



PengujianAktivitas Sitotoksik dan Penentuan Spesies Bakteri Symbion Spons *Haliclona sp*

Warsidah* & Eka Kartika

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Tanjungpura, Pontianak

* Kontak : warsidahuntan@gmail.com

ABSTRACT

An investigation of cytotoxic activity from bacterial symbiont of sponge found in West Kalimantan upon shrimp larvae, with Brine Shrimp Lethality Test BSLT, was carried out. Sponge sample of *haliclona sp* was taken in 10-m depth from West Kalimantan waters. It was concluded that one type of bacteria that actively cytotoxic with LC₅₀ in methanol extract was 55 ppm. Taxonomical examination and biochemical test showed that the identified bacteria is *Serratia sp*. More sponge species will be required for this kind of test in the future.

Keywords ; cytotoxic activity, *Haliclona sp*, bacterial isolate, BSLT, & *Serratia sp*

Latar Belakang

Spons merupakan salah satu habitat dari ekosistem terumbu karang di laut yang sangat potensial sebagai sumber bahan aktif. Dari sebanyak 15.000 jenis spons yang tersebar di berbagai perairan dunia, baru sekitar 7.000 sponge yang telah dilaporkan (De Voogd, 1997). Penelitian organisme bahari di bidang biomedik sampai sekarang ini masih didominasi oleh spons (Faulkner, 2000). Berbagai penelitian spons yang telah dipublikasikan didominasi oleh perolehan senyawa yang memiliki aktivitas biologik yang tinggi seperti anti kanker, anti HIV, anti jamur, dan anti bakteri.

Spons memiliki pola makan melalui penyaringan air laut di pori-pori

permukaan tubuhnya sehingga dikenal sebagai *filter feeder*. Pada umumnya air laut mengandung nutrient seperti alga, bakteri, jamur, fitoplankton dan mikroba lainnya. Barnes (1991) melaporkan bahwa spons mempunyai kemampuan menyaring bakteri yang ada di sekitarnya sebanyak 77 % yang dicerna secara enzimatik sehingga menghasilkan senyawa aktif. Asosiasi bakteri dengan organisme laut memiliki peranan penting dalam fungsi ekologis, industri dan kesehatan manusia (James, *et al*, 1996). Spons merupakan sumber utama bakteri/jamur laut dan kandungan aktif dari jamur/bakteri laut ini belum banyak diteliti, demikian juga dengan aktivitas farmakologinya.

Metabolit sekunder dari beberapa spons di perairan laut Karibia mengandung senyawa **aeroplisin** yang bersifat

sitotoksik dan dikembangkan menjadi obat anti kanker. Senyawa ini menghambat aktivitas enzim tirokinase dan merupakan metabolit sekunder spons yang pertama dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik. Faulkner, D.J (2000) melaporkan telah menemukan senyawa kimia unik yang disebut **Cyclic Peroxy Acid (CPAs)** dari spons *Plakinistrella sp* dari pantai Seychelles.

Dari perairan Indonesia telah diisolasi suatu senyawa aktif katirimin dari spons *Clathria basilana* yang aktivitas farmakologiknya sebagai antimikroba dan penelitian aktivitas dari metabolit sekunder spons tersebut masih terus dikembangkan (Soediro, I.,1998).

Beberapa bakteri dan jamur laut dilaporkan menghasilkan senyawa metabolit sekunder di antaranya adalah komponen antitumor **gancidin W** yang dihasilkan dari *Streptomyces gancidicus* (Aiso, *et. al*, 1956) dan senyawa **pulchellalactame**, inhibitor CD45 protein tirosin pospatase (Alvi, *et al*, 1998). Senyawa **asperazin** diisolasi dari jamur laut *Aspergillus niger* yang hidup pada spons *Hyrtios proteus* (Varoglu, *et al*,1997). Edrada *et al* (2000) melaporkan ditemukannya senyawa **spiciferons A dan B** serta **spiciferol A** yang diisolasi dari mikroorganisme *Dreosclera hawaiiensis* pada spons *Callyspongia aerizusa*.

Kepulauan Kalimantan yang terdiri dari gugusan pulau-pulau merupakan wilayah perairan yang kaya akan terumbu karang dengan beberapa habitat makhluk hidup di dalamnya, seperti spons, kerang, ikan dan beberapa hewan dan tumbuhan laut lainnya. Telah ditemukan beberapa jenis spesies spons di wilayah perairan Kalimantan Barat di antaranya dari spesies *Callyspongia sp*, *Xestospongia sp*, *Aptos aptos sp*, dan

Haliclona sp. Dari penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa spons seperti *Callyspongia*, *Xestospongia* dan *Aptos aptos* yang diambil di perairan Kalimantan Barat tersebut mengandung senyawa-senyawa penting seperti alkaloid (Sapar, A., dkk, 2005), steroid yang memiliki aktivitas yang juga penting seperti antimikroba (Ifriany, dkk, 2005., Warsidah, dkk, 2006).

Pengujian awal sitotoksik dari ekstrak spons *Haliclona sp* dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (Meyer,1991) menunjukkan bahwa fraksi kloroform spons tersebut menyebabkan kematian 50% (LC50) larva udang pada konsentrasi 53 ppm (Warsidah, dkk., 2004). Aktivitas sitotoksik yang dihasilkan spons tersebut mendasari penelusuran lebih lanjut tentang aktivitas sitotoksik dari bakteri yang bersimbiosis dengan spons *Haliclona sp* di perairan yang sama. Hal ini disebabkan oleh adanya kemungkinan bahwa metabolit sekunder aktif dari spons dipengaruhi oleh interaksi antara spons dengan bakteri yang bersimbiosis dengan spons yang bersangkutan.

Sampai saat ini penelitian tentang aktivitas farmakologik dari bakteri yang bersimbiosis dengan spons masih sangat kurang. Sebagai langkah awal dalam menentukan aktivitas metabolit sekunder bakteri tersebut, dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik dari bakteri yang bersimbiosis dengan spons *Haliclona sp* di perairan Kalimantan Barat, menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST).

Metode Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan selama sepuluh bulan meliputi beberapa

tahap, yaitu 1) Pengambilan sampel dan penyiapan bahan/alat penelitian, 2) Isolasi bakteri dari spons *Haliclona sp* dan 3) Uji aktivitas sitotoksik isolat bakteri (metode Brine Shrimp Lethality Test), 4) Mengarakterisasi bakteri (pengujian biokimia) yang bersifat sitotoksik.

1. Pengambilan sampel

Sampel spons *Haliclona sp* diambil dari terumbu karang di perairan Kalimantan Barat. Sampel dicuci dan dibersihkan dari kotoran, lalu dimasukkan dalam kantong plastik steril yang berisi air laut. Sampel spong dikirimkan ke Lembaga Oseanografi Nasional (LON) untuk identifikasi spesiesnya. Pada saat pengambilan sampel, dilakukan pengukuran pH, salinitas dan temperatur air laut.

2. Isolasi bakteri dari Spesimen spong

Sampel spong yang telah dibersihkan dipotong-potong kecil kemudian direndam dalam air dan dikocok-kocok agar bakteri yang ada dalam tubuh spong dapat tersuspensi. Selanjutnya suspensi bakteri diencerkan dengan pengenceran hingga 10^5 dengan medium cair *marine broth* (komposisi *marine broth* : ekstrak ragi 1g, pepton 5 g, air laut steril sintetik sampai 1000 mL). Hasil pengenceran 10^{-4} s/d 10^{-5} diinkubasi pada temperatur 28°C dengan variasi waktu 1,2 dan 3 minggu. Bakteri yang tumbuh pada media cair kemudian ditumbuhkan dalam media padat *marine Agar* (komposisi *marine Agar* : ekstrak ragi 1 g, pepton 5 g, agar 10 g, air laut steril sintetik sampai 100 mL) dengan cara memipet 100 μL biakan dan menyebarkannya dalam cawan Petri. Biakan diratakan dengan spreader

kemudian diinkubasi pada temperatur 28°C selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh pada media padat diinokulasikan kembali dalam media cair *marine broth* dengan cara mengambil koloni tunggal pada media padat dengan jarum ose dan diinkubasi lagi pada temperatur 28°C selama 24 jam.

3. Uji Aktivitas Sitotoksik Isolat Bakteri dengan metode Brine Shrimp Lethality Test

Penentuan aktivitas sitotoksik dilakukan dengan terlebih dahulu menginokulasikan koloni tunggal bakteri dalam media cair *marine broth* dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam dan selanjutnya diinokulasikan ke dalam media cair *marine broth* dan diinkubasi lanjut pada temperatur yang sama selama 5 hari. Hasil biakan bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit dan supernatan diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap larva udang (Meyer, *et al*, 1991).

Pengujian sitotoksik dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST) dilakukan dengan terlebih dahulu membuat larutan sampel (supernatan metabolit bakteri) konsentrasi 1, 10, 100 dan 1000 ppm dengan pembawa/medium air laut sintetik. Kedalam masing-masing larutan sampel sebanyak 10 mL dimasukkan sebanyak 10 ekor larva udang *Artemia salina*, selanjutnya dilakukan pengamatan selama 2 X 24 jam terhadap kematian larva udang. Data yang diperoleh diolah dengan program Probit Finney, untuk mendapatkan data LC50 dari metabolit bakteri spong.

4. Karakterisasi bakteri yang bersimbiosis dengan Spong

a. Uji Morfologi Bakteri

Identifikasi bakteri bersimbiosis dengan spong yang memiliki aktivitas sitotoksik dilakukan dengan sistem *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et. Al., 1994). Pengujian morfologi bakteri dimaksudkan untuk menentukan klasifikasi genus bakteri. Pada tahap awal karakterisasi, dilakukan dengan metode pewarnaan Gram (Benson, 2001), terhadap bakteri yang bersifat sitotoksik dengan cara goresan bakteri dioleskan pada kaca slide dan ditambahkan 1 tetes kristal violet selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya bakteri ditambahkan dengan 1 tetes *Gram's iodine mordant* (Merck) selama 1 menit, kemudian dicuci lagi dengan air mengalir. Kemudian ditambahkan lagi dengan etil alkohol 95% sampai kristal violet tidak larut lagi dan dicuci dengan air mengalir kembali. Akhirnya bakteri ditambahkan safranin selama 45 detik dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dan diperiksa dengan mikroskop. Bakteri gram positif menunjukkan hasil positif jika sel-sel tampak biru gelap atau ungu, sedangkan bakteri gram negatif akan menunjukkan sel-sel merah muda (Hadioetomo, 1985). Selain itu, pada uji pewarnaan juga ditentukan tipe morfologi bakteri (kokus, basilus, vibrio dan spirillum).

b. Uji Biokimia

Pengujian biokimia dilakukan untuk menentukan spesies dari isolat bakteri dari sampel spong. Uji biokimia yang akan dilakukan meliputi tes fermentasi karbohidrat, tes pembentukan indol, tes produksi H₂S, tes penggunaan sitrat, tes urease, tes dekarboksilase, dan tes ONPG. Substrat yang digunakan untuk tes fermentasi karbohidrat adalah

glukosa, laktosa, manitol, maltosa dan sakarosa.

Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan penelitian tentang potensi bakteri spong sebagai bahan sitotoksik yang merupakan indikasi awal dari suatu bahan yang dapat dijadikan anti kanker. Spong merupakan salah satu biota laut, jenis hewan avertebrata yang hingga saat ini mendominasi riset pencarian senyawa bahan alam dari laut. Simbiosis mutualisme antara spong dengan makhluk hidup di sekitarnya seperti ekosistem terumbu karang, flora maupun fauna lain yang hidup pada terumbu karang serta beraneka ragam jasad renik yang melayang-layang di perairan terumbu berpotensi menghasilkan senyawa aktif atau metabolit sekunder. Spong sebagai hewan *filter feeder* memiliki kemampuan menyaring nutrient di wilayah perairan habitatnya, yang selanjutnya dicerna secara enzimatis. Hal ini menyebabkan suatu spong ataupun mikroba yang bersimbiosis dengan spong memiliki potensi sebagai sumber metabolit sekunder yang aktif dan dapat diteliti lebih lanjut.

Berdasarkan hasil isolasi mikroba dari spesies spong *Haliclona sp* yang hidup di perairan kepulauan Lemukutan diperoleh 5 (lima) jenis bakteri dan 1 jenis jamur. Hal ini ditandai dengan medium pertumbuhan yang dapat ditumbuhi oleh mikroba, yaitu dapat tumbuh pada medium selektif marine agar (berisi : potato, dextrose, peptone, dan agar) yaitu suatu medium umum pertumbuhan bakteri/jamur yang habitat aslinya adalah lingkungan

perairan asin. Koloni yang tumbuh dipidahkan berdasarkan berdasarkan warna, bentuk, dan tepian koloninya. Karena dari hasil pengamatan menunjukkan terdapat lima jenis koloni yang memiliki karakteristik berbeda, maka disimpulkan bahwa terdapat 6 jenis mikroba yang berbeda sebagai isolate mikroba spong tersebut. Khususnya untuk jamur, pertumbuhan hyfa memiliki karaktersitik sendiri.

Pada uji pendahuluan sitotoksik yaitu menguji semua koloni mikroba (bakteri dan jamur) dengan metode brine shrimp lethality test menunjukkan bahwa dari enam jenis isolate bakteri, koloni A (gambar 1) memberikan hasil yang positif yaitu menyebabkan kematian bagi larva udang dalam pengamatan 1 x 24 jam. Pengujian awal sitotoksik dilakukan dengan memasukkan setiap isolat bakteri ke dalam masing-masing vila berisi air laut dan 10 ekor larva udang. Pengamatan menunjukkan koloni A menyebabkan kematian pada 6 ekor larva udang.

Selanjutnya isolat bakteri yang aktif tersebut diuji lebih lanjut. Dengan terlebih dahulu mengekstraksi zat aktif atau metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri selama fermentasi. Fermentasi sendiri merupakan proses produksi metabolit sekunder dalam wadah dan medium fermentasi yang spesifik mendepresi mikroba untuk mengeluarkan zat aktif selama fase lag, dimana mikroba akan mempertahankan diri untuk tetap hidup, dan mikroba yang mampu bertahan pada masa tersebut dianggap sebagai mikroba aktif. Fermentasi dilakukan selama 3 x 24 jam yang disertai dengan penggoncangan (shaker) yang bertujuan untuk memudahkan terjadinya pembelahan sel mikroba aktif tersebut.

Selanjutnya penyarian dihentikan dengan anggapan bahwa pembelahan sel mikroba telah sampai pada fase lag, dimana banyaknya mikroba yang mati lebih banyak dari yang hidup. Sedangkan bakteri yang masih tahan hidup pada kondisi demikian menunjukkan bahwa mikroba tersebut menghasilkan metabolit sekunder yang digunakan untuk mempertahankan kehidupannya dalam kondisi krisis nutrisi.



Gbr 1. Isolat bakteri spong



Gbr 2. Sel bakteri aktif

Produk metabolit yang dihasilkan dari fermentasi tersebut selanjutnya diekstraksi dengan methanol untuk mengeluarkan isi sel aktif dari sel itu sendiri dan dipekatkan dengan evaporator. Ekstrak kental yang

diperoleh kemudian dilakukan pengujian dengan metode Brine Shrimp Letahlity Test, yaitu pengujian dengan mengamati angka kematian larva udang setelah pemberian ekstrak, seperti yang telah dilakukan sebelumnya pada uji pendahuluan isolat mikroba. Hasil pengamatan dapat ditunjukkan dalam tabel berikut :

dan program pengolahan data yang sama yaitu sebesar 53 ppm, antara spons *Haliclona sp* dengan isolat bakteri yang hidup bersimbiosis dengan spesies tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang sama. Tentunya hal ini sesuai dengan asumsi bahwa aktivitas biologik yang dimiliki oleh spons ataupun mikroba akan memiliki kemiripan,

Tabel 1. Hasil pengamatan angka kematian larva udang

Konsentrasi	Jumlah Hewan					
	Hidup			Mati		
	I	II	III	I	II	III
10 ppm	7	8	9	3	2	1
100 ppm	0	5	5	6	5	5
1000 ppm	5	0	0	10	10	10

Dari hasil perhitungan dengan program Probit Finney (lampiran 1) diperoleh

karena metabolit sekunder dalam kedua simbion tersebut diproduksi berdasarkan adanya interaksi secara internal maupun eksternal dalam ekosistem terumbu

Tabel 2. Hasil pengujian fitokimia terhadap ekstrak methanol

Uji Senyawa	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer	Putih	+
	Dragendrf	Orange coklat	+
	Wagner	Coklat	+
Saponin	+ air, dikocok	Tidak ada buih	-
Flavonoid	Shinoda	Tidak berubah	-
	Test H2SO4	Tidak berubah	-

bahwa ekstrak metanol memiliki nilai LC50 sebesar 55 ppm. Berdasarkan estimasi metode *brine shrimp lethality test*, menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak begitu aktif sebagai antikanker, tetapi lebih cenderung ke aktivitas lainnya yaitu sebagai antimikroba, dengan LC50 berada di antara 30 – 200 ppm.

karang.

Jika dibandingkan dengan aktivitas sitotoksik dari spons *Haliclona sp* yaitu dengan menggunakan metode

Jenis senyawa yang merupakan hasil metabolisme sekunder dari bakteri A berdasarkan pemeriksaan fitokimia dengan beberapa pereaksi spesifik menunjukkan bahwa golongan senyawanya adalah alkaloid (tabel 2).

Pada pengujian lain, identifikasi jenis bakteri melalui pemeriksaan biokimia menunjukkan bahwa bakteri tersebut dari spesies *Serratia sp.*

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian pengujian aktivitas sitotoksik isolat bakteri yang bersimbiosis dengan spong *Haliclona sp.*, maka dapat disimpulkan :

1. Bakteri simbiosis spong *Haliclona sp.* asal wilayah perairan Kepulauan Lemukutan Kalimantan Barat memiliki potensi aktivitas sitotoksik dengan LC₅₀ ekstrak metanol sebesar 55 ppm.

2. Bakteri aktif diidentifikasi sebagai bakteri *Serratia sp.*

DAFTAR PUSTAKA

- Aiso, K., Arai, T., Suzuki, M., Takamizawa, Y., 1956, *Journal Antibiotic*, 1956.
- Alvi, K.A., Casey, A., Nair, B.G., 1998, *Journal Antibiotic* .
- Armstrong,E; Yan, L; Boyd, K.G; Wright, P.C and Burgess, J.G., 2001, **The Symbiotic Role of Marine Microbes on Living Surfaces**, *Hydrobiologia*, 461: 37-40.
- Atlas, R and Bartha, R, 1993, **Microbial Ecology, Fundamentals and Applications**, Edisi ke-3, The Benyamin Publishing, California
- Barnes, (1991), **Invertebrata Zoologi**, Blackywell scientific PV6 Oxford London, Melbourne.
- Benson, 2001., **Microbiological Application, Laboratory manual in General Microbiology**, Ed ke—8, McGraw-Hill Companies, New York
- DeVoogd, N, 1997, **Cross-shelf Distribution of South West Sulawesi Open Reef Sponges**, University of Amsterdam.
- Dreyfuss, M.M., Chapela, I.H, 1994., **In The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential** (ed Gullo VP); Butterworth-Heinemann, Stoneham, 1994.
- Edrada, RA., Wray, V., Berg, A., Grafe, U., Sudarsono, Brauers, G., Proksch, P.Z., 2000, *Naturforsch, C: Biosciences*, 55, 218-221.
- Faulkner, D.J., *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17,1-6.
- Fleming, A. Br., *J. Exp.Pathol*, 1929, 10, 226-236.
- Fuller, R.W., Cardelina II, J.H., Kato, Y., Brinen, L.S., Clardy, J., Snader,K.M., Boyd, M.R., 1992, *Journal Med Chem*, 1992, 35, 3007-3011.
- Goodman, G.,A., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F (eds) **Pharmacolgy**, 7th ed, Macmillan, New York, 1985, pp, 1298-1299.

- Haygood, M. G., E. W. Schmidt, S. K. Davidson, and D. J. Faulkner, 1999. **Microbial Symbionts of Marine Invertebrates: Opportunities for Microbial Biotechnology**. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 33-43.
- Higa, T., R. Sakai, S. Sakemi, T. Ichiba, and J. Tanaka, 1992. **Cytotoxic Compounds From Marine Organisms**. In: Keeler, R. F., N. B. Mandava, and A. T. Tu. *Natural Toxins: Symposium on Natural Toxins Sponsored by The Division of Agricultural and Food Chemistry and The Division of Chemical Health and Safety*. American Chemical Society.
- Holt, J.H; Kreig,N.R; Sneath, P.H.A; Staley, J.T, and Williams S.T., 1994, **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, Edisi ke89, Williams and Wilkins, Maryland.
- Jasin, M, 1987, **Sistematika Hewan (Invertebrata dan Vertebrata)**, Cetakan Ke-1, Sinar Wijaya, Jakarta.
- James, S.G; Holmstrom,C and Kjelleberg, S, 1996, **Purification and Characterization of a Novel Antibacterial Protein from the Marine Bacterium D2**, *Appl Environ.Microbiol*,62:2783.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J., 1982. **Benchtop : Bioassay for The Discovery of Bioactive Natural Products an update; in studies in Natural Products Chemistry**. *J Med. Plant Res*.
- Mihopoulos, N., C. Vagias, I. Chinou, C. Roussakis, M. Scoulios, C. Harvala and V. Roussis, 1999. **Antibacterial and Cytotoxic Natural and Synthesized Hydroquinones from Sponge *Ircinia spinosula***. University of Athens.
- Pelczar, M, dan E.C.S Chan., 1998.,**Dasar-dasar Mikrobiologi**, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Sapar, A., Warsidah., 2005, **Isolasi dan Elusidasi Strukur Senyawa Alkaloid dari Spong di Perairan Karimata Kalimantan Barat**, Laporan Penelitian Dosen Muda DIKTI.
- Schmitz, F. J., B. F. Bowden and S. I. Toth, 1993. “**Antitumor and Cytotoxic Compound from Marine Organism**” in **Marine Biotechnology**; Vol. 1, *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*: Attaway, D. and O. Zaborsky (Eds.) : Plenum Press, New York, 197-308.
- Schmitz, F. J., 1994. **Cytotoxic Compounds From Sponges and Associated Microfauna**. In: van Soest, R.W.M., M. G. Th., van Kempen and J. C. Braekman, (Eds.), *Sponges in Time and Space*. Proc. 4th Int. Porifera Congr. Rotterdam: Balkema.
- Soest, R. W. M. van, 1989. **The Indonesian Sponge Fauna. A Status Report** *Netherlands Journal of Sea Research*, 23; 223-230.

- Soediro, I., 1998., **Produk Alam Hayati dan Prospek Pemanfaatannya di Bidang Kesehatan dan Kosmetika**, *Proseeding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia*, Jakarta.
- Varoglu, M., Corbett, T.H., Valeriotte, F.A., Crews, P.1997, *Journal Org Chem*, 62, 7078-7079.
- Warsidah., Sapar, A., 2006, **Potensi Komponen Aktif Ekstrak Lipofilik Sponge Asal Perairan Kalimantan Barat terhadap Bakteri Patogen Udang**, Laporan Penelitian Dosen Muda DIKTI.
- Warsidah., Widiyantoro, A., Sapar, A., 2004, **Karakterisasi Metabolit Sekunder Aktif berkhasiat Sitotoksik dari Beberapa Spesies Spong Asal Perairan Kalimantan Barat**, Laporan Penelitian PRSD Kementerian RISTEK, RI, Jakarta.