

ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR KIMIA ANTIMIKROBA YANG DIHASILKAN OLEH AKTINOMISETES LAUT

Rofiq Sunaryanto^{*)}, Bambang Marwoto^{*)}, Tun Tedja Irawadi^{**)},
Zainal Alim Mas'ud^{**)}, dan Liesbetini Hartoto^{**)}

ABSTRAK

Isolasi senyawa aktif dari aktinomisetes laut yang memiliki aktivitas antimikroba telah dilakukan. Isolasi aktinomisetes dilakukan dengan pengenceran dan praperlakuan sampel dengan cara pemanasan dan pengasaman. Sampel diambil dari sedimen laut di 6 titik lokasi Pantai Anyer, Banten. Dari total 29 isolat yang diperoleh, isolat A32 merupakan isolat terpilih untuk penelitian lebih lanjut. Isolat A32 memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC25923 dan *Candida albican* BIOMCC00122. Elusidasi struktur kimia menggunakan ESI-LCMS, ¹HNMR, dan COSY menunjukkan bahwa senyawa aktif tersebut memiliki bobot molekul 501,2 g/mol dan rumus molekul C₂₆H₃₅N₃O₇. Diduga senyawa ini termasuk dalam golongan makrolakton virginiamycin yaitu Madumycin I.

ABSTRACT: *Isolation and chemical structure elucidation of antimicrobial compound produced by marine actinomycetes. By: Rofiq Sunaryanto, Bambang Marwoto, Tun Tedja Irawadi, Zainal Alim Mas'ud and Liesbetini Hartoto*

*Isolation and elucidation of active compound produced by marine actinomycetes have been conducted. Isolation of actinomycetes was carried out by dilution and pre-treatment methods using acid and heat shock treatments. Samples were taken from sediment of coast in six locations in Anyer Coast, Banten. From 29 isolates, isolate A32 was selected for further study. It was shown that A32 isolate had antimicrobial activity to **Staphylococcus aureus** ATCC25923 and **Candida albican** BIOMCC00122. Chemical structure elucidation using ESI-LCMS, ¹HNMR and COSY showed that molecular weight (MW) of active compound was 501.2 g/mol and the chemical formula was C₂₆H₃₅N₃O₇. It was presumed that this active compound was a type of macrolactone virginiamycin, i.e. Madumycin I.*

KEYWORDS: *isolation, elucidation, marine actinomycetes, antimicrobial*

PENDAHULUAN

Aktinomisetes merupakan kelompok mikroba penghasil antibiotik terbanyak. Sekitar 70% antibiotik yang telah ditemukan, dihasilkan oleh aktinomisetes, khususnya dari genus *Streptomyces* (Okami & Hotta, 1988). Dewasa ini, penemuan-penemuan senyawa aktif baru dari aktinomisetes tanah telah mengalami penurunan dari tahun ke tahun. Banyak peneliti yang mulai mengalihkan perhatiannya kepada aktinomisetes laut. Meskipun penelitian mengenai eksplorasi senyawa aktif dari aktinomisetes laut belum banyak dilakukan, akan tetapi sejumlah senyawa aktif baru dihasilkan oleh aktinomisetes laut seperti *Caprolactones*, *Chandrananimycins*, *Chinikomycins*, *Chloro-dihydroquinones*, *Frigocyclinone*, *Gutingimycin*, dan *Marinomycins* (Lam, 2006). Beberapa contoh antibiotik yang dihasilkan oleh aktinomisetes laut antara lain *Abyssomycin C* yang merupakan antibiotik polisiklik poliketida dari aktinomisetes laut strain *Verrucospora* (Riegdlinger *et al.*, 2004). *Abyssomycin C* dilaporkan memiliki aktivitas

penghambat pertumbuhan bakteri gram positif. *Diazepinomicin* yang dihasilkan oleh strain micromonospora laut juga memiliki aktivitas antibakteri, antiperadangan, dan antitumor (Charan *et al.*, 2004). *Salinosporamide A* merupakan senyawa *lactone-g-lactam* yang diisolasi dari aktinomisetes laut *Salinispora tropica* (Feling *et al.*, 2003).

Menurut Fenical & Paul (2006), luas lautan di seluruh permukaan bumi ini mencapai kurang lebih 70%, sehingga dapat dibayangkan begitu besar biodiversitas hayati yang ada di laut. Rata-rata jumlah mikroba yang ada di air laut mencapai 10⁶ sel/mL, dan 10⁹ sel/g yang hidup di sedimen laut.

Sebagian besar aktinomisetes laut yang telah berhasil diisolasi dan dipublikasikan dalam beberapa literatur berasal dari sedimen laut, sebagai contoh salinispora yang menghasilkan *Cyanosporasides A* dan B, marinispora yang mampu menghasilkan anti tumor marinomycines A–D (William *et al.*, 2005; Ward & Naganami, 2006). Aktinomisetes laut telah banyak memberikan kontribusi terhadap pengembangan obat

^{*)} Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Kawasan PUSPIPEK Serpong Tangerang Banten; E-mail: rofiqsn@yahoo.com

^{**)} Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor Kampus Darmaga Kabupaten Bogor Jawa Barat

baru. Seperti diketahui metabolit sekunder termasuk di dalamnya antibiotik diproduksi oleh mikroorganisme yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Diversitas laut yang sangat bervariasi banyak memberikan peran terhadap jenis antibiotik yang dihasilkan (Jensen *et al.*, 2005).

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki bentangan laut yang sangat luas, yaitu kurang lebih 3,1 juta km² atau hampir 2 kali lipat dibandingkan luas daratannya. Karakteristik laut yang bermacam-macam mengindikasikan biodiversitas hayati yang sangat besar, khususnya biodiversitas mikroorganisme laut. Namun demikian potensi ini belum banyak dimanfaatkan. Di Indonesia penelitian mengenai isolasi aktinomisetes laut penghasil antibiotik belum banyak dilakukan. Selama ini eksplorasi aktinomisetes di Indonesia masih sebatas aktinomisetes tanah. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa aktif yang memiliki aktifitas antimikroba dan mendapatkan struktur kimia senyawa aktif yang dihasilkan oleh aktinomisetes laut.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel

Sampel berupa sedimen laut diperoleh dari enam titik lokasi di pantai Anyer Provinsi Banten. Dari setiap titik lokasi diambil 6 sampel, masing-masing diambil sebanyak 5 gram yang diambil dari kedalaman rata-rata 20-50 cm dari permukaan air laut. Masing-masing sampel ditempatkan pada *falcon tube* 15 mL dan ditutup rapat. Sampel disimpan dalam ruang dingin (suhu 4°C) sebelum dilakukan proses isolasi.

Isolasi Aktinomisetes Laut

Sebanyak 1 g padatan sampel dipisahkan air lautnya dengan cara dekantasi. Empat mL *deionized water* ditambahkan ke dalam sampel tersebut, diaduk selama 10 menit dan didiamkan sampai suspensi mengendap. Sebanyak 1 mL cairan sampel diambil dan diencerkan dengan *deionized water* sebanyak 4 mL, untuk dilakukan proses praperlakuan dengan cara panas. Praperlakuan dengan cara panas dilakukan dengan mengacu pada metode Pisano *et al.* (1986) yang dimodifikasi, yaitu dengan memanaskan 4 mL cairan sampel pada suhu 65°C selama 60 menit. Praperlakuan terhadap endapan sampel dilakukan dengan cara pengasaman (1 g endapan sampel dalam larutan asam klorida pada pH 2 selama 2 jam). Setelah dinetralkan, padatan sampel dicuci dengan air steril dengan cara menambahkan empat mL air steril ke dalam sampel tersebut dan mengaduknya selama 10 menit serta mendinginkan sampai suspensi mengendap. Sebanyak 1 mL cairan diambil dan diencerkan dengan *deionized water* sebanyak 4 mL.

Cairan sampel selanjutnya diencerkan secara seri dari 10⁻¹ sampai dengan 10⁻⁵ menggunakan *deionized water*. Selanjutnya 0,1 mL cairan sampel yang telah diencerkan disebarkan pada permukaan agar media isolasi. Komposisi media agar untuk isolasi adalah sebagai berikut: 10 g *soluble starch*, 2 g pepton, 4 g *yeast extract*, dan 16 g agar dalam 1000 mL air laut. Medium tersebut kemudian ditambahkan beberapa jenis antibiotik yaitu 100 mg/mL *cycloheximide*, 25 mg/mL nistatin, 100 mg/mL *nalidic acid*, dan 5 mg/mL rifampin untuk menekan pertumbuhan bakteri dan jamur kontaminan. Antibiotik ditambahkan setelah medium agar disterilisasi.

Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 21 hari. Koloni aktinomisetes yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke dalam medium agar yang baru dengan menggunakan *marine* agar. Pemindehan dilakukan sampai diperoleh koloni tunggal.

Persiapan Produksi Ekstrak dengan Cara Fermentasi

Koloni yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada medium *broth* YEME selama 2 hari pada suhu 30°C, dan ditransfer ke medium fermentasi dengan komposisi medium Bacto peptone 15 g/L, *yeast extract* 3 g/L, *Fe citrate* n H₂O 0,3 g/L, *deionized water* 250 mL, dan air laut 750 mL, pH diatur pada 7,6. Fermentasi dilakukan selama 5 hari dengan inkubasi pada suhu 30°C. Volume kerja proses fermentasi adalah 1000 mL dalam flask 2000 mL. Proses *scale up* masal pada percobaan ini sebanyak 10 L, hanya dilakukan untuk isolat terpilih.

Uji Aktivitas Antimikroba (*bioassay*)

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan mikroba uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus subtilis* ATCC 66923, *Candida albican* BIOMCC00122 dan *Aspergillus niger* BIOMCC00134.

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus subtilis* ATCC 66923 ditumbuhkan pada media *nutrient* agar sedangkan *Candida albican* BIOMCC00122 dan *Aspergillus niger* BIOMCC00134 ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar*. Keduanya dilakukan dengan *pour plate methods*.

Sebanyak 15 mL ekstrak sampel diteteskan dalam kertas cakram berukuran 6 mm, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di dalam laminer, selanjutnya kertas cakram diletakkan pada permukaan agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 24 jam.

Diameter zona bening yang terbentuk menunjukkan besarnya aktivitas antimikroba (Morello *et al.*, 2002). Isolat yang mempunyai aktivitas antimikroba tertinggi digunakan pada fermentasi skala besar (10 L) untuk menghasilkan bahan aktif yang akan diuji.

Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Aktif dari Broth Fermentasi

Biomasa dan *broth* fermentasi dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 14300 x g selama 15 menit. Sepuluh liter supernatan yang berwarna coklat tua diekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan etil asetat : air (1:1). Selanjutnya fasa etil asetat dipisahkan dengan menggunakan corong pisah dan fasa air diekstraksi kembali dengan etil asetat dengan perbandingan volume yang sama.

Kedua ekstrak etil asetat digabungkan dan dipekatkan dalam kondisi vakum.

Ekstrak yang sudah dipekatkan selanjutnya difraksinasi menggunakan kolom kromatografi, menggunakan fasa diam silika gel 60 (0,063-0,200mm) Merck dan fasa gerak yang digunakan adalah campuran metanol-kloroform, dengan gradien 0-100% kloroform/metanol. Sebanyak 30 fraksi dikumpulkan dan diuji aktivitas antimikrobanya.

Fraksi aktif dimurnikan kembali menggunakan HPLC Water 2695, dengan detektor *Photodiode Detector Array* (PDA), *Water Column Puresil 5m C18*, volume injeksi 100 uL/injeksi dengan kecepatan alir 1 mL/menit, tekanan kolom 1267 psi. Semua fraksi hasil pemurnian dengan HPLC dikumpulkan dan diuji aktivitas antimikrobanya. Fraksi aktif murni

Tabel 1. Hasil isolasi aktinomisetes dan uji aktivitas antimikroba
Table 1. Result of actinomycetes isolation and their antimicrobial activity assay

No	Nama Isolat/ Name of Isolate	Praperlakuan Sampel/Sample Pretreatment	Aktivitas Antimikroba/Antimicrobial Activity (diameter zona bening dalam mm)/(clear zone diameter in mm)					
			<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albican</i>	<i>A.niger</i>
1	A61	HS	0	0	0	0	0	0
2	A62	HS	0	0	0	0	0	0
3	A63	HS	0	0	0	0	0	0
4	A64	HS	0	0	0	0	0	15
5	A65	HS	0	0	0	0	0	0
6	A66	HS	0	0	0	0	0	0
7	A67	A	0	0	0	0	0	0
8	A68	A	0	0	0	0	0	0
9	A69	A	0	0	0	0	0	0
10	A610	A	0	12	0	0	0	0
11	A611	A	0	0	0	0	0	0
12	A11	HS	18	15	14	14	0	0
13	A12	HS	0	0	0	0	0	0
14	A21	HS	0	0	0	7	0	9
15	A23	A	0	0	0	0	0	0
16	A24	A	0	0	0	0	0	0
17	A31	HS	0	0	0	0	0	0
18	A32	HS	0	12	0	0	7	0
19	A33	HS	0	0	0	0	0	0
20	A41	HS	0	0	0	0	0	0
21	A42	HS	0	0	0	0	0	0
22	A43	A	10.16	0	8.67	9.51	0	0
23	A44	A	0	0	0	0	10.61	0
24	A45	A	0	0	0	0	0	0
25	A51	HS	0	0	0	0	0	0
26	A52	HS	0	0	0	0	0	0
27	A53	HS	0	0	0	0	0	0
28	A54	HS	0	8.56	0	0	8.67	0
29	A56	A	0	0	0	0	0	0

Keterangan/Note: HS : Heatshock treatment
A : Acid treatmeant
Diameter kertas cakram / diameter of paper disc: 6 mm

dikumpulkan dan ditentukan bobot dan struktur molekulnya menggunakan ESI-LCMS, ¹HNMR, dan COSY.

Elusidasi Struktur Kimia Senyawa Aktif

Bobot molekul dan rumus molekul senyawa aktif ditentukan dengan Spectrum ESI-LCMS Jeol JMS-SX102A. Struktur molekul senyawa ditentukan dengan COSY dan ¹HNMR R (Varian UNITY INOVA 750) dan dibandingkan dengan data literatur.

HASIL DAN BAHASAN

Dari 36 sampel sedimen laut yang diambil dari 6 titik lokasi di pantai Anyer Provinsi Banten, diperoleh 29 isolat aktinomisetes, yang kemudian diuji aktivitas antimikrobanya. Dari hasil uji tersebut diperoleh 2 isolat yang mampu menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922, 4 isolat mampu menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC25923, 2 isolat mampu menghambat *Bacillus subtilis* ATCC 66923, 3 isolat mampu menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, 3 isolat mampu menghambat *Candida albican* BIOMCC00122, dan 2 isolat mampu menghambat *Aspergillus niger* BIOMCC00134. Hasil isolasi aktinomisetes dan uji aktivitas antimikroba selengkapnya disajikan dalam Tabel 1.

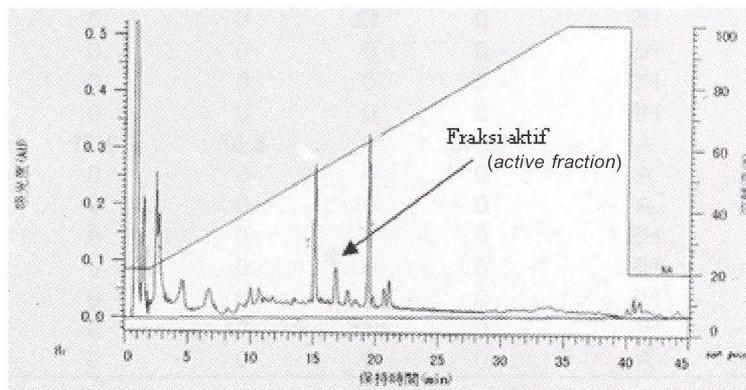
Pada tahap selanjutnya dipilih isolat A32 untuk dilakukan isolasi dan purifikasi senyawa aktif yang dihasilkannya. Isolat A11 sebenarnya lebih unggul, baik dalam hal daya hambat bakteri maupun banyaknya jenis bakteri yang dapat dihambat (Tabel 1), namun demikian pemurnian A11 belum berhasil dilakukan, sehingga isolat A32 dipilih sebagai isolat yang akan diuji lebih lanjut.

Sebanyak 10 L *broth* hasil fermentasi isolat A32 dipisahkan biomasnya dan dimurnikan. Kromatogram HPLC ekstrak *broth* hasil fermentasi isolat A32 disajikan dalam Gambar 1.

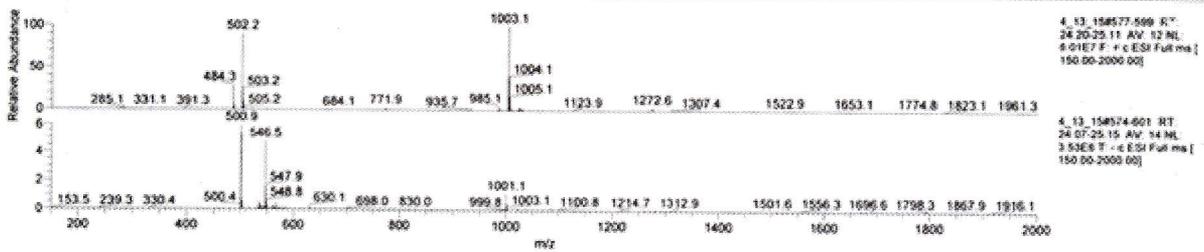
Gambar 1 menunjukkan bahwa terdapat beberapa puncak dominan pada retensi 15 sampai 22 menit. Dilihat dari waktu retensi ini, terlihat adanya senyawa-senyawa semipolar di dalam *broth* fermentasi tersebut. Puncak yang muncul pada retensi 0 sampai dengan 5 menit merupakan senyawa yang bersifat polar dan larut dalam pelarut-pelarut polar seperti air dan metanol. Dari sepuluh liter *broth* fermentasi yang diekstrak dengan etil asetat diperoleh 1,97 gram ekstrak kering. Selanjutnya ekstrak tersebut dimurnikan menggunakan kolom kromatografi. Fraksi aktif dikumpulkan dan dimurnikan dengan HPLC. Dari hasil pemurnian HPLC diperoleh 30 fraksi dan masing-masing fraksi diuji aktifitas antimikrobanya dengan cara seperti uji aktivitas antimikroba yang telah dilakukan sebelumnya. Fraksi dengan waktu retensi 17 menit ternyata menunjukkan aktifitas terhadap mikroba uji. Fraksi tersebut memiliki serapan UV maksimum dengan panjang gelombang 247nm. Dari hasil uji dengan ESI-LCMS, fraksi aktif tersebut memiliki bobot molekul 501,2 g/mol yang ditunjukkan dalam kromatogram ESI-LCMS m/z 502,2 (M+H)⁺. Kromatogram hasil uji bobot molekul fraksi aktif isolat A32 disajikan pada Gambar 2. Hasil penelusuran *data base* yang terdapat dalam ESI-LCMS menunjukkan rumus molekul dengan limpahan m/z 502,2 (M+H)⁺ adalah C₂₆H₃₅N₃O₇. Setelah dilakukan konfirmasi dari referensi Ayres (1994), senyawa tersebut diduga madumycin I dengan struktur molekul yang disajikan pada Gambar 3.

Untuk memastikan bahwa molekul tersebut adalah Madumycin I maka dilakukan konfirmasi lebih lanjut menggunakan ¹HNMR dan COSY. Spektra ¹HNMR disajikan dalam Gambar 4. Internal standar ¹HNMR yang digunakan adalah tetramethylsilane (TMS) dalam pelarut DMSO.

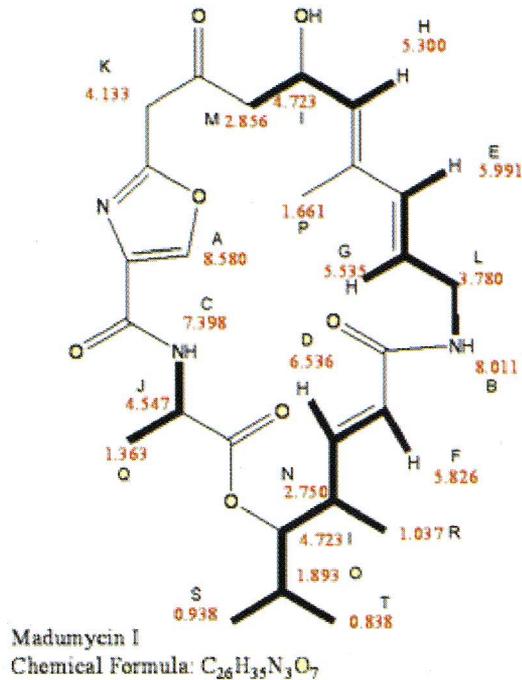
Puncak proton dengan geseran kimia δ 8.580 (A) merupakan proton cincin oxazole, puncak proton duplet dengan geseran kimia δ 7.398 (C) merupakan puncak proton yang berikatan dengan amida, hal yang



Gambar 1. Kromatogram HPLC dari ekstrak *broth* isolat A32.
Figure 1. HPLC Chromatogram of *broth* extract of A32 isolate.



Gambar 2. Kromatogram ESI-LCMS fraksi aktif isolat A32.
 Figure 2. ESI-LCMS chromatogram of active fraction of A32 isolate.



Keterangan/Explanation: angka yang ditampilkan menunjukkan geseran kimia (chemical shift) dari proton/presented number show chemical shift of proton

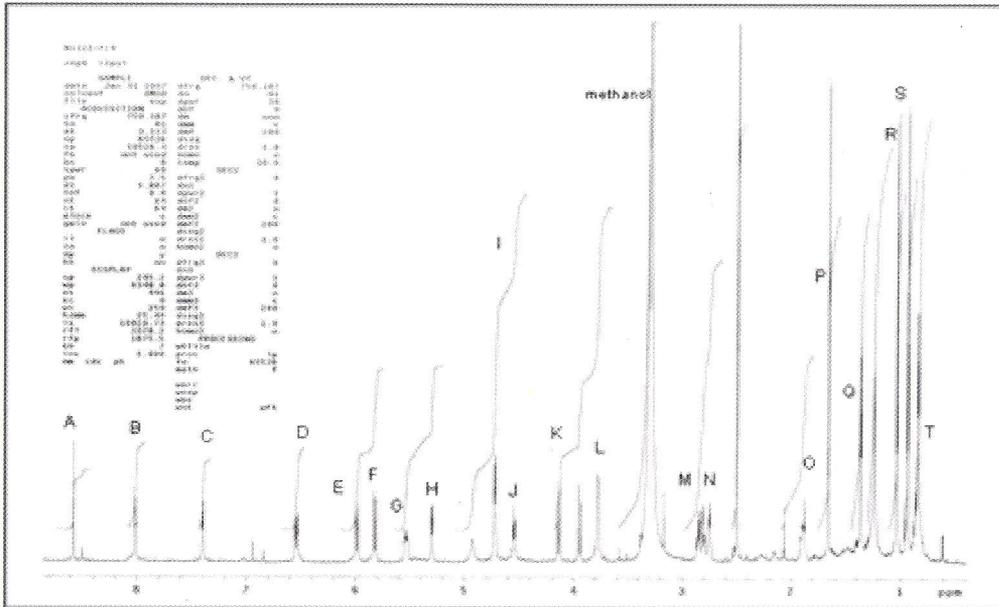
Sumber/Source: Ayres (1994)

Gambar 3. Struktur molekul senyawa aktif (Madumycin I) yang dihasilkan oleh isolat A32.
 Figure 3. Molecule structure of active compound (Madumycin I) produced by A32 isolate.

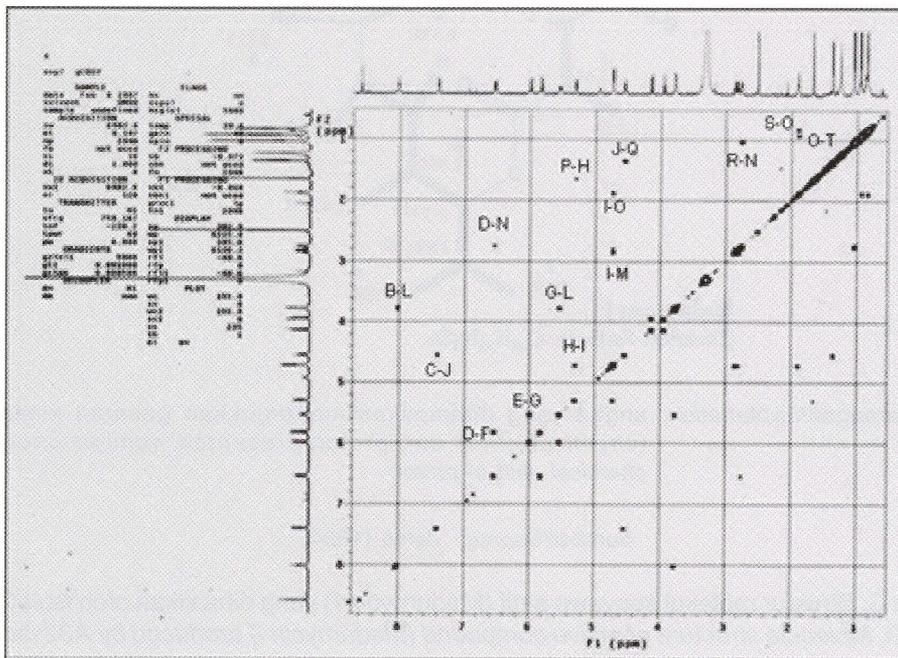
sama proton yang berikatan dengan amida ditunjukkan pada pergeseran kimia δ 8.011 (B). Puncak proton duplet pada geseran kimia δ 3.780 (L) merupakan puncak proton metilena yang berdekatan dengan atom nitrogen dari amida. Pergeseran kimia yang terjadi lebih tinggi (downfield) disebabkan karena adanya atom nitrogen didekatnya. Puncak proton yang berdekatan dengan gugus hidroksi ditunjukkan pada pergeseran kimia δ 4.723 (I). Puncak proton multiplet yang berdekatan dengan dua gugus metil ditunjukkan pada puncak dengan pergeseran kimia δ 1.893 (O).

Untuk menentukan hubungan tata letak kedekatan posisi antara proton maka diuji menggunakan COSY. Spektrum COSY senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat A32 disajikan dalam Gambar 5.

Dari Gambar 5 terlihat bahwa proton (S) δ 0.938 terletak berdekatan dengan proton (O) δ 1.893, dan proton (O) juga berdekatan dengan proton (T) δ 0.838. Proton (R) δ 1.037 berdekatan dengan proton (N) δ 2.750, proton (J) δ 4.547 berdekatan dengan proton (Q) δ 1.363, proton (I) δ 4.723 berdekatan dengan proton (M) δ 2.856, proton (P) δ 1.661 berdekatan



Gambar 4. Spektrum ¹HNMR senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat A32.
 Figure 4. ¹HNMR Spectrum of active fraction produced by A32 isolate.



Gambar 5. Spektra COSY senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat A32.
 Figure 5. COSY spectrum of active fraction produced by A32 isolate.

dengan proton (H) δ 5.991, proton (D) δ 6.536 berdekatan dengan proton (N) δ 2.750, proton (H) δ 5.3 berdekatan dengan proton (I) δ 4.723, proton (B) δ 8.011 berdekatan dengan proton (L) δ 3.780, proton (C) δ 7.398 berdekatan dengan proton (J) δ 4.547, proton (D) δ 6.536 berdekatan dengan proton (F) δ 5.826, dan proton (E) δ 5.991 berdekatan dengan proton (G) δ 5.535.

Hasil interpretasi spektra ¹HNMR dan COSY menunjukkan bahwa senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat A32 diduga adalah Madumycin I, dengan rumus molekul C₂₆H₃₅N₃O₇. Adapun struktur molekul senyawa tersebut disajikan dalam Gambar 3. Senyawa ini memiliki kemiripan struktur molekul dengan antibiotik A2315A yang telah ditemukan oleh Chamberlin & Chen (1976) yang memiliki bobot

molekul 503,588 g/mol. Senyawa ini termasuk dalam kelompok makrolakton virginiamycin (Cocito, 1979).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Isolasi aktinomisetes laut dari sedimen pantai Anyer Banten menghasilkan 29 isolat. Dari hasil uji aktivitas antimikroba, 2 isolat menunjukkan aktivitas menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922, 4 isolat menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC25923, 2 isolat menghambat *Bacillus subtilis* ATCC 66923, 3 isolat menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, 3 isolat menghambat *Candida albican* BIOMCC00122, dan 2 isolat menghambat *Aspergillus niger* BIOMCC00134.
2. Hasil studi lebih lanjut terhadap isolat terpilih A32 menunjukkan bahwa isolat A32 menghasilkan senyawa aktif yang diduga Madumycin I dengan bobot molekul 501,2 g/mol, rumus molekul $C_{26}H_{35}N_3O_7$, dan serapan $UV I_{max}$ 247 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayres, D.C. 1994. *Dictionary of Natural Product (volume four)*. Chapman & Hall London, UK. p.3741.
- Chamberlin J.W. and Chen, S. 1976. A2315, new antibiotics produced by actinoplanes philippinensis. 2. structure of a2315a. *Journal of Antibiotic*. 30(3).
- Charan, R.D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., and Carter, G.T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 67: 1431–1433.
- Cocito, C. 1979. *Antibiotics of the Virginiamycin Family, Inhibitors Which Contain Synergistic Components*. *Microbiological Reviews*. 79: 145–198.
- Fenical, W. and Paul, R.J. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycetes bacteria. *Nature Chemical Biology*. 2(12).
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 42: 355–357.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., William, P.G., and Fenical, W. 2005. *Marine Actinomycetes Diversity and Natural Product Discovery*. Antonie van Leeuwenhoek 2005. 87: 43–48.
- Lam, K.M. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 245–251.
- Morello, J.A., Granato, P.A., and Mizer, H.E. 2002. *Laboratory Manual Workbook in Microbiology*. 7th edition. The McGraw Hill Company. New York. 95 pp.
- Pisano, M.A., Michael, J.S., and Madelyn, M.L. 1986. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 25: 285–288.
- Riegdlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A.T., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bister, B., and Bischoff, D. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J. Antibiotic*. 57: 271–279
- Okami, Y. and Hotta, K. 1988. Search and Discovery of New Antibiotic. In Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (eds). *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Ward, A.C. and Nagamani, B. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 279–286.
- William, P.G., Buchanan, G.O., Feling, R.H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2005. New cytotoxic salinisporamides from the marine actinomycetes *salinispora tropica*. *J. Org Chem*. 70: 6196–6203.