

Aktivitas Inhibitor Protease dari Ekstrak Karang Lunak, Asal Perairan Pulau Panggang Kepulauan Seribu

Tati Nurhayati*, Muhammad Fikri, dan Desniar

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Lingkar Akademik Kampus IPB Darmaga Bogor 16680,
Telp.(0251)8622915. Fax. (0251) 8622916. nurhavati7870@yahoo.com

Abstrak

Beberapa komponen bioaktif dihasilkan oleh karang lunak, salah satunya inhibitor protease. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan karang lunak yang berpotensi sebagai penghambat aktivitas kerja enzim protease (inhibitor protease) pada beberapa bakteri patogen penghasil enzim protease serta mengetahui Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dari ekstrak karang lunak tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pelarut metanol lebih potensial untuk mengekstrak inhibitor protease dari karang lunak. Karang lunak jenis *Sarcophyton sp.* dan *Sinularia sp.* mampu menghambat 100% aktivitas protease bakteri *Staphylococcus aureus* dengan MIC 0,04% lebih kecil dari pada MIC EDTA (0,16%), sedangkan *Xenia sp.* menghambat protease bakteri *S. aureus* dengan MIC 0,08%. Karang lunak *Nephtea sp.* menghambat protease bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan MIC 0,28%.

Kata kunci: inhibitor protease, karang lunak, MIC.

Abstract

Several bioactive compounds were produced by soft corals, including protease inhibitor. The aim of this study was to obtain soft corals which potency as inhibitor toward protease enzyme activity on pathogenic bacterial that produced protease enzyme and to study Minimum Inhibitory Concentration (MIC) from the soft corals. This research shown that ethanol is more potential for extracting protease inhibitor from soft corals. *Sarcophyton sp.* and *Sinularia sp.* are capable of inhibiting protease enzyme activity against *Staphylococcus aureus* as 100% by MIC 0.04%, while that EDTA had MIC toward the protease as 0.16%. *Xenia sp.* was capable of inhibiting protease from *S. aureus* by MIC 0.08%. In the otherhand *Nephtea sp.* inhibited protease from *Pseudomonas aeruginosa* by MIC 0.28%.

Key words: protease inhibitor, soft coral, MIC.

Pendahuluan

Indonesia sebagai negara tropis dan mempunyai keanekaragaman hayati yang berlimpah, salah satunya adalah karang lunak. Hampir seluruh perairan Indonesia memiliki karang lunak dengan tingkat keragaman yang berbeda. Pulau Panggang, Kepulauan Seribu memiliki pulau dengan kondisi perairan yang masih baik. Penutupan terumbu karang di pulau ini termasuk dalam kategori sedang sampai baik (34,72-62,68%) dengan indeks keanekaragaman berkisar antara 0,2-2,81% (Mahaza, 2003).

Karang lunak (*soft coral*) merupakan bagian dari ekosistem terumbu karang yang penting (Benayahu, 1985) dan termasuk komponen terbesar setelah karang batu (Manuputty, 1996). Diantara organisme yang hidup di laut, karang lunak termasuk organisme penghasil komponen bioaktif yang terbesar

Dalam dekade terakhir, dilaporkan bahwa sebanyak 50% senyawa bioaktif yang ditemukan dalam invertebrata laut ini bersifat toksik (Radhika, 2006). Beberapa komponen bioaktif yang dihasilkan oleh karang lunak meliputi sitotoksik (Suh et al., 2006; Duh et al., 2007), senyawa antitumor (Watanabe et al., 1996), dan antikanker (Ahmed et al., 2003). Selain itu, diketahui juga karang lunak sebagai penghasil senyawa inhibitor enzim salah satunya adalah inhibitor protease (Rashid et al., 2000). Sebagai contoh, karang lunak *Lobophytum cristagalli* menghasilkan senyawa terpena yang mampu menghambat kerja protein transferase pada penyakit kanker (Coval et al., 1996), *Sinularia sp.* menghasilkan inhibitor H,K-ATPase (Sata et al., 1998) dan juga turunan *acylspermidine*, yang merupakan inhibitor H⁺-pyrophosphatase yang ada vakuola tanaman (Hirono et al., 2003).

Protease mikroba dapat terlibat dalam aktivasi protease eukariotik yang berpotensi mempunyai sifat-sifat patogenik dan secara langsung atau tidak langsung terlibat dalam patogenesis penyebab penyakit asal bakteri, seperti Beberapa komponen bioaktif yang dihasilkan oleh karang manusia dan immunoglobulin, protease IV dari *P. aeruginosa* merupakan faktor virulensi di kornea (Engel et al., 1998). Selain itu protease logam netral yang tergantung ion kalsium dari *Toxoplasma gondii* berperan dalam degradasi membran sel inang (Song & Nam 2003). Penelitian terhadap virus SARS menunjukkan adanya peran dari enzim protease dalam mekanisme molekuler hidupnya (Anan et al., 2003). Selain itu para peneliti HIV saat ini sedang melakukan uji klinik menggunakan protease sebagai target klinis (Davis et al., 2006). Semakin jelasnya keterlibatan enzim protease dalam berbagai mekanisme molekuler penyakit tersebut, maka dalam beberapa tahun terakhir ini perhatian terhadap protease sebagai target senyawa obat yang dihasilkan oleh organisme di alam sebagai penghambat kerja enzim protease (inhibitor protease).

Sebagai salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan bahan alam laut Indonesia, dilakukan penelitian dengan tujuan mencari jenis *soft coral* (karang lunak) yang potensial sebagai penghasil inhibitor protease untuk selanjutnya diisolasi dan diuji daya hambat minimumnya terhadap protease bakteri patogen penyebab beberapa penyakit.

Materi dan Metode

Koleksi dan karakterisasi sampel karang lunak

Sampel karang lunak dikoleksi dari perairan pulau Panggang, Kepulauan Seribu sebanyak 5 jenis dan diambil pada kedalaman berbeda (2-14 m) dengan *scuba diving*. Pengambilan sampel dilakukan dengan memotong bagian tubuh karang lunak, lalu dimasukkan kedalam plastik, kemudian dibawa ke permukaan air secara perlahan. Sampel disimpan dalam media pelarut metanol hingga terendam, kemudian ditransportasikan dalam keadaan dingin menggunakan *cool box*. Karang lunak diidentifikasi menurut Manuputty (2002).

Ekstraksi komponen bioaktif karang lunak

Ekstraksi komponen bioaktif pada karang lunak menggunakan metode Nurhayati et al., (2009). Ekstraksi dilakukan secara bertingkat, diawali dengan metanol, kemudian etil asetat, dan heksana dengan maserasi masing-masing 24 jam. Perbandingan antara sampel dan masing-masing pelarut adalah 1:3.

Ekstrak yang diperoleh dari masing-masing pelarut disaring kemudian dievaporasi. Apabila ekstrak dalam bentuk cairan, maka dilakukan pengeringan beku (*freeze dryer*).

Serbuk ekstrak karang lunak ditimbang untuk mengetahui rendemen yang didapat dengan rumus :

$$\text{Rendemen (b/b)} = \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Berat kerang lunak awal}} \times 100\%$$

Penapisan inhibitor protease dari ekstrak karang lunak

Media yang digunakan untuk penapisan ini adalah LA skim 2 % (b/v). Penapisan ini berfungsi untuk mendapatkan ekstrak karang lunak yang potensial sebagai inhibitor protease.

Ekstrak masing-masing dari jenis karang lunak yang berbeda dilarutkan kembali dengan pelarutnya, yaitu metanol, etil asetat dan heksana dengan konsentrasi 10% (b/v). Sebanyak 200 µl larutan tersebut ditambahkan ke dalam cawan petri, kemudian dicampur dengan 10 ml LA skim 2%. Sebagai kontrol digunakan pelarutnya, yaitu metanol, etil asetat dan heksana sebanyak 200 µl dicampur dengan LA skim 2%.

Sebanyak satu ose bakteri patogen ditusukkan ke dalam media. Setiap cawan ditusukkan 4 jenis bakteri uji secara duplo, lalu di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C.

Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri uji. Untuk menghitung potensi daya hambat dari masing-masing ekstrak digunakan rumus :

$$\text{Potensi Daya Hambat} = \left[1 - \left[\frac{IP_e}{IP_k} \right] \right] \times 100\%$$

IP_e: Indeks proteolitik bakteri uji pada media mengandung ekstrak

IP_k: Indeks proteolitik bakteri uji pada media kontrol

Ekstrak karang lunak yang memiliki potensi penghambatan lebih dari 50 % dilanjutkan untuk pengujian *minimum inhibitory concentration* (MIC).

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dianalisa dengan modifikasi Andrews, (2001). Masing-

masing ekstrak karang lunak diencerkan dengan pelarutnya hingga mempunyai konsentrasi 2-10% (b/v) sehingga konsentrasinya dalam cawan petri 0,04-0,2%. Sebagai kontrol negatif digunakan pelarutnya dan kontrol positif digunakan EDTA yang dilarutkan dalam buffer Tris-HCl 0,2 M, pH 8. Jumlah ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif yang dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 200 µl, sedangkan suspensi bakteri prekulturan (OD=0,5) yang dimasukkan ke dalam cawan sebanyak 2 µl. Cawan tersebut diinkubasi media selama 24 jam dengan suhu 37 °C, kemudian dihitung aktivitas penghambatan protease. Nilai MIC diperoleh dengan menentukan konsentrasi minimum yang mampu menghambat aktivitas protease bakteri patogen lebih dari 99%.

Analisa data

Hasil pengamatan yang berupa pengukuran diameter zona bening dan diameter koloni dari tiap-tiap jenis bakteri uji diolah menggunakan program *Microsoft Excell 2003* untuk mengetahui persentase penghambatan dari masing-masing karang lunak. Selanjutnya data diolah secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Koleksi dan karakterisasi karang lunak

Terdapat lima jenis karang lunak yang diperoleh dari Pulau Panggang, Kep. Seribu, yaitu *Sarcophyton* sp., *Sinularia* sp., *Nephthea*, *Xenia* sp. dan *Dendronephthya*. Karang lunak diidentifikasi berdasarkan bentuk morfologi dan warna (Manuputty, 2002).

Ekstraksi komponen inhibitor protease dari karang lunak

Pelarut yang digunakan pada penelitian adalah metanol (polar), etil asetat (semi polar) dan heksana (non polar). Penggunaan ketiga pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda ini bertujuan untuk mengekstrak komponen bioaktif dalam karang lunak sesuai dengan tingkat kepolarannya sehingga zat aktif dapat diekstrak secara optimal pada salah satu pelarut yang digunakan.

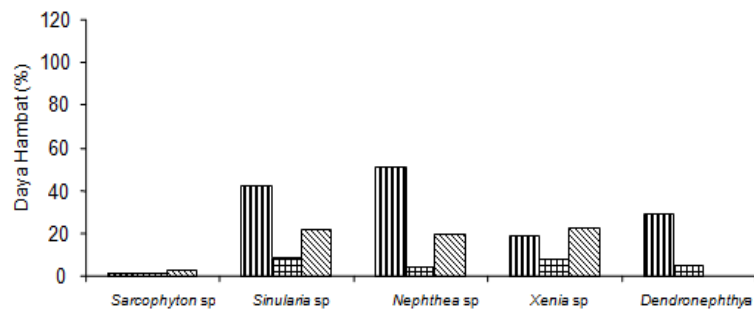
Hasil ekstraksi karang lunak *Sarcophyton* sp., *Sinularia* sp., *Nephthea*, *Xenia* sp. dan *Dendronephthya* dengan perbandingan sampel karang lunak dan volume pelarut yaitu 1:3 didapatkan rendemen hasil ekstraksi dengan pelarut metanol (9,6762%) lebih besar dibanding pelarut etil asetat (3,5682%) dan heksana (0,6375%). Hal ini-

menunjukkan bahwa komponen-komponen pembentuk karang lunak tersebut cenderung larut pada pelarut metanol. Metanol termasuk ke dalam golongan alkohol yang memiliki berat molekul (BM) rendah, sehingga memudahkan pembentukan ikatan hidrogen dengan molekul air dalam jaringan sampel (Hart, 1987). Selain itu pelarut ini mampu mengekstrak senyawa organik, sebagian lemak serta tanin, akibatnya senyawa di dalam jaringan sampel akan mudah terekstrak (Heat & Reneccius, 1987).

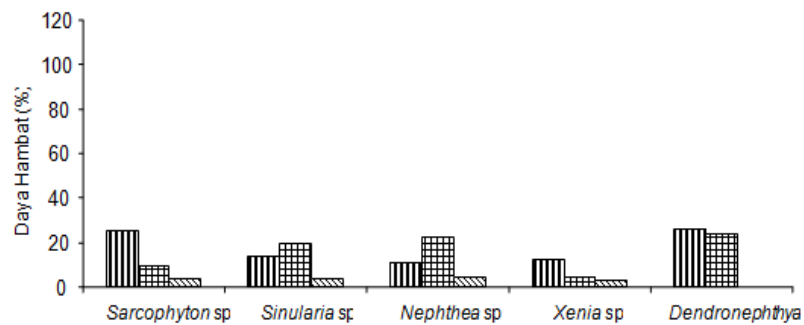
Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rendemen yang tertinggi diperoleh dari ekstrak karang lunak jenis *Sarcophyton* sp. sebesar 4,0421%. Tingginya rendemen yang dihasilkan disebabkan oleh besarnya komponen polar, semi polar dan non polar yang terkandung pada karang lunak *Sarcophyton* sp. yang terlarut didalam pelarutnya, sedangkan rendemen yang terkecil diperoleh dari ekstrak karang lunak jenis *Dendronephthya* sebesar 0,8776%. Rendahnya rendemen ini diduga karena pada proses pengkoleksian sebagian cairan yang merupakan penyokong tubuh karang lunak *Dendronephthya* keluar akibat proses pemotongan. Cairan yang keluar tersebut diduga mengandung sebagian besar komponen zat aktif yang terdapat pada karang lunak sehingga pada saat ekstraksi, sehingga hanya sedikit zat aktif yang terekstrak.

Penapisan potensi inhibitor protease pada karang lunak

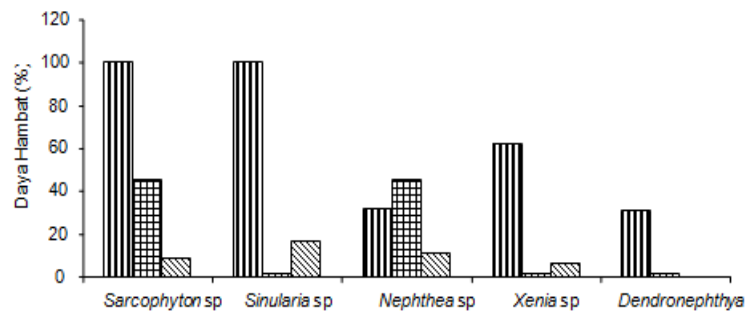
Penapisan ini bertujuan untuk mengetahui jenis karang lunak yang berpotensi sebagai inhibitor protease dari *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Aeromonas hydrophyla*. Hasil penapisan ekstrak dari lima jenis karang lunak terhadap protease bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan daya hambat terbesar dimiliki oleh ekstrak metanol dari karang lunak jenis *Nephthea*, yaitu 50,83% (Gambar 1). Berdasarkan hasil penapisan lima jenis karang lunak terhadap protease bakteri *Escherichia coli* menunjukkan bahwa daya hambat ekstrak lemah, dengan daya hambat maksimum terdapat pada ekstrak metanol dari karang lunak jenis *Dendronephthya* dengan daya hambat 25,70% (Gambar 2). Hasil penapisan ekstrak dari lima jenis karang lunak terhadap protease bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa ekstrak karang lunak dengan pelarut metanol dari jenis *Sinularia* sp. dan *Sarcophyton* sp. memiliki daya hambat yang sempurna terhadap protease bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 100% (Gambar 3). Hasil penapisan ekstrak dari lima jenis karang lunak terhadap protease bakteri *Aeromonas hydrophyla* menunjukkan penghambatan yang lemah, yaitu tertinggi sebesar 29,17% pada ekstrak etil asetat dari karang lunak *Sinularia* sp.



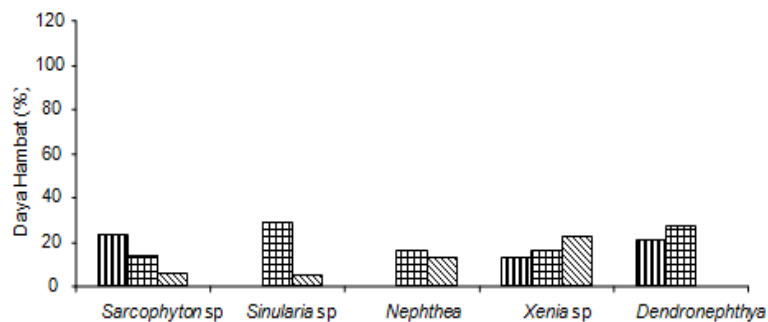
Gambar 1. Daya hambat ekstrak karang lunak terhadap *P. aeruginosa* pada pelarut yang berbeda; █= metanol; █=etil asetat; █= heksana



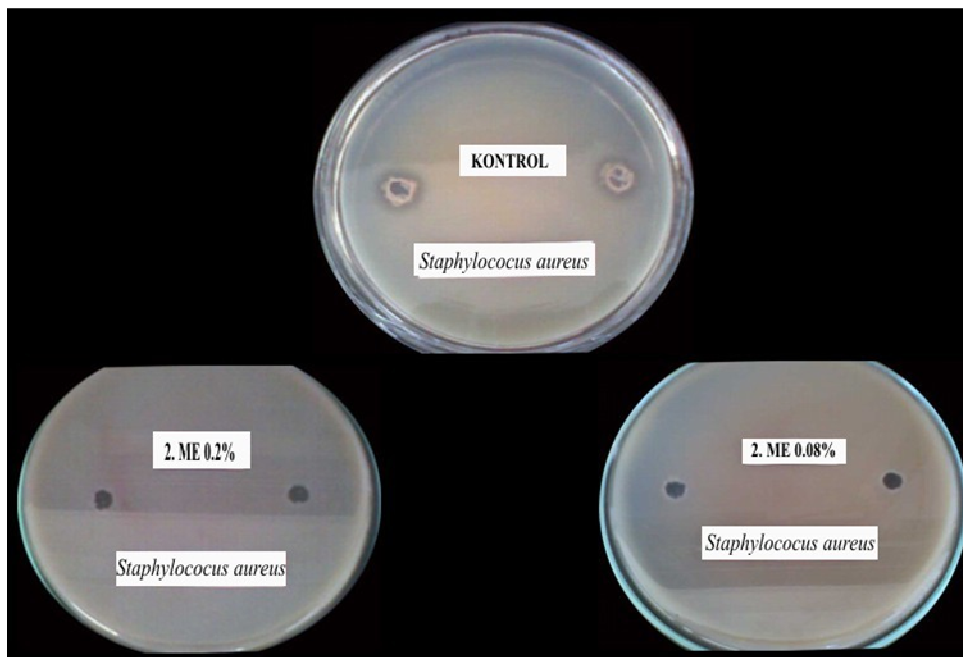
Gambar 2. Daya hambat ekstrak karang lunak terhadap *E. coli* pada pelarut yang berbeda; █= metanol; █=etil asetat; █= heksana



Gambar 3. Daya hambat ekstrak karang lunak terhadap *S. aureus* pada pelarut yang berbeda; █= metanol; █=etil asetat; █= heksana



Gambar 4. Daya hambat ekstrak karang lunak terhadap *A. hydrophyla* pada pelarut yang berbeda; █= metanol; █=etil asetat; █= heksana



Gambar 5. Daya hambat ekstrak *Sinularia* sp. terhadap protease *S. aureus*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak karang lunak mampu menghambat sempurna bakteri gram positif, seperti pada jenis *Sinularia* sp. dan *Sarcophyton* sp. yang memiliki daya hambat sempurna terhadap protease bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 100%, diikuti oleh ekstrak karang lunak jenis *Xenia* sp. sebesar 62,41%. Hal ini karena bakteri *Staphylococcus aureus* menghasilkan protease jenis serin (Baehaki et al., 2004). Enzim ini disekresikan dalam bentuk zimogen (tidak aktif) dan diaktifkan melalui mekanisme proteolisis terhadap substrat, diduga ekstrak karang lunak mampu berikatan dengan substrat sehingga menghambat proteolisis dan produksi enzim protease. Sementara itu karang lunak *Nephthea* mampu menghambat protease bakteri gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*) yang memiliki beberapa lapisan sel berupa struktur lipopolisakarida yang berikatan silang dengan protein dan mampu memproduksi beberapa jenis protease seperti protease intraseluler golongan protease IV (Wilderman et al., 2001), elastase (Branni et al., 2001; Braunn et al., 2001), dan alkalin protease (Baehaki et al. 2009; Feltzer et al., 2000). Hal ini diduga karena komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak karang lunak *Nephthea* mampu berkompetisi dengan substrat yang berupa protein (Coval et al., 1996), sehingga membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI). Dengan demikian terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat terhadap bagian aktif enzim. Akibat dari kompleks enzim-inhibitor ini menyebabkan terhambatnya produksi enzim ekstraseluler yang ditandai dengan mengecilnya zona bening disekeliling koloni.

Berdasarkan hasil penapisan ekstrak karang lunak terhadap bakteri patogen didapatkan daya hambat ekstrak metanol lebih berpotensi dibanding dengan ekstrak etil asetat dan heksana. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut metanol potensial digunakan sebagai pelarut dalam mengekstraksi komponen inhibitor protease dari karang lunak dan hal ini juga mengindikasikan bahwa inhibitor protease dari karang lunak lebih potensial larut pada pelarut metanol. Menurut Nurhayati et al. (2004), inhibitor protease juga ditemukan pada spons laut yang diekstraksi menggunakan pelarut akuades, seperti ekstrak spons *Jaspis stelifera* dan *Plakortis nigra* yang mampu menghambat protease *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) adalah suatu metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum dari suatu zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lebih dari 99%. Dalam penelitian ini, MIC merupakan konsentrasi minimum dari suatu zat yang dapat menghambat aktivitas enzim pada bakteri lebih dari 99%. Suatu zat dapat dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi apabila dengan konsentrasi yang rendah tetapi mempunyai daya hambat yang besar terhadap aktivitas enzim.

Konsentrasi minimal ekstrak karang lunak *Sarcophyton* sp. Dan *Sinularia* sp. untuk dapat menghambat protease *Staphylococcus aureus* adalah

0,04% (Gambar 5) dan ekstrak karang lunak *Xenia* sp. membutuhkan konsentrasi minimal 0,08% untuk dapat menghambat protease *Staphylococcus aureus*. Inhibitor komersil EDTA untuk dapat menghambat protease *Staphylococcus aureus* dibutuhkan konsentrasi minimal 0,16%. Berdasarkan hasil diatas ketiga ekstrak karang lunak tersebut memiliki konsentrasi lebih kecil dibandingkan dengan EDTA. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak karang lunak jenis *Sarcophyton* sp. dan *Sinularia* sp. potensial sebagai inhibitor terhadap protease *Staphylococcus aureus* dan lebih efektif dibandingkan dengan EDTA. Protease *Staphylococcus aureus* juga dapat dihambat oleh organisme spons jenis *Jaspis stellifera* dan *Plakortis nigra* dengan konsentrasi minimal sebesar 0,08% dan 0,12% (Nurhayati et al., 2004).

Karang lunak *Sinularia* dilaporkan mengandung lima jenis senyawa diterpen yang berfungsi untuk melindungi diri dari serangan predator, yaitu diterpena fleksibilida, dihidrofleksiibilida, sinulariolida, episinulariolida dan episinularilida asetat. Diantara kelima senyawa ini, hanya sinulariolida dan fleksibilida yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri. Untuk sinulariolida memiliki konsentrasi hambatan minimum sebesar 5 ppm, sedangkan fleksibilida sebesar 10 ppm (Aceret et al., 1997). Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa sinulamida dari *Sinularia* sp. mampu menghambat aktivitas H,K-ATPase dengan IC₅₀ sebesar 5,5 µM (Sata et al., 1998). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa organisme laut khususnya karang lunak potensial sebagai sumber komponen inhibitor protease, namun masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan senyawa aktif yang terdapat pada karang lunak yang berperan sebagai inhibitor protease pada bakteri patogen penyebab penyakit.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil ekstraksi diperoleh bahwa pelarut metanol merupakan pelarut yang potensial digunakan untuk mengekstrak komponen inhibitor protease dari karang lunak. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak metanol karang lunak jenis *Sarcophyton* sp. dan *Sinularia* sp. potensial sebagai sumber inhibitor protease karena mampu menghambat sempurna pada protease bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak kedua karang lunak ini mampu menghambat protease bakteri tersebut dengan MIC lebih kecil dari pada MIC EDTA.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada

reviewer yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan artikel ini.

Daftar Pustaka

- Aceret, T.L., Coll, J.C., Uchio, Y., & Sammarco, P.W. 1997. Antimicrobial activity of the diterpenes flexibilide and sinulariolide derived from *Sinularia flexibilis* Quoy and Gaimard 1833 (Coelenterata: Alcyonacea, Octocorallia). *CBF Part C* 120: 121-126.
- Ahmed A., Dai, C.F., Kuo Y.H., & Shen, J.H. 2003. 1 α , 3 β , 5 β -trihydroxy-24-methylenecholestan-6-one a novel steroid from a soft coral *Sinularia gibberosa*. *Steroids* 68: 377-381.
- Anan, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.K., & Hilgenfeld, R. 2003. Coronavirus main proteinase (3CL^{pro}) Structure: Basis Design of anti-SARS Drugs. *Sciences* 300: 1763-1767.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 5-16.
- Baehaki, A., Suhartono, M.T., Palupi, NS., & Nuhayati, T. 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi Industri Pangan*, XIX(1): 80-85
- Baehaki, A., Suhartono, M.T., Palupi, NS., & Nuhayati, T. 2004. Karakterisasi protease dari bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella* sp. *Prosiding Seminar Nasional dan Kongres PATPI*, ISBN: 979-99965-0-3. Hal 281-287.
- Benayahu, Y. 1985. Faunistic composition and patterns in the distribution of soft coral (*Octocorallia*, *Alcyonacea*) along the Coral Reefs of Sinai Peninsula. *Proceeding of the Fifth International Coral Reef Congress, Tahiti*, vol 6. 255-260.
- Branny, P., Pearson, J.P., Pesci, E.C., Kohler, T., Iglewski, B.H., & Delden, C.V. 2001. Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* *dsxA* homologue. *Journal of Bacteriology* 183(5): 1531-1539.
- Brauni, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W., & Tommassen J. 2001. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *The Journal of Biological Biochemistry* 276(28): 26030-26035.
- Coval, S.J. Patton, R.W., Petrin, J.M., James, L., Rothofsky, M.L., Lin, S.L., Patel, M., Reed, J.K., McPhail, A.T. & Bishop, W.R. 1996. A cembranolide

diterpene farnesyl protein transferase inhibitor from the marine soft coral *Lobophytum cristagalli*. *Bioorganic & medicinal Chemistry Letters* 6: 909-912.

- Davis, D.A., Brown, C.A., Singer, K.E., Wang, V., Kaufman, J., Sthal, S.J., Wingfield, P., Maeda, K., Harada, S., Yoshimura, K., Kosalaraksa, P., Mitsuya, H., & Yarchoan, R. 2006. Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Research* 72: 89-99.
- Duh, C.Y., Lu, I.W., Wang, S.K., & Dai, C.F. 2007. New cytotoxic steroids from the soft coral *Clavularia viridis*. *Steroids* 72: 573-579.
- Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 273: 16792-7.
- Feltzer, R.E., Trent, J.O., & Gray, R.D. 2000. Alkaline proteinase inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* 278(28): 25952-25957.
- Gubba S, Cipriano V, & Musser JM. 2000. Replacement of histidine 340 with alanine inactivates the group A *Sterptococcus* extracellular cysteine protease virulence factor. *Infect Immun* 68: 3716-3719.
- Hart, H. 1987. Kimia Organik. Suatu Kuliah Singkat. Achmadi S, penerjemah; Jakarta: Erlangga.
- Heat, H.B., & Reneccius, G. 1987. Flavour Chemistry and Technology. New York: Von Nostrand Reinhold.
- Hirono, M., Ojika, M., Minura, H., Nakanishi, Y., & Maeshima M. 2003. Acylsperimidine derivatives isolated from a soft coral, *Sinularia* sp, inhibit plant vacuolar H⁺-pyrophosphatase *J Biochem* 133(6): 811-816.
- Mahaza, N.S. 2003. Kajian kerusakan ekosistem terumbu karang akibat penangkapan ikan hias dan pengambilan bunga karang di kelurahan Pulau Panggang Kepulauan Seribu. Skripsi. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Manuputty, A.E.W. 2002. Karang Lunak (Soft Coral) Perairan Indonesia. Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta.
- Manuputty, A.E.W. 1996. Zooxanthelae pada Karang dan Hubungannya dengan Karakteristik Lingkungan Perairan di Terumbu Karang Pulau Pari, Pulau-pulau Seribu. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Nurhayati, T., Aryanti, D., & Nurjanah. 2009. Kajian Awal potensi ekstrak spons sebagai antioksidan. *Jurnal Kelautan Nasional*, Vol 2, Edisi Khusus Hal 43-51.
- Nurhayati, T., Suhartono, M.T., Nuraida, L., & Poerwanto S.B. 2006. Karakterisasi Awal Inhibitor Protease dari bakteri yang Berasosiasi dengan Spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Buletin Hayati*, 13(2): 58-64.
- Nurhayati, T., Suhartono, M.T., & Febrina, I. 2004. Penapisan Inhibitor Protease yang Dihasilkan oleh Spons Asal Kepulauan Seribu. *Buletin THP VII(2)*: 45-59
- Radhika, P. 2006. Chemical constituents and biological activities of the soft coral of genus *Cladiella*: A review. *Biochemical Systematics and Ecological* 34 : 781-789.
- Rashid, M., Gustafson, K.R., & Boyd, M.R. 2000. HIV-Inhibitory cembrane derivatives from a Philipines collection of the soft coral *Lobophytum* Species. *Journal Natural Product* 63: 531-533.
- Sata, N.U., Sugano, M., Matsunaga, S., & Fusetani, N. 1998. Sinulamide : an H,K-ATPase inhibitor from a soft coral *Sinularia* sp. *Tetrahedron Letters* 40: 719-722.
- Song KJ, & Nam HW. 2003. Protease activity of 80 kD protein secreted from the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The Korean J Parasit* 41:165-169.
- Suh, J.H., Lin, F.Y., Huang, H.C., Dai, C.F., Wu, Y.C., Hu, W.P., Hsu, C.H., & Sheu, J.H. 2006. Novel steroids from the soft coral *Nephthea chabrolii*. *Tetrahedron* 63: 703-707.
- Watanabe, K., Iwashima, M., & Iguchi, K. 1996. New bioactive marine steroids from the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*. *Steroids* 61: 439-446.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M.J., Cunliffe, H.E., Lamont, I.L., & Vasil, M.L. 2001. Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 69(9): 5385-5394.