organoleptis, pemeriksaan kimia dan fisikokimia, kelarutan, kromatografi. Pemeriksaan fisikokimia meliputi analisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS Pharmaspec 1700 (Shimadzu®) dan Spektrofotometer Fourier Transform InfraRed (FT-IR) Spectrum One (Perklin Elmer®).

HASIL DAN DISKUSI

Spesies *Bacillus* merupakan bakteri gram positif aerob atau anaerob fakultatif berbentuk batang sporulasi yang tersebar luas di alam [11]. Hasil penelusuran literatur menunjukkan bahwa sejumlah bakteri dari spesies *Bacillus* seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Sedangkan *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus* dan *Bacillus brevis* diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* [12].

Sebelum dilakukan proses isolasi senyawa antibakteri, dilakukan penentuan waktu kultivasi optimum *Bacillus sp.3* (A1). Hal ini bertujuan untuk memperkirakan waktu kultivasi sehingga diperoleh jumlah metabolit sekunder yang maksimal. Nilai absorbansi yang paling besar menunjukkan jumlah bakteri pada media kultur lebih banyak akibat dari kekeruhan [13].

Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.3* (A1), waktu kultivasi optimum terjadi pada waktu 48 jam. Pada waktu 48 jam pertumbuhan bakteri tersebut, kultur bakteri *Bacillus sp.3* (A1) menunjukkan nilai kekeruhan paling tinggi (Abs = 1,735) dibandingkan dengan waktu lainnya yaitu waktu ke- 0, 24, 48, 72, dan 96 jam.

Dari hasil kultivasi *Bacillus sp.3* (A1) sebanyak ± 8 L diperoleh ekstrak kental etil asetat sebanyak 457 mg. Pemisahan senyawa menggunakan kromatografi kolom dengan metode isokratik (perbandingan tetap yaitu etil asetat:metanol (19:1). Metoda isokratik ini digunakan apabila komponen-komponen kimia dalam suatu fraksi dapat memisah dengan baik yang diketahui dari pola noda pada KLT. Pemisahan senyawa menggunakan kromatografi kolom didapatkan 8 fraksi yaitu fraksi A (58,4 mg), fraksi B

Gambar 1. Kurva optimasi waktu pertumbuhan *Bacillus sp.3* (A1)

Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa RJ1 terhadap *S. aureus* ATCC 25923

Tabel 1. Diameter hambat senyawa RJ1

Konsentrasi	Diameter Hambat (mm)
1%	7,5
0,5%	-
Kontrol (+)	25
Kontrol (-)	-

(59,5), fraksi C (116 mg), fraksi D (21,9 mg), fraksi E (20,4 mg), fraksi F (53,3 mg), fraksi G (34,6 mg), dan fraksi H (128,4 mg). Delapan fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas antibakteri untuk mengetahui fraksi yang akan dilanjutkan dengan tahap isolasi. Dari hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan bahwa fraksi A aktif terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 1% dan fraksi B aktif terhadap *S. aureus* dan *E. coli* pada konsentrasi 1%.

Hasil monitoring KLT fraksi A tidak memperlihatkan pemisahan yang baik, maka dilakukan proses kromatografi kolom dengan metode SGP (Step Gradient Polarity) dimana fasa gerak yang digunakan dimulai dari pelarut nonpolar kemudian kepolaran pelarut ditingkatkan secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai dengan tingkat kepolaran. Fraksi kolom tersebut ditampung dalam vial dan fraksi dengan noda yang sama digabung. Diperoleh 5 fraksi yaitu fraksi A1

(15,4 mg), A2 (2,8 mg), A3 (1,7 mg), A4 (5,9 mg), dan A5 (11,4 mg). Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 1% menunjukkan bahwa terdapat zona hambat di sekeliling cakram dari fraksi A1, A2, dan A3. Hasil monitoring dengan menggunakan KLT dari keenam fraksi, fraksi A2 telah memberikan 1 noda di bawah penampak noda sinar UV254 nm dan uap iodium.

Dari fraksi A2 diisolasi senyawa murni RJ1 dengan jumlah 2,8 mg yang mempunyai Rf 0,5 dengan fase gerak n-heksan : etil asetat 4:1. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas diketahui bahwa senyawa RJ1 pada konsentrasi 1% memberikan diameter hambat 7,5 mm sedangkan pada konsentrasi 0.5% tidak adanya diameter hambat. Sehingga Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) senyawa RJ1 terhadap *S. aureus* adalah 1%.

Tahap isolasi selanjutnya dilakukan terhadap raksi B yang memperlihatkan aktivitas terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hasil monitoring KLT dari fraksi B yang tidak memperlihatkan pemisahan yang baik, maka dilakukan proses kromatografi kolom dengan metode SGP

Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa RJ2 terhadap *E. coli* ATCC 25922

Tabel 2. Diameter hambat senyawa RJ1

Konsentrasi	Diameter Hambat (mm)
1%	8
0.5%	-
Kontrol (+)	18
Kontrol (-)	-

Tabel 3. Karakterisasi senyawa RJ1 dan RJ2

No	Karakterisasi	Senyawa RJ1	Senyawa RJ2
1	Organoleptis		
	Bentuk	Minyak	Minyak
	Warna	Kuning	Kuning
2	Pemeriksaan Kelarutan	Larut dalam pelarut n-heksan	Larut dalam pelarut etil asetat.
3	Pemeriksaan Senyawa Kimia		
	Dragendorff	Tidak Bereaksi	Tidak Bereaksi
	FeCl ₃	Tidak Bereaksi	Tidak Bereaksi
	Lieberman-Bouchard	Tidak Bereaksi	Tidak Bereaksi
	H ₂ SO ₄ 10% dalam MeOH	Tidak Bereaksi	Tidak Bereaksi
	Uap Kristal Iodium	Kuning-Jingga	Kuning-Jingga
4	Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	Fasa Gerak n-heksan:etil asetat (4:1) R _f = 0.5	Fasa Gerak n-heksan:etil asetat (2:3) R _f = 0.5

(Step Gradient Polarity) dimulai dari pelarut n-heksan; perbandingan n-heksan dan etil asetat hingga metanol. Fraksi kolom tersebut ditampung dalam vial dan fraksi dengan noda yang sama digabung. Diperoleh 7 fraksi yaitu fraksi B1 (10,5 mg), B2 (2,3 mg), B3 (4,3 mg), B4 (2,5 mg), B5 (2,7 mg), B6 (3,5 mg) dan B7 (3,9 mg). Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap tujuh fraksi tersebut.

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan bahwa semua fraksi tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 1%. Sedangkan hasil uji aktivitas terhadap bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 1%, fraksi yang menunjukkan aktivitas dan telah memberikan satu noda sinar UV254 nm dan uap iodium adalah fraksi B2.

Dari fraksi B2 diisolasi senyawa murni yaitu RJ2 dengan jumlah 3,1 mg yang mempunyai R_f 0,5 dengan fasa gerak n-heksan:etil asetat 2:3.

Senyawa RJ2 pada konsentrasi 1% memberikan diameter hambat 8 mm dan pada konsentrasi 0,5% tidak adanya diameter hambat, sehingga Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi RJ2 terhadap bakteri *E. coli* adalah 1%.

Dari pemeriksaan kimia dilakukan dengan beberapa penampak noda pada plat KLT. Pemeriksaan kimia terhadap senyawa RJ1 dan RJ2 menggunakan pereaksi Dragendorff, FeCl₃, Lieberman-Bouchard dan H₂SO₄ 10% dalam metanol tidak menimbulkan warna, sementara dengan pereaksi uap kristal iodium menghasilkan noda berwarna kuning-jingga.

Spektrum UV senyawa RJ1 dalam pelarut metanol memperlihatkan serapan maksimum pada panjang

gelombang 252,00 nm (Abs=0,457). Dari data spektrum IR didapatkan fraksi RJ1 memperlihatkan adanya serapan pada bilangan gelombang 2923,39 - 2853,58 cm⁻¹ yang diduga berasal dari rengang C-H alifatis, absorpsi pada bilangan gelombang 1710,27 cm⁻¹ yang merupakan karakteristik regang C=O, dan serapan pada bilangan gelombang 1463,52 cm⁻¹ yang disebabkan regang -C-H₂ [14]. Senyawa RJ1 diduga adanya regang C-H alifatis dikarenakan tidak adanya bilangan gelombang 1300-1000 yang menunjukkan identitas regang C-H aromatis serta pada serapan UV tidak memperlihatkan puncak yang jelas.

Spektrum UV senyawa RJ2 dalam pelarut metanol memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang 202,60 nm (Abs = 0,880). Dari data spektrum IR didapatkan fraksi RJ2 menunjukkan serapan kuat pada bilangan gelombang 3330,59 cm⁻¹ yang diduga diberikan oleh gugus O-H. Serapan pada bilangan gelombang 2854,93-2925,69 cm⁻¹ diduga disebabkan adanya regang C-H alifatis, dan absorpsi pada bilangan gelombang 1714,58 cm⁻¹ merupakan absorpsi karakteristik dari regang C=O [14].

KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi senyawa RJ1 dan RJ2 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922 dari bakteri *Bacillus sp.3* (A3) simbiosis spon laut *Haliclona fascigera*.

REFERENSI

- [1] Salni, S., Marisa, H., & Mukti, R. W. (2011). Isolasi senyawa antibakteri dari daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* benth) dan penentuan nilai KHM-nya. *Jurnal Penelitian Sains*, 14(1), 38–41.
- [2] Chowta, M. N., & Chowta, N. K. (2005). Study of clinical profile and antibiotic response in typhoid fever. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23(2), 125–127.
- [3] Adimpong DB, Sørensen KI, Thorsen L, Stuer-Lauridsen B, Abdelgadir WS, Nielsen DS, Derckx PM, Jespersen L. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 78(22), 7903–7914.
- [4] Giacometti, A., Ghiselli, R., Cirioni, O., Mocchegiani, F., Orlando, F., Del Prete, M. S., ... & Scalise, G. (2003). Prophylactic efficacy of linezolid alone or combined with levofloxacin and vancomycin in a rat subcutaneous pouch model of graft infection caused by *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to glycopeptides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 724–726.
- [5] Ahmad, S. A. (2004). Empat Puluh Tahun dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuh-tumbuhan Tropika Indonesia. *Rekoleksi dan Prospek. Bulletin of The Indonesian Society of Natural Products Chemistry*, 4(2), 5–54.
- [6] Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagata, K., & Nagata, S. (2005). Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Environments*, 20(3), 178–185.
- [7] Ely, R., Supriya, T., & Naik, C. G. (2004). Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 309(1), 121–127.
- [8] Harrison, B., & Crews, P. (1997). The structure and probable biogenesis of Helianane, a heterocyclic sesquiterpene, from the Indo-Pacific sponge *Haliclona fascigera*. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(8), 2646–2648.
- [9] Nining. (2009). Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Spon Laut *Haliclona fascigera* (Skripsi). Fakultas Farmasi Universitas Andalas.
- [10] Febrianto, R. E., (2014). Penapisan Aktivitas Antimikroba Bakteri Endofit dari Spon Laut *Haliclona fascigera* Asal Perairan Pulau Mandeh Pesisir Selatan Sumatra Barat (Skripsi). Fakultas Farmasi Universitas Andalas.
- [11] Graumann, P. (Ed) (2007). *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*, 1st Ed., Caister Academic Press.
- [12] Kuta, F. A., Nimzing, L., & Orka'a, P. Y. (2009). Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. *Applied Medical Informatics*, 24(1,2), 42–46.
- [13] Radji, M. (2011). *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- [14] Silverstein, R.M., Bassler, G.C., & Morill, T.C. (1981). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th Ed., Wiley.

Copyright © 2017 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)