

Aplikasi Mikrosimbiosis Spons Laut Sebagai Biomaterial Pereduksi Toksisitas Logam Berat Kromium

Ismail Marzuki^{1*}, M. Iksan Ashari², Andi Asdar Marzuki. M², Anggi Angela²

¹Chemical Engineering Program, Faculty of Engineering, University of Fajar, Makassar

²Chemical Engineering Students, Faculty of Engineering, University of Fajar, Makassar

*Email : ismailmz@unifa.ac.id

Received: March,01,2019/Accepted: June,25,2019

doi: 10.24252/al-kimia.v7i1.7388

Abstract: *The vulnerable marine environment is polluted by various types of heavy metals due to human and natural activities. One of the marine biota sponges can carry out heavy metal adsorption functions, so the life of the sponge must be well maintained. The application of sponge micro symbiont absorption method aims to reduce the toxicity of chromium metal. Absorption stage: culture isolates code Sp1, Sp2, Sp3, sponge of Petrosia (Strongylophore) Corticata symbionts, phenotypic and genotypic characterization, suspension symbionts were formed, interacted with 100 ppm of 1: 1 ratio chromium solution Interaction time variation 5, 10, 15, 20, 25 days, extracted. The remaining non-reduced chromium was analyzed using AAS. Observation of reduction, gas, pH, optical density parameters. The results of phenotypic characterization showed 3 sponge symbiont isolates reacted with lactose, catalase, MR, VP and citrate. Genotypes of Pseudomonas stutzeri isolates, strain Sp1 are RCH2, Sp2 code SLG510A3-8, and Sp3 code GLB197. The reduction parameters reached a contact period of 5-15 days, the performance of the symbionts in the reduction of chromium metal toxicity in the range of 62.34 ppm to 70.47 ppm was equivalent to the reduction rate of 60.16 to 69.09% concentration.*

Keywords: *chromium, microsymbionts, reduction, sponges, toxicity*

1. PENDAHULUAN

Spons merupakan salah satu kekayaan alam hayati laut, sering dijadikan bioindikator untuk menentukan status tingkat pencemaran logam berat di laut. Pola hidup spons yang *filter feeder*, menjadikan spons sebagai hewan unik yang memiliki banyak manfaat dan fungsi sekaligus potensial bersimbiosis mutualisme dengan berbagai macam mikroorganisme, seperti bakteri, fungi dan jamur (Netty et al., 2014). Keunikan lain yang melekat pada diri spons selain warna yang beragam adalah kemampuan menghasilkan suatu zat yang berperilaku seperti enzim, yang salah satu tujuannya adalah untuk perlindungan diri dari ancaman hewan predator dan mengisolasi diri akibat perubahan lingkungan yang ekstrim seperti adanya pencemaran logam berat, polisiklik aromatik hidrokarbon dan kekeruhan akibat kuatnya arus bawah laut (Marzuki et al., 2014; Ismet, et al., 2011).

Zat yang diproduksi oleh spons sebagai respon atas perubahan habitat lingkungan untuk kelangsungan hidup spons tersebut, diduga kuat berasal dari mikroorganisme yang bersarang dalam tubuh spons. Pengembangan ke arah aplikasi mikrosimbiosis sebagai biomaterial baru untuk mereduksi toksisitas logam berat adalah pikiran kritis saintis untuk tujuan pengembangan ilmu pengetahuan dan upaya penyelamatan lingkungan, (Parama et al., 2017; Alamri, 2012).

Pencemaran logam berat baik yang terjadi di darat, laut dan udara cukup rentan terjadi, mengingat sumber-sumber pencemar logam berat cukup banyak yang pada akhirnya sebagian besar dari zat pencemar, bermuara ke perairan seperti sungai, rawah, danau dan akhirnya masuk ke laut. Sumber pencemaran logam berat lainnya adalah transportasi laut, sampah plastik dan kegiatan industri termasuk aktivitas alam seperti gunung meletus, aliran lahar erupsi gunung. Beban pencemaran logam berat ini, akhirnya terakumulasi di laut. Keadaan ini menimbulkan efek berantai, dimana sumber daya yang berasal dari laut (ikan, rumput laut, dan biota lainnya) ikut terpapar logam

berat, sehingga berpotensi berdampak pada kesehatan manusia (Lydia et al., 2014). Kondisi ini menjadi masalah besar di masa datang yang membutuhkan penanganan sistematis untuk meminimalkan dan mengurangi peningkatan pencemaran logam berat di laut (Ismet et al., 2011).

Pengembangan dan aplikasi mikrosimbiosis spons dalam mereduksi toksisitas logam berat adalah salah satu upaya dalam penyelamatan lingkungan laut dan perlu dukungan sistematis dan terstruktur, komitmen kuat elemen masyarakat, kebijakan dan keberpihakan semua elemen umat manusia di muka bumi, termasuk perguruan tinggi pada ranah bidang ilmu terkait.

2. METODE PENELITIAN

Alat

PCR tipe *Applied Biosystem* (ABI) 9700 Thermal Cycler, Spectronik-20D+ Shimadzu, AAS tipe AA240FS Varians, Shaker, inkubator, set gelas, inkubator, laminary air flow, mikropipet, mortar, Ose bulat, oven, pinset, pipet, rak tabung, sendok tanduk, Spoit, tabung reaksi, timbangan analitik, deck glass, Erlenmeyer, handskun, lampu spiritus, lumpang, kertas indikator pH, koloni counter, korek api, masker, Mikroskop, Objek glass, penangas air.

Bahan

Set katalog uji biokimia standar 15 reagen spesifik, air laut steril, Media NA, marine agar (MA), 25% gliserol, formalin 4%, aqubides, ddH₂O, chelex 20%, sepasang urutan primer universal gen 16S rRNA *E. coli*: FP-U1 (5'- CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3 ') pada nukleotida 518-537, dan RP-U2(5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACT TC-3') nukleotida 1513-1491, DNA template, polimerase DNA Taq (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn), Campuran PCR, Triton X-100, Tris, EDTA, HCl, KCl, MgCl₂, parafin, tripofosfat deoxynucleoside, HCl p.a., Cr₂O₃ p.a., alkohol 96 %. Spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*. Spons diperoleh dari pantai Kodingareng Keke bagian dari Gugusan Kepulauan Spermonde, dengan titik sampling S= 050 06' 06.76" E= 1190 17' 10.66" W, salinitas 29,3 ‰, suhu 28 °C.

Prosedur Penelitian

Preparasi Sampel

Dilakukan karakterisasi fenotip dan genotip ketiga isolat spons, masing masing menggunakan metode uji biokimia dan PCR *applied biosystem*. Isolat terpilih di perbanyak dengan metode Kultur pada media Nutrient Agar, kemudian isolat diubah menjadi bentuk suspensi dengan menambahkan 2 ml NaCl 0.9 % fisiologis, dikocok. Masukkan suspensi kedalam Erlenmeyer 100 mL, di cukupkan volumenya dengan menggunakan NaCl 0.9 % fisiologis. Dipipet masing-masing 10 ml suspensi kedalam 5 buah pial, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam. Dimasukkan 5 ml larutan kromium [Cr(III)] 100 ppm. Masukkan kedalam sheaker inkubator dengan waktu kontak masing-masing (1; 5; 10; 15; 20; 25) hari untuk setiap pial. Sampel disaring menggunakan kertas saring whattman 41, diperoleh filtrat, diasamkan dengan asam klorida (pH 3-4), kemudian dipekatkan (Akinde et al., 2012).

Penetapan Kadar logam dalam Sampel dengan SSA.

Penentuan absorban larutan Cr (III), diukur menggunakan AAS pada pada λ_{maks} : 357,9. Penentuan konsentrasi Cr tidak tereduksi dengan memplot absorban ke dalam kurva kalibrasi deret 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm dan 50 ppm. Nilai absorban diperoleh masuk dalam rentang nilai

kurva kalibrasi larutan baku sehingga konsentrasi logam Cr (III) dalam sampel dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi (Marzuki, 2016)..

Karakterisasi

Analisis Fenotip

Metode uji biokimia dipilih sebagai dasar dalam analisis fenotip isolat spons, bertujuan meloihat kecenderungan reaksi terhadap beberapa reagen spesifik dalam uji biokimia.

Penentuan Spesies dan strain Mikrosimbion Spons dengan metode Reaksi Berantai polimerase (PCR)

Metode biologi molekuler digunakan untuk membuat salinan dari segmen dari sekuens DNA isolat spons secara eksponensial diperkuat untuk menghasilkan ribuan hingga jutaan salinan segmen DNA isolat untuk menentukan species dan karakter (strain) isolat (genotip). Tipe PCR yang digunakan adalah Applied Biosystem (ABI) 9700 Thermal Cycler (Marzuki, *et al.*, 2015).

Penentuan Kerapatan Optik Media Interaksi dengan Spektrofotometri (Spectronic-20D⁺)

Penentuan kerapatan optik media reduksi kromium oleh suspensi simbion diukur setiap 5 hari masa kontak. Kerapatan optik merupakan salah satu parameter terjadinya reduksi logam kromium oleh simbion spons. Spectronic-20D⁺ Shimadzu λ : 400-700 nm

Analisis Tingkat Reduksi Kromium dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)

Analisis konsentrasi kromium yang tidak tereduksi menggunakan SSA dilakukan setelah masa kontak tercapai. Dasar penentuan konsentrasi berdasarkan absorban yang terukur menggunakan SSA tipe AA240FS Varians sesuai lampu katoda pada λ : 357,9 nm

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Mikrosimbion Spons

Isolasi spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* dengan metode gores atau *streak plate* (kultur) dihasilkan tiga (3) macam isolat kode Sp1, Sp2, dan Sp3, dengan ciri-ciri seperti dalam Tabel 1, berikut:

Tabel 1. Hasil Isolasi dan Pewarnaan Gram Simbion Spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*

Kode Simbion	Morfologi Isolat	Keterangan
Sp1	bentuk bulat, warna krem kebiruan, penyebaran bergerombol, bentuk batang, warna tetap dengan safranin, endospora kurang jelas, tidak larut dengan alkali 1% KOH	Gram positif
Sp2	bentuk batang bergerigi, warna coklat, penyebaran terpisah warna tetap dengan reagent safranin, ada endospora, tidak larut dengan alkali 1 % KOH	Gram positif
Sp3	bentuk bulat, warna coklat, penyebaran terpisah, warna berubah dengan reagent safranin, tidak ada endospora, larut dengan alkali 1 % KOH	Gram negatif

Tiga simbion hasil isolasi spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*, 2 (dua) diantaranya (Sp1 dan Sp2) merupakan simbion golongan gram positif, ditentukan berdasarkan reaksi dengan safranin yang tidak berubah warna dan tidak larut dengan reaksi 1 % KOH, sedangkan simbion Sp3 merupakan kelompok gram negative (Marzuki et al., 2016).

Analisis Fenotip Mikrosimbion Spons

Prinsip analisis fenotip mikrosimbion adalah reaksi simbion dengan reagen spesifik untuk melihat sifat asam-basa simbion, ketersediaan enzim dan kemampuan melakukan fermentasi serta dapat memberi respons terhadap perubahan lingkungan yang terjadi, misalnya pencemaran logam berat. Karakteristik fenotip simbion spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* dapat dilihat pada Tabel 2, berikut:

Tabel 2. Analisis Fenotip Simbion Spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*

No	Kode	Simbion Spons <i>Petrosia (Strongylophore) Corticata</i>		
		Sp1	Sp2	Sp3
1	Slant	basa	basa	basa
2	TSIA	Butt	asam	Asam
3		H ₂ S	-	-
4		Gas	-	-
5		Indol	-	-
6	SIM	Motirety	-	-
7		H ₂ S	-	-
8	MR/VP	MR	+	+
9		VP	-	-
10		Sitrat	+	-
11		Urea	-	-
12	Glukosa	-	-	-
13	Laktose	+	+	+
14	Sukrose	-	-	-
15	Mannitol	-	-	-
16	Katalase	+	+	+

Hasil analisis fenotip tiga macam simbion memperlihatkan reaksi positif terhadap reagen Metil merah (MR) menunjukkan simbion dapat melakukan aktivitas fermentasi, dan hasil reaksi fermentasi yang dihasilkan bersifat asam. Reaksi dengan reagen Voges-Proskauer (VP) hasil positif ditunjukkan oleh Sp2, berarti bahwa simbion tersebut mampu melaksanakan reaksi fermentasi. Pada reaksi dengan reagen katalase, ketiga jenis isolat simbion spons, menunjukkan hasil positif, berarti bahwa simbion tersebut dalam aktivitasnya memerlukan hydrogen dan menghasilkan gas H₂O₂ yang potensial sebagai racun pada dirinya sendiri. Terlihat pula reaksi positif dengan laktosa yang menunjukkan bahwa jenis simbion spons ini, dapat melakukan reaksi pemecahan karbohidrat menjadi gula sederhana dan juga hasil reaksi positif dengan reagen sitrat ditunjukkan oleh sampel Sp1, menunjukkan bahwa simbion ini mampu melakukan reaksi fermentasi dengan menggunakan karbon sebagai sumber energy (Liu et al., 2017; Marzuki et al., 2016).

Analisis Genotip Mikrosimbion Spons

Karakterisasi molekul gen 16S rRNA mikrosimbion *Petrosia (Strongylophore) Corticata* dilakukan dengan mengidentifikasi urutan pasangan molekul gen DNA melalui metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Hasil sekuensing molekul gen DNA yang diperoleh berupa data bentuk

kromatogram, selanjutnya molekul gen tersebut diurutkan dan dibentangkan untuk melihat deret homolog Genbank. Kromatogram yang diperoleh, diproses menggunakan perangkat *software* program *BioEdit* versi 7.2.5. Data yang telah diolah oleh program *BioEdit* digunakan sebagai data dasar untuk diolah kembali pada *multiple alignment* (pensejajaran berganda) urutan molekul gen isolat terhadap molekul DNA *database* yang ada pada *GenBank*. Molekul gen 16S rRNA bersifat universal pada bakteri, secara umum dapat diperbandingkan dengan urutan RNA sampel (Liu et al., 2017; Marzuki et al., 2016).

Hasil sekuensing isolat dibuka melalui program bioedit, kemudian sekuen DNA bakteri sampel dimasukkan ke program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), sekuen diidentifikasi dengan database DNA *GenBank* pada situs tersebut. Hasil pensejajaran sekuen sampel dengan sekuen *GenBank* untuk tiga jenis isolat simbiosis spons, menunjukkan kesamaan deret homolog yang tinggi, dapat dilihat pada Tabel 3, berikut:

Tabel 3. Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Simbiosis Spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*

No	Kode Simbiosis	Sekuen Sampel	Sekuen <i>GenBank</i>	Identitas	Perbedaan	Non DNA	Spesies
1	Sp1	17-972	608.723-609.890 (955)	934/955 (97,80%)	4/955 (0,42%)	17/955 (1,78%)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> RCH2
2	Sp2	11-985	524.589-525.563 (974)	927/974 (95,17%)	17/974 (1,75%)	30/974 (3,08%)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8
3	Sp3	21-935	574.123-575.079 (956)	922/956 (96,44%)	6/956 (0,63%)	28/956 (2,93%)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain GLB197

Hasil akhir dari analisis genotip adalah diketahuinya spesies simbiosis spons dan strainnya yang merupakan karakter atau sifat spesifik mikrosimbiosis ditentukan berdasarkan kesesuaian deret homolog sekuen sampel dengan sekuen *GenBank*. Spesies tiga simbiosis spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* yang dianalisis adalah golongan *Pseudomonas*, artinya secara umum memiliki sifat relative sama, meskipun ada karakter khusus yang dimiliki ketiga simbiosis tersebut sebagai penciri dan merupakan pembeda ketiganya dalam aktivitas dan mekanisme reaksi yang akan ditempu. Perbedaan ini dapat dilihat pada perbedaan strain masing-masing simbiosis (Liu et al., 2017).

Parameter Reduksi Logam Berat

Secara umum semua aktivitas mikroorganisme yang terjadi, berdasarkan reaksi fermentasi, meskipun mekanisme yang ditempu dapat berbeda-beda, disebabkan oleh perbedaan fenotip dan genotip serta strain simbiosis. Parameter reaksi fermentasi mikroorganisme, termasuk aktivitas dalam mereduksi toksisitas logam berat Kromium dapat dilihat pada Tabel 4, berikut:

Tabel 4. Nilai Parameter Reduksi Logam Berat Cr (III) Berdasarkan Waktu Kontak

No	Kode Simbiosis	Parameter Reduksi	Waktu kontak (hari)					
			0	5	10	15	20	25
1	Sp1	pH	7	6	7	7	7	7
		Gel. gas	-	√	√	-	-	-
		Optical Density (OD)	0.008	0.039	0.078	0.082	0.086	0.087
2	Sp2	pH	7	6	6	7	7	7
		Gel. gas	-	√	√	-	-	-

		Optical Density (OD)	0.007	0.041	0.081	0.087	0.093	0.101
		pH	7	6	7	7	7	7
3	Sp3	Gel. gas	-	√	√	-	-	-
		Optical Density (OD)	0.007	0.052	0.090	0.093	0.096	0.097

Nilai parameter reduksi kromium oleh simbiosis spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*, menggambarkan bahwa aktivitas reduksi toksisitas logam berat kromium maksimum terjadi pada 5-10 hari masa kontak. Parameter penurunan nilai pH, terbentuknya gelembung gas dan peningkatan kerapatan optik merupakan bukti bahwa terjadi aktivitas reaksi fermentasi simbiosis spons untuk mereduksi toksisitas logam berat Kromium pada masa kontak 5 – 10 hari (Ziarati et al., 2018; Shama et al., 2010).

Kinerja Reduksi Logam Berat Kromium oleh Simbiosis Spons

Penurunan konsentrasi logam kromium setelah terjadi kontak suspensi simbiosis spons dimaknai dengan melemahnya toksisitas logam tersebut sebagai hasil kerja simbiosis spons. Kinerja simbiosis spons menurunkan konsentrasi Kromium berdasarkan masa kontak dalam haridapat dilihat pada Tabel 5, berikut:

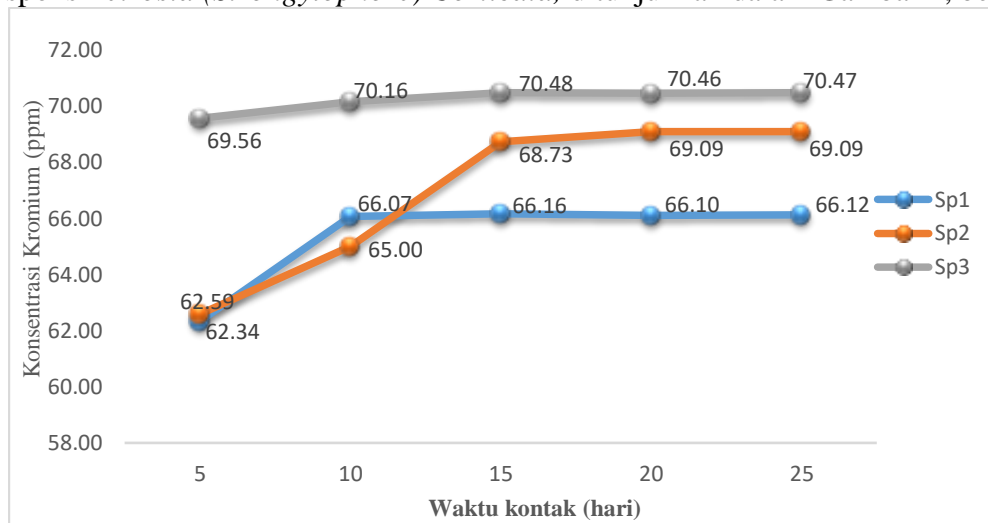
Tabel 5. Kinerja Reduksi Konsentrasi Logam Berat Cr (III) oleh Simbiosis Spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* Berdasarkan Waktu Kontak

No	Kode Simbiosis	Waktu Kontak (hari)	Rata-rata Absorban	Rata-rata Kadar Cr (III) (ppm)	Persen (%) Penyerapan
		0 (awal)	0.1171	102.03	-
		5	0.0603	39.69	61.10
1	Sp1	10	0.0547	35.96	64.76
		15	0.0543	35.87	64.65
		20	0.0542	35.93	64.48
		25	0.0543	35.91	64.46
		0 (awal)	0.1181	104.04	-
		5	0.063	41.45	60.16
2	Sp2	10	0.0593	39.04	62.48
		15	0.0537	35.31	66.06
		20	0.0532	34.95	66.41
		25	0.0533	34.95	66.41
		0 (awal)	0.1170	102.02	-
		5	0.0493	32.46	68.18
3	Sp3	10	0.0487	31.86	68.77
		15	0.0482	31.54	69.08
		20	0.0483	31.56	69.10
		25	0.0482	31.55	69.09

Gambaran nilai penurunan konsentrasi kromium sesuai Tabel 5, absorpsi sel simbiosis menempu mekanisme reaksi fermentasi. Penurunan konsentrasi kromium terjadi signifikan pada masa kontak 5 – 10 hari. Penurunan konsentrasi landai setelah masa kontak hari ke 10, terus terjadi hingga stagnan setelah masa kontak mencapai 15 – 25 hari. Kinerja simbiosis spons *Petrosia*

(*Strongylophore*) *Corticata* mereduksi toksin logam kromium signifikan terjadi pada masa kontak 5-10 hari (Tabel 5). Hasil ini sesuai dengan perkiraan awal didasarkan data pada data Tabel 2 (karakteristik fenotip) dan Tabel 4 (parameter reduksi). Reduksi toksisitas logam kromium oleh simbiosis spons terhenti setelah masa kontak 15 hari disebabkan oleh beberapa faktor: 1) salah satu produk reduksi adalah H_2O_2 yang merupakan racun bagi simbiosis, sehingga sel-sel tidak dapat membelah diri bahkan mati, 2) penurunan pH media reduksi yang tidak sesuai dengan kondisi kebutuhan sel simbiosis untuk membela diri. Hasil ini juga sesuai dengan kesimpulan penelitian yang telah dilakukan oleh Zhou et al., 2017.

Tingkat penurunan konsentrasi Kromium setelah masa interaksi dengan suspensi tiga jenis isolat spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata*, ditunjukkan dalam Gambar 1, berikut:



Gambar 1. Tingkat Serapan Kromium oleh Simbiosis Spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* Berdasarkan Waktu Kontak

Gambar 1, di atas memberi petunjuk bahwa kinerja tiga jenis isolat simbiosis spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* dalam mereduksi toksisitas logam kromium maksimal terjadi pada range masa kontak 5–10 hari, tertinggi ditunjukkan oleh kinerja isolat *Pseudomonas stutzeri* strain GLB197 (Sp3) mencapai 68,77 % dicapai pada masa kontak 10 hari, disusul oleh kinerja isolat *Pseudomonas stutzeri* RCH2 (Sp1) mencapai 64,76 %, juga dicapai pada masa kontak 10 hari dan berikutnya oleh isolat *Pseudomonas stutzeri* strain SLG510A3-8 (Sp2) dengan nilai reduksi mencapai 66,04 % yang dalam hal ini memiliki persen lebih tinggi dibanding isolat Sp1, namun nilai ini dicapai setelah masa kontak 15 hari, sehingga disimpulkan bahwa kinerja isolat Sp1 masih lebih baik dalam mereduksi toksisitas logam kromium dibandingkan isolat Sp2. Diketahui bahwa 5–10 hari sel mikroorganisme masih berada pada fase pertumbuhan dan pembelahan sel seharusnya masih terjadi, namun kondisi ini tidak berjalan karena terhambat oleh produk reduksi logam oleh simbiosis dan menghambat kinerja sel simbiosis melakukan reaksi fermentasi lebih lanjut. Absorpsi logam kromium oleh enzim yang dimiliki simbiosis spons *Petrosia* melalui jalur reaksi fermentasi. Salah satu produk reaksi adalah gas racun peroksida, mengakibatkan pertumbuhan sel-sel simbiosis terhambat dan akhirnya mati (Vaezzadeh et al., 2017; Pawar et al., 2017).

4. PENUTUP

Simbion spons *Petrosia (Strongylophore) Corticata* dapat mereduksi toksisitas logam berat kromium dalam range 62,34 ppm - 70,47 ppm, dicapai pada masa kontak 5-25 hari. Kinerja signifikan simbion spons dalam mereduksi toksisitas logam kromium terjadi pada masa kontak 5-10 hari. Urutan kinerja isolat simbion spons *Petrosia* dalam mereduksi logam toksisitas kromium adalah $Sp_3 > Sp_1 \geq Sp_2$. Dalam memilih simbion spons potensial sebagai biomaterial pereduksi toksisitas logam berat dapat ditentukan berdasarkan karakteristik fenotip simbion.

Ucapan Selamat

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kemenristekdikti, yang telah memberikan pendanaan dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Akinde, S.B., Iwuzor, C.C. and Obire, Omokaro, (2012). Alkane degradative potentials of bacteria isolat from the deep atlantic ocean of the Gulf of Guinea. *Journal Bioremed Biodegradation*, vol. 3 (1): 2-6
- Alamri, A. Saad, (2012). Biodegradation of microcystin-RR by *Bacillus flexus* isolated from a Saudi freshwater lake. *Published online- doi:10.1016/j.sjbs.2012.06.006*. *Saudi Journal Biol Sci*, vol. 19 (4): 435-440
- Ismet, S.M., Soedharma, D., Effendi, H., (2011). Morphology and cell biomass of sponge *Aaptos aaptos* and *Petrosia* sp., *J. Ilmu Tek.Kelautan Tropis*. vol. 3 (2): 153-161
- Lydia, M., Alfian, N., Tjodi, H., Nicole, de, V., (2014). Essential Metal Zn in Sponge *Callyspongia aerizusa* from Spermonde Archipelago, *Advances in Biological Chemistry Journal*, vol. 4: 86-90, <http://dx.doi.org/10.4236/abc.2014.41012>
- Marzuk, I., A. Noor, N. La Nafie, and Djide. N.M., (2015). Molecular Characterization Of Gene 16S rRNA Microsymbionts In Sponge At Melawai Beach, East Kalimantan,” *Marina Chimica. Acta*, vol. 16 (1): 38–46, doi: [10.17605/OSF.IO/XKP9B](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/XKP9B)
- Marzuki, I., (2016). Analisis Kromium Heksavalen dan Nikel Terlarut dalam Limbah Cair Area Pertambangan PT. Vale Tbl, Soroako-Indonesia. *Chemica*, vol. 17 (2): 1–11. <http://doi.org/view/4679/2685>.
- Marzuki, I., Noor, A., Djide, N.M., La Nafie, N., (2014). *Isolation and Identification on Degradator Bacterial of Petroleum waste which Symbionts with Sponge Callyspongis sp from Melawai Beach*. Proceeding: International Conference on the sciences (ICOS), 19-20 Nopember 2014, Makassar, ISBN: 9786027219809, vol. 1: 493-503, doi: [10.17605/OSF.IO/PZVKC](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/PZVKC).
- Marzuki, I., A. Noor, N. La Nafie, and Djide, N. M., (2015). The Potential Biodegradation Hydrocarbons Of Petroleum Sludge Waste By Cell Biomass Sponge *Callyspongia* sp.,” *Marina. Chimica. Acta*, vol. 16 (2): 11–20, doi: [10.17605/OSF.IO/RCNDW](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/RCNDW)
- Marzuki, I., Noor, A., Djide, N.M., La Nafie, N., (2016). Microsymbiont and Morphological Phenotype Analysis Marine Sponge Biomass from Melawai Beach, Balikpapan, East Kalimantan, *Journal Marina Chimica Acta*, vol. 17 (1): 8-15;, doi: [10.17605/OSF.IO/P73EN](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/P73EN)
- Murniasih. T., dan Rasyid, A., (2010). Potensi bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Barrang Lompo-Makassar sebagai sumber bahan anti bakteri, *Jurnal Oseanologi dan Limnologi*, vol. 36 (3): 281-292
- Netty,S., Alfian, N., Nunuk, S., Nicole, de, V., (2014). A preliminary Effort to assign Sponge (*Callyspongia* sp) as trace metal biomonitor for Pb, Cd, Zn, and Cr, an environmental perspective in hative gulf water Ambon, *Advances in Biological Chemistry Journal*, vol. 3: 549-552, <http://dx.doi.org/10.4236/abc.2013.26062>
- P. R. Pawar and A. R. M. S. Al-Tawaha, (2017). Marine sponges as Bioindicator species of Environmental Stress at Uran (Navi Mumbai), west coast of India,” *Am. J. Sustain. Agric.*, vol. 11 (3): 29–37

- P. Ziarati, S. Namvar, and B. Sawicka, (2018). The Heavy Metals Bio-Adsorption By Hibiscus Sabdarifal from Contaminated Water, *Technog. Ecol. Saf.*, vol. 4 (4): 22–32
- Shama. S.A., M.E. Moustafa, M.A. Gad, (2010). Removal of heavy metals Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} and Cd^{2+} From Aqueous Solutions by Using Eichornia Crassipes, *Journal Electrochimica Acta*, vol. 28 (2) :125-133
- V. Vaezzadeh, M. P. Zakaria, C. W. Bong, N. Masood, S. Mohsen Magam, and S. Alkhadher, (2017). Mangrove Oyster (*Crassostrea belcheri*) as a Biomonitor Species for Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Sediment of the West Coast of Peninsular Malaysia,” *Polycycl. Aromat. Compd.*, vol. 6638 (August): 1–16
- Y. F. Liu, S. M. Mbadinga, J. D. Gu, and B. Z. Mu, (2017). Type II chaperonin gene as a complementary barcode for 16S rRNA gene in study of Archaea diversity of petroleum reservoirs,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 123, (December): 113–120.
- Y. Parama Cita, F. Kamal Muzaki, O. K. Radjasa, and P. Sudarmono, (2017). Screening of Antimicrobial Activity of Sponges Extract from Pasir Putih, East Java (Indonesia),” *J. Mar. Sci. Res. Dev.*, vol. 7 (5): 1–5
- Zhou, Y., Xia, S., Zhang, Z., Zhang, J., & Hermanowicz, S. W. (2011). Associated Adsorption Characteristics of Pb (II) and Zn (II) by a Novel Biosorbent Extracted from Waste-Activated Sludge. *Environ. Eng.*, vol. (li), 1–7. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001104](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001104).
- Ziarati, P., Moshiri, I. M., & Sadeghi, P. (2017). Bio-adsorption of Heavy Metals from Aqueous Solutions by Natural and Modified non-living Roots of Wild *Scorzonera incisa* DC. *Sci Discov*, vol. 1 (99): 1–8. <https://doi.org/10.24262/jsd.1.1.17010>