

DIVERSITAS DAN BIOAKTIVITAS AKTINOMISETES LAUT DARI PANTAI SELATAN YOGYAKARTA

Diversity and Bioactivity of Marine Actinomycetes from South Coast of Yogyakarta

Rofiq Sunaryanto

Balai Pengkajian Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Korespondensi Penulis: Rofiq Sunaryanto, Gd. 630 Kawasan PUSPIPTEK Serpong Tangerang Selatan Banten 15314.
Email: rofiqsn@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi, identifikasi dan uji sitotoksitas aktinomisetes yang diperoleh dari sampel sedimen laut pantai selatan Yogyakarta. Sebanyak 30 sampel sedimen laut diambil dari beberapa titik lokasi yang berbeda. Isolasi dilakukan menggunakan metode perlakuan sampel *heat shock treatment*, pemanasan sampel pada suhu 65°C selama 60 menit dan isolat ditumbuhkan dalam medium HV Agar. Produksi senyawa aktif dilakukan menggunakan medium *Yeast Pepton Glukosa* (YPG). Dari 30 sampel yang diisolasi diperoleh total 93 isolat aktinomisetes. Dari hasil identifikasi menggunakan 16 S rRNA diperoleh informasi bahwa isolat terbanyak adalah *Streptomycineae* sebanyak 38 isolat, diikuti oleh *Micromonosporineae* 17 isolat dan *Corynebacterineae* 16 isolat, serta beberapa isolat teridentifikasi sebagai *Micrococcineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, dan *Proteobacteria*. Dari hasil uji sitotoksitas menggunakan *cell line* A549 diperoleh informasi bahwa sebanyak 6 isolat menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap *cell line* A549, sementara 2 isolat menunjukkan aktivitas sedang, 9 isolat menunjukkan aktivitas lemah dan 76 isolat tidak memiliki bioaktivitas.

KATA KUNCI: aktinomisetes, biodiversitas, bioaktivitas, isolasi

ABSTRACT

Isolation, identification and cytotoxicity test of marine actinomycetes isolated from coastal marine sediment samples taken from south coast of Yogyakarta have been conducted. A total of 30 marine sediment samples were collected from several different location points. Isolation was conducted using heat shock treatment (heating at 65°C for 60 minutes) and isolates were grown in HV Agar medium. Active compounds were produced by fermentation using a yeast peptone glucose medium. A number of 93 actinomycetes were isolated from 30 marine sediment sample. Identification using 16 S rRNA showed that the most abundant isolates were the genus of Streptomycineae 38 isolates, followed by Micromonosporineae 17 isolates, Corynebacterineae 16 isolates and some identified as Micrococcineae, Streptosporangineae, Frankineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae and Proteobacteria. Cytotoxicity assay using a cell line A549 showed that 6 isolates exhibited strong activity against the cell line A549, 2 isolates exhibited moderate activity, 9 isolates exhibited weak activity, and 76 isolates exhibited no activity.

KEYWORDS: actinomycetes, biodiversity, bioactivity, isolation

PENDAHULUAN

Dalam beberapa tahun terakhir, aktinomisetes laut telah terbukti banyak menghasilkan senyawa aktif baru. Penemuan penting senyawa aktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut telah dilaporkan lebih dari 50 tahun yang lalu. Pada saat itu, laut dianggap sebagai lingkungan yang kurang mendukung

untuk pertumbuhan mikroba karena kadar garam yang tinggi. Sebaliknya, daratan atau tanah dianggap sebagai lingkungan yang mendukung untuk pertumbuhan mikroba. Keanekaragaman hayati mikroorganisme laut menjadi hal yang menarik untuk dipelajari lebih mendalam oleh para peneliti. Kondisi lingkungan laut yang berbeda dan lebih bervariasi dibandingkan dengan lingkungan terestrial, ternyata

mempengaruhi karakteristik mikroorganisme laut termasuk jenis senyawa aktif yang dihasilkannya. Keanekaragaman biokimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut dan potensi senyawa aktif yang dimilikinya menjadikannya lebih menarik dan diakui tidak hanya oleh ahli mikrobiologi tetapi juga oleh industri farmasi. Beberapa perusahaan baru terfokus pada penemuan obat dan produk alami yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut.

Aktinomisetes merupakan kelompok mikroorganisme yang banyak tersebar luas di alam (Locci & Shaples, 1983; Goodfellow *et al.*, 1988; Oskay *et al.*, 2004). Banyak aktinomisetes yang memiliki kemampuan untuk mensintesis metabolit sekunder seperti enzim, herbisida, pestisida, dan antibiotik lainnya (Cross, 1982). Beberapa senyawa aktif yang memiliki aktifitas sebagai antibakteri, antikoagulan, antijamur, antiperadangan, antimalaria, antiprotozoa, antituberkulosis, antivirus yang dihasilkan oleh mikroba laut telah berhasil ditemukan (Alejandro *et al.* 2011).

Sebanyak 70% antibiotik yang telah diketahui berasal dari aktinomisetes, terutama dari genus *Streptomyces* dan *Micromonospora* (Goodfellow *et al.*, 1988; Pandey *et al.*, 2004; Berdy, 2005). Pada tahun-tahun sebelumnya, peneliti lebih banyak memfokuskan target isolasi pada aktinomisetes tanah. Namun demikian, sekarang ini pencarian antibiotik baru sudah mengarah pada aktinomisetes laut (Ghanem *et al.*, 2000; Fiedler *et al.*, 2005; Lam, 2006). Beberapa penelitian sebelumnya seperti Anand *et al.* (2012) telah melakukan penapisan mikroba laut yang memiliki daya hambat terhadap *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*. Johnson *et al.* (2012) telah melakukan penapisan aktinomisetes dari aliran sungai Kanyakumari India dan mendapatkan sepuluh senyawa aktif sebagai antibakteri dan antijamur. Mikroba laut yang berasosiasi dengan spons diketahui menghasilkan senyawa aktif sebagai anti kanker dan antibakteri yang potensial (Remya *et al.*, 2010). Sunaryanto *et al.* (2010^a) mendapatkan antibiotik madumycin I yang dihasilkan oleh isolat aktinomisetes laut strain A32 yang diisolasi dari sedimen laut. Pada tahun yang sama, Sunaryanto *et al.* (2010^b) mendapatkan citropeptin yang memiliki aktivitas terhadap sel kanker A549, dihasilkan oleh isolat RS02-85 yang diisolasi dari sampel sediment laut.

Beberapa metode isolasi aktinomisetes telah banyak digunakan oleh para peneliti. Salah satu metode untuk mendapatkan aktinomisetes adalah dengan cara memberikan perlakuan pemanasan sampel (*heatshock treatment*). Sunaryanto *et al.* (2010^{a,b}) dan Pisano *et al.* (1986) menggunakan perlakuan pemanasan sampel pada suhu 65°C selama

60 menit, hal yang sama dilakukan oleh Alenjandra (2008) dengan memberikan perlakuan pemanasan pada suhu 55°C selama 60 menit. Menurut Goodfellow *et al.* (1988) perlakuan pemanasan sedimen sampel pada proses isolasi aktinomisetes mampu menekan pertumbuhan bakteri gram negatif. Pemilihan medium isolasi juga berpengaruh terhadap proses *recovery* isolasi aktinomisetes. Salah satu medium isolasi yang digunakan untuk isolasi aktinomisetes adalah *Humid Acid Vitamin* (HV) agar. Medium HV agar bersifat selektif yang mampu menumbuhkan spora aktinomisetes lebih cepat. Kumar *et al.* (2012) telah berhasil mendapatkan beberapa isolat aktinomisetes dengan menggunakan medium HV agar yang ditambahkan asam nalidixic. Sateesh *et al.* (2011) mendapatkan *rare* aktinomisetes dari sampel sedimen mangrove dengan menggunakan medium HV agar dengan perlakuan pemanasan sampel pada suhu 100°C selama 15 menit.

Laut memiliki biodiversitas lebih besar dibandingkan dengan tanah, seperti diketahui jenis mikroorganismenya juga akan lebih bervariasi dibandingkan mikroba tanah (Das *et al.* 2006). 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. Selama ini eksplorasi aktinomisetes di Indonesia masih banyak diperoleh dari sampel tanah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui diversitas aktinomisetes laut di pantai selatan Yogyakarta serta mengetahui bioaktivitasnya terhadap sel kanker A549.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel

Sebanyak 30 sampel berupa sedimen laut diperoleh dari beberapa lokasi di Pantai Selatan Yogyakarta yang membentang dari arah barat Pantai Baron (8,1306° S 110,5463° E) ke timur sampai dengan Pantai Sundak (8,1475° S 110,6084° E) di Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta. Dari setiap lokasi diambil 1 sampel dan masing-masing diambil sebanyak 5 gram yang diambil langsung dengan falcon *tube* steril pada 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 gram padatan sampel dipisahkan air lautnya dengan cara didekantir. Empat mililiter air demineral steril ditambahkan ke dalam sampel tersebut, diaduk selama 10 menit dan didiamkan sampai suspensi mengendap. Sebanyak 1 mL cairan sampel diambil dan diencerkan dengan air demineral steril sebanyak 4 mL, untuk dilakukan proses praperlakuan dengan cara pemanasan. Praperlakuan dengan cara panas dilakukan mengacu pada metode Pisano *et al.* (1986) yang dimodifikasi, yaitu dengan memanaskan 4 mL cairan sampel pada suhu 65°C selama 60 menit. Cairan sampel yang telah mengalami praperlakuan selanjutnya diencerkan secara seri dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-5} menggunakan air demineral steril. Selanjutnya, 0,1 mL cairan sampel yang telah diencerkan disebarkan pada permukaan HV Agar sebagai media isolasi yang ditambahkan beberapa jenis antibiotik, yaitu 100 mg mL⁻¹ cycloheximide, 25 mg mL⁻¹ nistatin, 100 mg mL⁻¹ asam nalidixic, dan 5 mg mL⁻¹ rifampin untuk menekan pertumbuhan bakteri dan jamur kontaminan. Antibiotik ditambahkan setelah medium isolasi disterilisasi.

Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 21 hari. Koloni aktinomisetes yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke dalam medium ISP (*International Streptomyces Project*), pemindahan dilakukan sampai diperoleh koloni tunggal.

Fermentasi Kultur Cair

Koloni yang telah dimurnikan dalam medium ISP ditumbuhkan dalam kultur vegetatif untuk perbanyak sel pada medium cair YEME selama 2 hari pada suhu 30°C. Adapun komposisi medium YEME adalah pepton 5 g L⁻¹, ekstrak khamir 3 g L⁻¹, ekstrak malt 3 g L⁻¹, glukosa 10 g L⁻¹, air demineral 7,5 mL, dan air laut 22,5 mL. Selanjutnya, sebanyak 3 mL kaldu kultur vegetatif yang telah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C dan agitasi 150 rpm, ditransfer ke dalam 30 mL medium fermentasi dengan komposisi medium Bacto peptone 15 g L⁻¹, yeast extract 3 g L⁻¹, Fe citrate n H₂O 0,3 g L⁻¹, air demineral 7,5 mL, dan air laut 22,5 mL, pH diatur pada 7,6. Fermentasi dilakukan selama 5 hari dengan inkubasi pada suhu 30°C dan agitasi sebesar 150 rpm. Volume kerja proses fermentasi adalah 30 mL dalam flask 250 mL.

Uji Toksisitas terhadap Sel A549 (*bioassay*)

Sel A549 dikulturkan dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS). Sel kanker didistribusikan ke 96 mikroplat sumuran (40.000 sel/200 mL/sumur) yang sebelumnya telah dilakukan perhitungan sel dengan haemocytometer dan

selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO₂ (5% CO₂-udara, 37°C) selama 24 jam. Sampel uji (dalam pelarut metanol) dengan konsentrasi 1 mg mL⁻¹ ditambahkan ke dalam setiap sumur masing-masing 5 ì L kecuali blanko yang hanya ditambahkan 5 ì L pelarut metanol. Sel dikulturkan selama 48 jam dalam inkubator CO₂. (Freshney, 2006). Jumlah sel yang hidup dihitung dengan metode *Alamar Blue* yang dikoreksi dengan blanko (Nasiry *et al.*, 2007). Ekstrak sampel yang mampu membunuh jumlah sel kanker lebih dari 80% dikategorikan memiliki aktivitas yang kuat, sedangkan ekstrak sampel yang mampu membunuh sel kanker di antara 50–80% dikategorikan memiliki aktivitas sedang, dan ekstrak sampel yang mampu membunuh sel kanker diantara 50–80% dikategorikan memiliki aktivitas lemah.

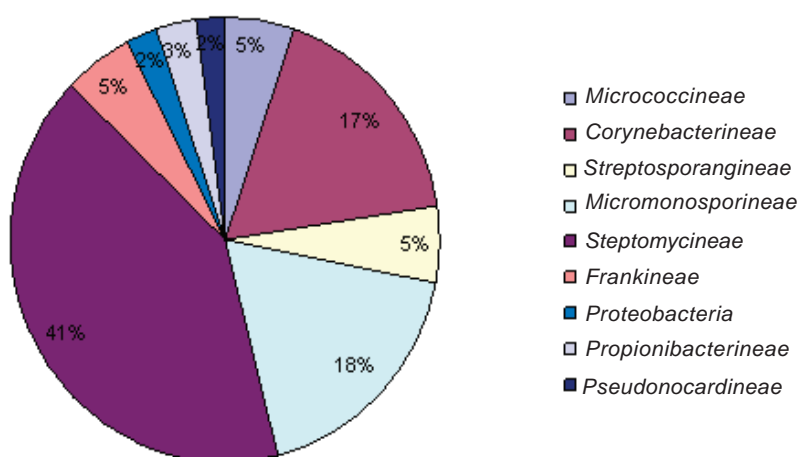
Analisis Sekuen Gen 16S rRNA

Semua isolat murni hasil preservasi dalam stok gliserol diremajakan kembali dan dilakukan identifikasi. Identifikasi didasarkan pada analisis 16S rRNA. DNA diisolasi dengan menggunakan FastPrep, kit khusus untuk isolasi DNA. Sampel dilisis menggunakan *lysing matrix kit* dan dihomogenasi menggunakan FastPrep selama 40 detik pada 4500 rpm.

Amplifikasi DNA dikerjakan menggunakan PCR dengan primer 8 F dan 1492R. PCR yang mengandung primer 8F dan 1492R ditambahkan ke dalam larutan DNA, selanjutnya dipurifikasi menggunakan kit ekstraksi Gel/DNA. Selanjutnya dilakukan *sequencing* terhadap gen 16S rRNA yang diperoleh dengan menggunakan Dye[®] terminator V 3.1 *cycle sequencing*. Mesin DNA *sequencer* yang digunakan adalah ABI 300 *genetic analyzer*. Selanjutnya, sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan database yang tersedia dalam NCBI menggunakan BLAST *search engine* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Pohon flugenetik dibuat menggunakan program ClustalW (Mega 3.1). Untuk analisis digunakan metode *neighbour-joining* dengan *bootstrap* dataset 100 kali pengulangan yang telah tersedia dalam program Mega 3.1.

HASIL DAN BAHASAN

Pengambilan sampel pada tahap isolasi aktinomisetes diambil dari beberapa titik yang membentang dari Pantai Baron ke arah timur sampai dengan Pantai Sundak, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta. Sampel yang telah mengalami *heat shock treatment* dikulturkan dalam media HV Agar dan diinkubasi sampai koloni aktinomisetes tumbuh. Dari 30 sampel sedimen laut yang diambil, diperoleh 93



Gambar 1. Distribusi aktinomisetes dari sedimen laut Pantai Selatan Yogyakarta
 Figure 1. Distribution of actinomycetes isolated from marine sediment of South Coast of Yogyakarta.

isolat aktinomisetes. Distribusi aktinomisetes dari sedimen laut Pantai Selatan Yogyakarta disajikan dalam Gambar 1.

Dari Gambar 1 terlihat bahwa Genus *Streptomycineae* paling banyak diperoleh, yaitu 41% dari total aktinomisetes yang dapat diisolasi, diikuti oleh *Micromonosporineae* (18%) dan *Corynebacterineae* (17%). Hasil serupa ditunjukkan oleh penelitian Saurav dan Kannabiran (2010). Menggunakan medium ISP, *Starch Casein Agar* dan medium Kuster's Agar sebagai medium isolasi, mereka memperoleh isolat berupa *Streptomycineae* 40% dan *Micromonosporineae* 22%. *Streptomycineae* juga dilaporkan merupakan populasi terbanyak yang dapat ditemukan dalam sedimen laut maupun sampel tanah (Kumar *et al.*, 2011), hal ini sesuai dengan hasil penelitian Mincer *et al.* (2002) dan Vijayakumar *et al.* (2007). *Streptomycineae* mampu menghasilkan spora yang dapat digunakan untuk bertahan hidup pada tempat-tempat yang ekstrim dan mampu menghasilkan metabolit sekunder yang lebih variatif dibandingkan aktinobacteria lainnya sehingga efektif untuk mendukung proses kelangsungan hidupnya (Prescot *et al.*, 2002).

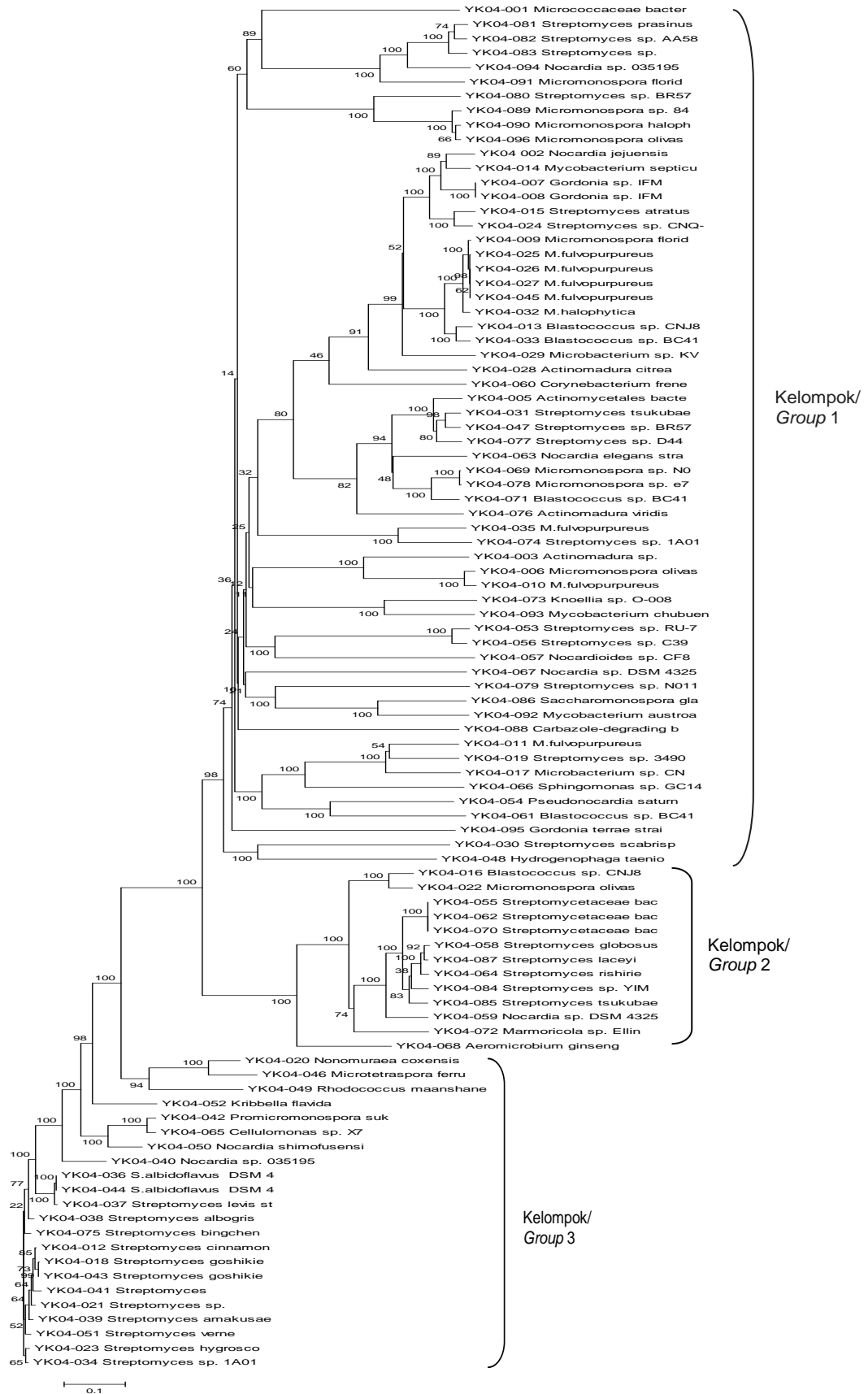
Untuk melihat kedekatan kekerabatan antara spesies yang dapat diisolasi, dilakukan analisis menggunakan pohon filogenik. Hasil analisis pohon filogenik disajikan pada Gambar 2.

Dari pohon filogenik terlihat bahwa aktinomisetes hasil isolasi dari Pantai Selatan Yogyakarta memiliki keragaman genetika relatif tinggi. Dari pohon filogenik yang disajikan dalam Gambar 2 tersebut, dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok besar. Yaitu kelompok 1 yang merupakan kelompok paling besar anggotanya, dimana masih dapat dikelompokkan lagi menjadi beberapa kelompok. Selanjutnya kelompok

2 dengan anggota paling sedikit, dan kelompok 3 dengan 23 jenis mikroba. Dari pohon filogenik terlihat beberapa spesies *Streptomyces* menunjukkan penyebaran dalam beberapa kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa pola keragaman genetik *Streptomyces* relatif tinggi. Hal ini memberikan peluang untuk menghasilkan metabolit sekunder yang lebih bervariasi. Hal yang sama diungkapkan oleh Goodfellow *et al.* (1988).

Selanjutnya, isolat hasil isolasi diuji toksisitasnya terhadap sel kanker A549. Dari 93 isolat yang diuji diperoleh informasi bahwa 6 isolat menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap *cell line* A549 (mampu membunuh lebih dari 80% sel kanker), 2 isolat menunjukkan aktivitas sedang (membunuh 50–80% sel kanker) dan 9 isolat menunjukkan aktivitas lemah (membunuh 10–50% sel kanker). Hasil uji toksisitas isolat dengan sel kanker A549 disajikan dalam Tabel 1.

Pada Tabel 1 terlihat bahwa dari 17 isolat yang memiliki aktivitas terhadap sel kanker A549, sebagian besar adalah dari genus *Streptomycineae*, diikuti oleh *Micromonosporineae*. Di antara seluruh anggota aktinomisetes, *Streptomycineae* adalah genus penghasil metabolit sekunder terbanyak (Krishna *et al.*, 2006; Risk *et al.*, 2007) dan penghasil senyawa sitotoksik (Yoo *et al.*, 2002; Thangapandian *et al.*, 2007). Menurut Goodfellow *et al.* (1988) *Streptomycineae* memiliki kombinasi gen yang sangat bervariasi yang mampu menghasilkan metabolit sekunder lebih dari 30 jenis. Dari penelitian sebelumnya telah berhasil diisolasi senyawa aktif citropeptin yang dihasilkan oleh isolat RS03-85 dan aktif terhadap sel kanker A549, isolat ini mampu membunuh sel kanker A549 hingga 98% (Sunaryanto *et al.*, 2010^b). *Streptomyces* spp. yang diisolasi dari Lonar Lake India juga menunjukkan aktivitas kuat



Gambar 2. Pohon filogenik aktinomisetes yang diisolasi dari Pantai Selatan Yogyakarta.
 Figure 2. Phylogenetic tree of actinomycetes isolated from South Coast of Yogyakarta.

Tabel 1. Uji toksisitas terhadap sel kanker A549
 Table 1. Toxicity assay against cancer cell A549

Kode Isolate/ Code of Isolates	Identitas/Identity	Kemiripan/ Similarity (%)	Nomor Akses/ Access Number	Toksisitas/Jumlah Sel Kanker A549 yang Mati (%)/ Toxicity/The Number of Death Cancer Cells A549 (%)
YK04-30	<i>Streptomyces scabrisporus</i>	99	B14AC11STM	98
YK04-37	<i>Streptomyces levis</i> strain NRRL B-16370T	100	B14AC11STM	95
YK04-15	<i>Streptomyces atratus</i>	99	B14AC11STM	95
YK04-03	<i>Actinomadura</i> sp.	99	B14AC12STS	92
YK04-58	<i>Streptomyces globosus</i> strain 12620-1	100	B14AC11STM	85
YK04-74	<i>Streptomyces</i> sp. 1A01564	99	B14AC11STM	81
YK04-90	<i>Micromonospora halophytica</i>	99	B14AC08MMS	71
YK04-64	<i>Streptomyces rishiriensis</i> strain T20-1-1	99	B14AC11STM	52
YK04-80	<i>Streptomyces</i> sp. BR57	99	B14AC11STM	45
YK04-56	<i>Streptomyces</i> sp. C39	98	B14AC11STM	45
YK04-69	<i>Micromonospora</i> sp. N0156	100	B14AC08MMS	38
YK04-94	<i>Nocardia</i> sp. 035195	99	B14AC07COR	35
YK04-82	<i>Streptomyces</i> sp. AA58	99	B14AC11STM	34
YK04-06	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	98	B14AC08MMS	31
YK04-10	<i>M. fulvopurpureus</i>	99	B14AC08MMS	29
YK04-36	<i>S. albidoflavus</i> (DSM 46452)	100	B14AC11STM	24
YK04-53	<i>Streptomyces</i> sp. RU-75	100	B14AC11STM	21

terhadap sel kanker A549 pada konsentrasi 0,5% (b/v) 25 mL (Kharat *et al.*, 2009).

Apabila dilihat dari tingkat kemiripan (*homology*) pada Tabel 1, maka isolat yang memiliki aktivitas terhadap sel kanker A549 tidak menunjukkan adanya kandidat isolat baru, terlihat pada kolom identitas (Tabel 1), tingkat kemiripan masing-masing isolat lebih dari 98%. Yang artinya isolat tersebut bukan isolat baru. Namun demikian dari total 93 isolat yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi, diperoleh 2 kandidat isolat baru dengan tingkat kemiripan masing-masing 97% yaitu isolat YK04-57 yang memiliki tingkat kemiripan paling dekat dengan *Nocardioides* sp. CF8 sebesar 97%, dan isolat YK04-05 yang memiliki tingkat kemiripan paling dekat dengan *Actinomycetales bacterium* HPA124 sebesar 97% (data tidak ditunjukkan). Namun demikian kedua isolat tersebut tidak memiliki sitotoksitas terhadap sel kanker A549.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolasi aktinomisetes menggunakan media HV Agar dengan perlakuan *heat shock treatment* terhadap 30

sampel yang diambil dari Pantai Selatan Yogyakarta, diperoleh sebanyak 93 isolat. Dari 93 isolat aktinomisetes, 41% masuk dalam genus Streptomycineae, 18% genus Micromonosporineae dan 17% Corynebacterineae, serta beberapa isolat teridentifikasi sebagai *Micrococcineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, dan *Proteobacteria*. Hasil uji sitotoksitas menggunakan sel kanker A549 menunjukkan bahwa sebanyak 17 isolat aktinomisetes memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker A549. Dari 17 isolat yang aktif terhadap sel kanker A549, sebagian besar teridentifikasi sebagai *Streptomyces* sp.

DAFTAR PUSTAKA

Alejandro, M.S., Mayer ., Abimael, D., Rodríguez, b., Roberto, G.S., Berlinck, C., Fusetani, N. 2011. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other

- miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol, Part C*. 153: 191–222
- Alenjandra, P.D. 2008. *Phylogenetic and chemical diversity-derived actinomycetes from Southern California sediments*. PhD Thesis. University of California, San Diego. 19 pp.
- Anand, P., Chellaram, C., Kumaran, S., Felicia, C. 2012. Screening for antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. *Inter J Pharm BioSci*. 2(1): 314–325.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites (review article). *J Antibiot*. 58(1): 1–26.
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). 2012. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Diakses pada tanggal 30 Juli 2012.
- Cross, T. 1982. Actinomycetes : *A Continuing Source of New Metabolites*. Di dalam Lancini G, Rolando L. 1993. *Biotechnology of Antibiotic and Other Bioactive Microbial Metabolites*. New York: Kluwer Academic Publisher Group.
- Das, S., Lyla, P.S., and Khan, S.A. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspective. *Curr Sci*. 90: 1325–1335.
- Fiedler, H.P., Christina B., Alan T.B, Alan, C.W., Michael, G, Olivier. P, Carsten. P., and Gerhard. H. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Leeuwenhock* 87: 37–42.
- Freshney, R.I. 2006. *Basic principles of cell culture*. In Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. 2006 John Wiley & Sons Inc. New York.
- Ghanem, B.N., Soraya, A.S., Zeinab, M.E, Gehan, A.A.E. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen Appl. Microbiol*. 46: 105–111.
- Goodfellow, M., William, S.T., and Mordarski, M. 1988. *Actinomycetes in Biotechnology*. New York: Academic Press.
- Johnson, J.A., Citarasu, T., and Mary, H. 2012. Screening of antibiotic producing actinomycetes from streams. *J. Chem. Biol. Phys. Sci*. 2(3): 1363–1370.
- Kharat, KR., Kharat, A., Hardikar, B.P. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Streptomyces* spp. from Lonar Lake. *Afr. J. Biotechnol*. 8(23): 6645–6648.
- Krishna, K.K., Ponmurugan, P., and Kanna, N. 2006. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. for secondary metabolite production. *Biotechnol* 5: 478–480.
- Kumar, K.S., Haritha, R., Mohan, Y.S.Y.V.J., Raman, T. 2011. Screening of marine actinobacterial for antimicrobial compounds. *Res. J. Microbiol*. 6(4): 385–393.
- Kumar, V., Bharti, B., Kumar, Y.N., Gusain, O., Pandey, P., and Bisht, G.S. 2012. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. *Braz J Microbiol*. p. 205–214.
- Lam, K.M. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol*. 9: 245–251
- Locci, R. and Sharples, G.P. 1983. Morphology. In Goodfellow, M., Mordarski, M., and Williams, S.T. (eds.). *The Biology of The Actinomycetes*. London: Academic Press.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., and Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ Microbiol*. 68: 5005–5011.
- Nasiry, S.A., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten., Pijnenborg, R. 2007. The Use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of *Choriocarcinoma* cells. *Hum Reprod*. 10: 1–6
- Oskay, M., Tamer, A.U., and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol*. 3(9): 441–446.
- Pandey, B., Ghimire, P., and Agrawal, V.P. 2004. *Studies on the antibacterial activity of actinomycetes isolated from The Khumbu Region of Mt. Everest*. A paper presented in the International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu. January 12-15, 2004. Organized by Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada.
- 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.
- Prescott, M.J., Harley, J.P., and Klein, D.A. 2002. *Microbiology*. Fifth Edition. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Remya, T.A., Thomas, Devanand, P., Kavlekar., Ponnappakkam, A., LokaBharathi. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association. *Mar Drugs*. 8: 1417–1468.
- Risk, M., Abdel-Rahman, T., Metwally, H. 2007. Screening of antagonistic activity in different *Streptomyces* species against some pathogenic microorganisms. *J. Boil. Sci*. 7:1418-1423.
- Sateesh, V., Naikpatil., Rathod, J.L. 2011. Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *J. Ecobiotechnol*. 3(10):48-53.
- Sunaryanto, R., Marwoto, B., Irawadi, T.T., Mas'ud, Z.A., dan Hartoto, L. 2010^a. Isolasi dan elusidasi struktur kimia antimikroba yang dihasilkan oleh aktinomisetes laut. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 5(1):11–18.
- Sunaryanto, R., Marwoto, B., Yoshihide Matsuo. 2010^b. Isolasi dan Elusidasi Struktur Kimia Antimikroba yang Dihasilkan oleh Aktinomisetes Laut. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 5(2):111–116.
- Saurav dan Kannabiran K. 2010. Diversity and optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces* VITSVK9 spp. isolated from Bay of Bengal, India. *J. Nat. Env. Sci*. 1(2): 56–65.
- Vijayakumar, R., Muthukumar, C., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., and Saravanamuthu, R. 2007.

- Studies on the diversity of actinomycetes in The Palk Strait Region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica* 21: 59–65.
- Thangapandian, V., Ponmurugan, P., and Ponmurugan, K. 2007. Actinomycetes diversity in the rhizosphere soils of different medicinal plants in Kolly Hills-Tamilnadu India for secondary metabolite production. *Asian J. Plant Sci.* 6: 66–70.
- Yoo, J.C, Han, J.M., Nam, S.K., Baik, K.S., Jo, J.S., and Seong, C.N. 2002. Characterization of a *Streptomyces* isolate producing the potent cytotoxic substance, nonadecaic acid. *J. Microbiol.* 40:178–181.