



## **Keragaman Aktinomisetes yang Dapat Dikultur dari Dasar Laut Dalam Selat Makassar, Indonesia**

**Ariani Hatmanti<sup>1)</sup>, Puspita Lisdiyanti<sup>2)</sup>, Jaka Widada<sup>3)</sup>, Subagus Wahyuono<sup>4)</sup>**

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Oseanografi LIPI <sup>2)</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI <sup>3)</sup>Fakultas Pertanian Universitas Gadjahmada <sup>4)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Gadjahmada

Email : [ariehatmanti@gmail.com](mailto:ariehatmanti@gmail.com)

Submitted 4 May 2018. Reviewed 22 May 2018. Accepted 26 Juny 2018

DOI: [10.14203/oldi.2018.v3i2.205](https://doi.org/10.14203/oldi.2018.v3i2.205)

### **Abstrak**

Berkenaan dengan kolaborasi riset Eksplorasi Widya Nusantara (EWIN) yang dilakukan pada bulan Mei-Juni 2013 dan November 2014, telah dilakukan penelitian mengenai isolasi aktinomisetes dari sedimen dasar laut Selat Makassar. Aktinomisetes merupakan salah satu mikroba yang mempunyai rekam jejak yang sangat baik dalam menghasilkan antimikroba dan bahan aktif lainnya. Namun karena aktinomisetes *terrestrial* telah banyak dieksplorasi, maka pada saat ini peneliti mulai fokus pada beragam lingkungan ekstrem untuk menapis kemampuan aktinomisetes dalam menghasilkan metabolit sekunder baru, salah satu diantaranya adalah lingkungan laut. Tiga puluh enam biakan murni aktinomisetes berhasil diisolasi dari 10 sampel yang diambil dari dasar laut dalam Selat Makassar, Indonesia. Tiga metode isolasi digunakan, dan metode dilusi langsung lebih baik dibandingkan dengan metode SDS-YE (*Sodium Dodecyl Sulfida–Yeast Extract*) dan metode RC (*Rehidration Centrifugation*). Media NBRC-802 dan AIA (*Actinomycetes Isolation Agar*) digunakan sebagai media isolasi. Semua isolat diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi dan analisis urutan basa gen 16S rRNA. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa aktinomisetes dari dasar laut dalam Selat Makassar didominasi oleh Genus *Micromonospora* (58%), *Verrucosipora* (14%), *Streptomyces* (8%), dan *Luteipulveratus* (5%), sedangkan genus *Nocardopsis*, *Micrococcus*, *Gordonia*, *Kytococcus*, dan *Arthrobacter* tidak dominan (3%). Aktinomisetes ditemukan paling banyak di Stasiun 25 pada kedalaman 1.547 m, yaitu sebanyak 18 isolat dan didominasi oleh Genus *Micromonospora* yang diisolasi dengan metode dilusi langsung menggunakan media NBRC 802 ataupun AIA.

**Kata kunci:** aktinomisetes, laut dalam, sedimen laut, Selat Makassar

### **Abstract**

**Diversity of Culturable Actinomycetes from Deepsea Floor of Makassar Strait, Indonesia.** With regard to collaboration research called Widya Nusantara Exploration (EWIN) in May-June 2013 and November 2014, a study on isolation of actinomycetes from sediments of Makassar Strait have been conducted. Actinomycetes is one of microbe which has an excellent track record in producing antimikroba and other active substances. But due to terrestrial actinomycetes has been widely explored, then recently researchers began focusing on wide variety of extreme environments, such as marine environment, to screening aktinomisetes in producing new secondary metabolites. A total of 36 strains of actinomycetes were isolated from 10 samples obtained from deepsea floor in Makassar Strait, Indonesia, Direct Dillution Method were best used to isolate the actinomycetes compare to Sodium Dodecyl Sulfida – Yeast Extract Method (SDS-YE Method) and

Rehydration Centrifugation Method (RC Method). NBRC-802 media and Actinomycetes Isolation Agar (AIA) (Himedia) media were used as the isolation media. All the isolates were identified by morphological characteristic and by analysis of 16S rRNA gene sequence. Actinomycetes isolated from deepsea floor of Makassar Strait have been dominated by *Micromonospora* (58%), *Verrucosipora* (14%), *Streptomyces* (8%), and *Luteipulveratus* (5%), however genus *Nocardiosis*, *Micrococcus*, *Gordonia*, *Kytococcus*, and *Arthrobacter* were not dominant (3%). Station 25 in 1.547 m depth was the most abundant of actinomycetes, 18 strains and dominated by the genus *Micromonospora* which is isolated using Direct Dillution Method and both NBRC 802 or AIA media.

**Keywords:** actinomycetes, deepsea, marine sediment, Makassar Strait

## Pendahuluan

Aktinomisetes merupakan mikroba yang mempunyai nilai ekonomis dan bioteknologi tinggi. Manivasagan et al. (2013) menyatakan bahwa dari 23,000 metabolit sekunder yang telah diproduksi oleh mikroba dan lebih dari 10.000 diantaranya dihasilkan oleh aktinomisetes, khususnya dari genus *Streptomyces*. Aktinomisetes mempunyai kemampuan mensintesis bermacam-macam metabolit sekunder yang berbeda-beda seperti agen antitumor (Cragg et al. 2005), agen immunosupresif (Mann 2001), enzim (Oldfield et al. 1996; Pecznka & Mordarski 1988), antibiotik (Berdy 2005; Strohl 2004), antimikroba, antiparasit, bahan baku kosmetik, vitamin, material nutrisi, herbisida, pestisida dan enzim seperti selulosa, dan xilanase yang digunakan dalam pengolahan limbah (Ramesh et al. 2009).

Menurut Lam (2006) rekam jejak aktinomisetes sangat baik dalam menghasilkan antimikroba, sehingga banyak usaha dilakukan untuk mengisolasi aktinomisetes darat sebagai sumber penapisan obat. Namun kecepatan penemuan senyawa baru dari aktinomisetes darat akhir-akhir ini menurun, karena telah terjadi re-isolasi substansi yang telah diketahui (Fenical et al. 1999). Menurunnya penemuan senyawa baru dari aktinomisetes darat, membuat banyak ilmuwan dan peneliti mulai fokus pada aktinomisetes dari beragam lingkungan ekstrem untuk menapis kemampuan aktinomisetes dalam menghasilkan metabolit sekunder baru (Valli et al. 2012).

Lebih dari 70% permukaan bumi tertutup oleh lautan dan kehidupan di bumi berasal dari laut. Beberapa ekosistem laut, seperti laut dalam dan terumbu karang, mempunyai keanekaragaman hayati yang lebih tinggi daripada hutan hujan tropis (Haefner 2003). Lam (2006) menyatakan bahwa lingkungan laut berbeda sekali dengan lingkungan darat, sehingga dapat dipastikan bahwa aktinomisetes laut sangat berbeda karakteristiknya dengan aktinomisetes darat. Oleh karena itu dimungkinkan bahwa aktinomisetes laut juga menghasilkan senyawa bioaktif yang berbeda dari

aktinomisetes darat. Aktinomisetes laut mampu beradaptasi dari lingkungan bertekanan tinggi (dengan maksimum hingga 1,100 atm) dan anaerob pada temperatur 0-8 °C di dasar laut, hingga lingkungan berasam tinggi (sampai pH 2,8) pada temperatur 100 °C dekat *hidrothermal vent* di pegunungan bawah laut (Lam 2006). Dengan kondisi lingkungan yang berbeda, potensi keragaman genetik maupun metabolit aktinomisetes laut diharapkan akan berbeda pula. Lingkungan laut adalah sumber keragaman aktinomisetes baru yang belum termanfaatkan (Bull et al. 2005; Stach et al. 2003), demikian pula metabolit barunya (Jensen et al. 2005; Fiedler et al. 2005).

Penelitian mengenai aktinomisetes yang diisolasi dari sampel yang diambil dari laut dalam terus berkembang di dunia. Berkaitan dengan keragaman aktinomisetes laut, pada tahun 1984, Helmke dan Weyland (1984) menyatakan hanya ada satu spesies aktinomisetes laut yaitu, *Rhodococcus marinonascens* yang diisolasi dari sampel sedimen laut dari bagian Timur Laut Samudra Atlantik pada kedalaman 1.400 m. Kemudian dalam perkembangan penelitian, ditetapkan ada tiga taksa utama, yaitu genera *Micromonospora*, *Rhodococcus* dan *Streptomyces* dari sedimen laut (Goodfellow & Haynes 1984). Pathom-aree et al. (2006) telah berhasil mengisolasi genera *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Tsukamurella*, dan *Williamsia* dari Mariana Trench dengan kedalaman 10.898 m. Selanjutnya Bredholdt et al. (2007) menyatakan bahwa meskipun predominan genera di Trondheim fjord Norway adalah *Streptococcus* dan *Micromonospora*, namun telah berhasil diisolasi pula *Actinocoralia*, *Actinomadura*, *Knoellia*, *Glycomyces*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Nonomurea*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus* dan *Streptosporangium*. Luo et al. (2011) juga telah menemukan *Streptomyces indicus* sp. nov. dari sedimen laut dalam Indian Ocean pada kedalaman 2.434 meter.

Baru-baru ini telah ditemukannya aktinomisetes jenis baru dari lingkungan pesisir Indonesia yaitu *Tropicohabitans flavus* gen. nov.

sp. dan *Serinibacter tropicus* sp. nov. yang diisolasi dari mangrove di Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu, Indonesia (Hamada et al. 2015a; Hamada et al. 2015b). Walaupun penelitian mengenai keragaman aktinomisetes dari laut di Indonesia dan metabolit sekunder yang dihasilkan sudah dilakukan, namun masih perlu diteliti keanekaragamannya karena laut Indonesia demikian luas dan cara isolasi mikrob yang berbeda akan menghasilkan jenis mikrob yang berbeda pula. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengungkapkan keanekaragaman hayati aktinomisetes yang diisolasi dari sedimen laut dalam yang dikoleksi dari Selat Makassar yang merupakan Ekspedisi Widya Nusantara (EWIN).

### Metodologi

#### Lokasi Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Selat Makassar pada bulan Mei-Juni 2013 dan November 2014 di beberapa koordinat dengan menggunakan Kapal Penelitian Baruna Jaya VIII.



Sampel yang diambil untuk isolasi aktinomisetes berupa sedimen pada kedalaman laut 150-3.366 m di bawah permukaan laut (Tabel 1).

Sampel diambil dari sebagian sedimen hasil pengoperasian *Box Corer* berbobot sekitar 600 kg yang dapat meliputi dasar perairan seluas 0,5×0,6 m<sup>2</sup> di setiap stasiun pengambilan sampel.

Lima puluh mL sampel sedimen diambil dari permukaan sedimen (maksimal 5 cm dari permukaan sedimen) yang terdapat pada *Box Corer*. Sedimen yang diambil dapat berupa pasir kasar berlumpur, lumpur (lempung berlanau), pasir kasar dan pecahan karang, pasir berlumpur, dan lumpur berpasir. Sampel diambil secara aseptis dengan menggunakan sendok *stainless steel* yang disemprot dengan alkohol 70% kemudian diusap dengan kertas tisu. Sedimen kemudian dimasukkan pada tabung steril dan disimpan pada *freezer* bersuhu -20 °C di kapal selama ekspedisi (20-30 hari) dan dipindahkan ke *deep freezer* bersuhu -80 °C setelah sampai di laboratorium.

Gambar 1. Lokasi penelitian dan titik pengambilan sampel.  
Figure 1. Research location and points for collecting samples.

Tabel 1. Koordinat stasiun pengambilan sampel, kedalaman dan tipe substratnya.

Table 1. Coordinate of station of collecting samples, depth and substrate type.

No.	Station	Longitude	Latitude	Depth (meter)	Substrate type
1.	1	118.52170	-3.03347	2,166	Rough muddy sand
2.	2	118.33333	-2.50000	2,144	Mud (clay)
3.	3	118.33333	-2.00000	2,228	Mud (clay)
4.	4	119.08800	-1.43975	1,463	Mud (clay)
5.	6	118.42635	-1.26327	2,255	Mud (clay)
6.	8	117.78612	-1.09273	229	Coarse sand and coral fragments
7.	9	119.31667	-0.88333	1,325	Mud (clay)
8.	11	118.71667	-0.60333	2,411	Mud (clay)
9.	12	118.46667	-0.48333	2,379	Mud (clay)
10.	14	117.94667	-0.24167	777	Mud (clay)
11.	15	119.59833	-0.29167	966	Mud (clay)
12.	17	119.00000	0.00000	2,435	Mud (clay)
13.	19	118.47647	0.26160	2,436	Mud (clay)
14.	20	118.09548	0.258615	450	Mud (clay)
15.	21	117.92500	0.50833	861	Mud (clay)
16.	23	119.28000	0.60833	2,469	Mud (clay)
17.	24	118.97500	0.75000	566	Muddy sand
18.	25	120.06000	0.84167	1,547	Sandy mud
19.	27	119.51667	1.10000	3,135	Mud (clay)
20.	28	119.25833	1.22500	3,366	Mud (clay)
21.	29	119.008333	1.341667	150	Mud (clay)

### Isolasi, Purifikasi dan Preservasi Aktinomisetes Laut Dalam

Isolasi aktinomisetes dilakukan pada 21 sampel menggunakan tiga metode, yaitu Metode Dilusi Langsung (*Direct Dillution (DD) Method*), Metode Sodium Dodesil Sulfat-Ekstrak Ragi (*Sodium Dodecyl Sulphate-Yeast Extract (SDS-YE) Method*) (Hayakawa et al. 2000), dan Metode Rehidrasi-Sentrifugasi (*Rehydration-Centrifugation (RC) Method*) (Hayakawa & Nonomura 1989). Medium isolasi yang digunakan ada 2 yaitu, Medium NBRC 802 (Hamada et al. 2013a) dan Medium Actinomycetes Isolation Agar (AIA, Hymedia, India). Semua medium untuk isolasi ditambah dengan antibiotik nalidixic acid dan cycloheximide untuk menekan pertumbuhan bakteri Gram negatif dan jamur (Hayakawa et al. 1996). Pengenceran yang dilakukan adalah  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-5}$ , setiap perlakuan dilakukan duplo dan seluruh biakan ditanam pada suhu optimum aktinomisetes, yaitu antara 25-35 °C (Ratnakomala et al. 2016).

Mikrob yang tumbuh kemudian diamati secara kasat mata dan menggunakan mikroskop cahaya untuk melihat morfologi koloni dan untuk

membedakan aktinomisetes dengan mikrob lainnya. Aktinomisetes kemudian dimurnikan menggunakan media tumbuhnya dan selanjutnya dilakukan pengamatan ulang menggunakan mikroskop cahaya. Jika benar merupakan morfologi aktinomisetes, maka isolat tersebut kemudian dipreservasi jangka pendek dengan cara ditumbuhkan pada medium tanamnya dan disimpan pada suhu 4 °C sebagai *working culture*, dan preservasi jangka panjang menggunakan 20% gliserol dan disimpan pada suhu -80 °C.

### Ekstraksi DNA

Untuk mengekstraksi DNA, isolat terpilih ditumbuhkan pada media cair sebanyak lima mL dan diinkubasi pada suhu 25-30 °C, 150 rpm selama 3 hari. *Pellet* yang dihasilkan digunakan untuk ekstraksi DNA. DNA isolat aktinomisetes terpilih diekstrak dengan menggunakan metode Ratnakomala et al. (2016).

### Analisis sekuensing gen 16S rRNA

Identifikasi molekuler dilakukan dengan menganalisis urutan basa gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan GoTaq® GreenMasterMix dan pasangan primer 27F (5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'). Komposisi reaksi PCR yang digunakan adalah 12,5 µL GoTaq® GreenMasterMix, 10 µL nuclease free water, 0,5 µL masing-masing primer (50 ng/µL), 0,5 µL DMSO dan 1 µL DNA template. Kondisi PCR untuk mengamplifikasi fragmen gen 16S rRNA ialah predenaturasi 96 °C selama satu menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50 °C selama 30 detik, *elongasi* pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik diikuti tahapan pascaelongasi pada suhu 72 °C selama 10 menit, dan terakhir pendinginan pada suhu 4 °C selama 15 menit. Proses dilakukan sebanyak 30 siklus.

Gen 16S rRNA yang telah teramplifikasi ( $\pm 1,4$  kb) dipurifikasi dan dikirim ke penyedia jasa FirstBase untuk dilakukan sekuensing. Sekuens gen 16S rRNA dari isolat-isolat terpilih kemudian disejajarkan dengan sekuens yang ada dalam database GenBank/DDBJ/EMBL dengan menggunakan program BLAST (Altschul et al. 1990) yang diakses dari website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

### Konstruksi Pohon Filogeni

Konstruksi pohon filogeni menggunakan software MEGA 3.1 (Kumar et al. 2004) setelah sebelumnya urutan basa disejajarkan dengan aktinomisetes dari basis data menggunakan software CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) menghasilkan jarak evolusioner (Kimura 1980) dan nilai similaritas. Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan *neighbour-joining* (Saitou & Nei 1987) dari nilai  $K_{nuc}$ , yaitu nilai jumlah nukleotida yang diamati. Topologi *phylogenetic tree* dievaluasi menggunakan *bootstrap re-sampling* yang digambarkan oleh Felsenstein (1985) dengan 1.000 ulangan.

## Hasil

### Identifikasi Molekuler Aktinomisetes yang Dapat Dikultur dari Sedimen Dasar Laut

Metode Dilusi Langsung, SDS-YE dan RC serta dua jenis medium, yaitu NBRC 802 dan AIA media digunakan untuk mengisolasi aktinomisetes dari sedimen dasar laut Selat Makassar. Sejumlah 36 strain aktinomisetes berhasil diisolasi dari 10 sampel yang diperoleh dari dasar laut Selat Makassar. Kode strain, asal stasiun, *top hits strain*, dan nilai *similarity* dari masing-masing strain dapat dilihat pada Tabel 2. Sampel dari Stasiun 25 paling banyak ditemukan aktinomisetes dengan menggunakan metode isolasi dilusi langsung dan media AIA.

### Keragaman Aktinomisetes yang Diperoleh di Dasar Laut Dalam

Keragaman genus aktinomisetes yang diperoleh dari dasar laut Selat Makassar dapat dilihat pada Gambar 2. Secara total, ditemukan sembilan genera aktinomisetes. Berdasarkan Gambar 2, genus yang paling banyak diisolasi dari sedimen dasar laut Selat Makassar adalah berturut-turut sebagai berikut : *Micromonospora* (21 isolat), *Verrucosipora* (5 isolat), *Streptomyces* (3 isolat), *Luteipulveratus* (2 isolat), sedangkan *Nocardopsis*, *Micrococcus*, *Gordonia*, *Kytococcus*, dan *Arthrobacter* masing-masing 1 isolat. *Micromonospora* merupakan genus yang terbanyak diisolasi dari tujuh stasiun pada sedimen di perairan tersebut. Genus *Verrucosipora* dan *Streptomyces* diisolasi dari sampel yang diambil di tiga stasiun, sedangkan genus *Luteipulveratus* diisolasi dari satu stasiun.

Berdasarkan stasiun tempat dimana sampel sedimen diambil, jumlah aktinomisetes yang berhasil didapatkan ditampilkan pada Gambar 3. Aktinomisetes berhasil diisolasi hanya dari 10 sampel sedimen dari 21 stasiun pengambilan sampel. Pada saat proses isolasi, serial pengenceran yang dilakukan adalah dari  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-5}$ . Namun, aktinomisetes tidak ditemukan pada 11 sampel. Pada sampel tersebut hanya ditemukan koloni bakteri yang setelah dilihat di bawah mikroskop, koloni tersebut bukan merupakan koloni aktinomisetes. Jumlah aktinomisetes terbanyak ditemukan di Stasiun 25 sebanyak 18 strain, diikuti di Stasiun 15 sebanyak 7 strain, Stasiun 21 sebanyak 3 isolat, dan Stasiun 3 sebanyak 2 isolat. Selain stasiun tersebut, hanya ditemukan satu isolat.

Stasiun 25 merupakan stasiun dengan kedalaman 1.547 meter di bawah permukaan laut, sedangkan Stasiun 15 dengan kedalaman 966 m, Stasiun 21 kedalaman 861, dan Stasiun 3 dengan kedalaman 2.228 dari atas permukaan laut. Di Stasiun 27 yang paling dalam, hanya berhasil didapatkan satu strain aktinomisetes.

### Pohon Filogeni dari 9 Genus Aktinomisetes yang Diperoleh

Pohon filogeni genus *Micromonospora* ditampilkan pada Gambar 4, yang memperlihatkan bahwa 21 strain pada penelitian ini tersebar di dalam genus *Micromonospora*. Pohon filogeni dari genus *Verrucosipora* dan *Gordonia* ditampilkan pada Gambar 5. Lima strain dari penelitian ini masuk dalam kluster Genus *Verrucosipora* dan satu strain masuk dalam kluster genus *Gordonia*. Pohon filogeni dari genus *Luteipulveratus* dan *Arthrobacter* ditampilkan pada Gambar 6. Dua strain (MACMK 70 dan MAMCK 75) dari

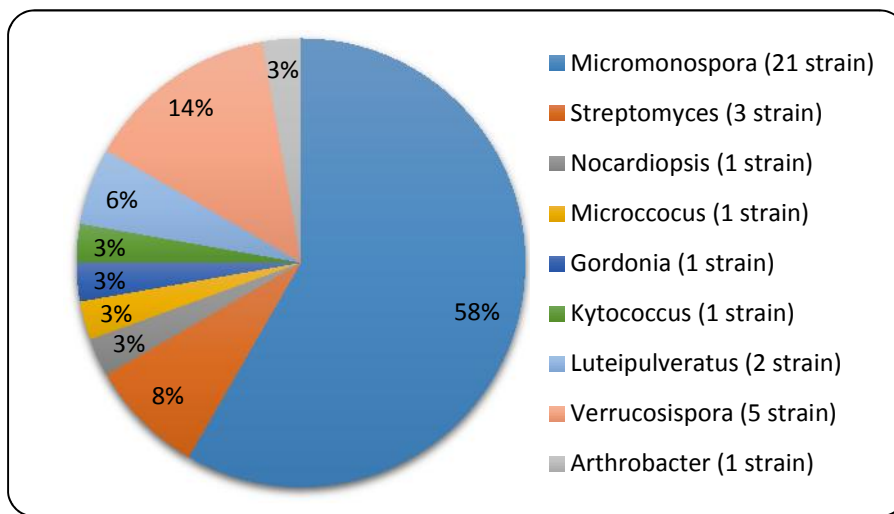
penelitian ini masuk dalam kluster Genus *Luteipulveratus* dan 1 strain (MACMK 57) masuk dalam kluster genus *Arthrobacter*. Pohon filogeni dari genus *Micrococcus* dan *Kytococcus* ditampilkan pada Gambar 7. Satu strain (MACMK 14) dari penelitian ini masuk dalam kluster Genus *Micrococcus* dan satu strain (MACMK 80) masuk dalam kluster genus *Kytococcus*. Pohon filogeni dari genus *Streptomyces* ditampilkan pada Gambar 8. Tiga strain (MACMK 43, MACMK 56, MACMK 58) dari penelitian ini masuk dalam kluster Genus *Streptomyces*. Pohon filogeni dari genus *Nocardiopsis* ditampilkan pada Gambar 9. Satu strain (MACMK 20) dari penelitian ini masuk dalam kluster Genus *Nocardiopsis*.

Tabel 2. Identifikasi molekuler aktinomisetes dari dasar laut dalam Selat Makassar berdasarkan analisis sekuen gen 16S rRNA

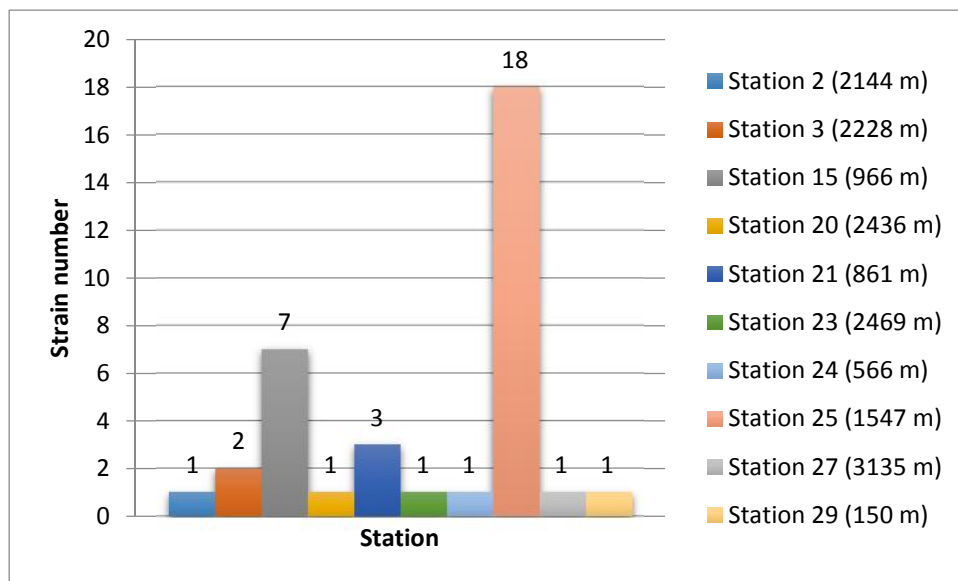
Table 2. Molecular identification of actinomycetes from deepsea floor of Makassar Strait based on 16S rRNA gene sequence analysis

No.	Station	Strain	Isolation Technique	Isolation Medium	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)
1.	2	MACMK-19	RC	802	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.18
2.	3	MACMK-74	SDS	802	<i>Verrucospora gifhornensis</i>	DSM 44337 <sup>T</sup>	99.86
3.	3	MACMK-77	DD	AIA	<i>Micromonospora terminaliae</i>	TMS7 <sup>T</sup>	99.26
4.	15	MACMK-37	DD	AIA	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>	99.64
5.	15	MACMK-43	DD	AIA	<i>Streptomyces violascens</i>	ISP 5183 <sup>T</sup>	97.58
6.	15	MACMK-53	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.35
7.	15	MACMK-55P	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.42
8.	15	MACMK-55C	DD	AIA	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>	99.64
9.	15	MACMK-57	DD	AIA	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	CH7 <sup>T</sup>	99.77
10.	15	MACMK-81	DD	AIA	<i>Micromonospora maritima</i>	D10-9-5 <sup>T</sup>	100.00
11.	20	MACMK-14	RC	AIA	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	YIM 65004 <sup>T</sup>	99.78
12.	21	MACMK-58	DD	AIA	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i>	NRRL B-1773 <sup>T</sup>	99.64
13.	21	MACMK-60	DD	AIA	<i>Verrucospora gifhornensis</i>	DSM 44337 <sup>T</sup>	99.18
14.	21	MACMK-61	DD	AIA	<i>Micromonospora wenchangensis</i>	CCTCC AA 2012002 <sup>T</sup>	100.00
15.	23	MACMK-52	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.27
16.	24	MACMK-56	DD	AIA	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i>	NBRC 3714 <sup>T</sup>	98.92
17.	25	MACMK-09	DD	AIA	<i>Gordonia didemni</i>	B204 <sup>T</sup>	98.52
18.	25	MACMK-20	DD	AIA	<i>Nocardiopsis alba</i>	DSM 43377 <sup>T</sup>	99.93
19.	25	MACMK-25	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	98.52
20.	25	MACMK-32	DD	802	<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 <sup>T</sup>	98.83
21.	25	MACMK-08	DD	AIA	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>	99.71
22.	25	MACMK-62	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.48
23.	25	MACMK-63	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	100.00
24.	25	MACMK-64	DD	AIA	<i>Micromonospora maritima</i>	D10-9-5 <sup>T</sup>	99.85
25.	25	MACMK-65	DD	802	<i>Verrucospora fiedleri</i>	MG-37 <sup>T</sup>	99.56
26.	25	MACMK-66	DD	802	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>	99.71
27.	25	MACMK-67	DD	802	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 <sup>T</sup>	99.71

28.	25	MACMK-68	DD	802	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.35
29.	25	MACMK-69	DD	802	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.11
30.	25	MACMK-70	DD	AIA	<i>Luteipulveratus halotolerans</i>	C296001 <sup>T</sup>	99.93
31.	25	MACMK-71	DD	AIA	<i>Verrucosipora gifhornensis</i>	DSM 44337 <sup>T</sup>	99.71
32.	25	MACMK-72	DD	AIA	<i>Verrucosipora gifhornensis</i>	DSM 44337 <sup>T</sup>	99.85
33.	25	MACMK-75	DD	AIA	<i>Luteipulveratus halotolerans</i>	C296001 <sup>T</sup>	100.00
34.	25	MACMK-80	DD	802	<i>Kytococcus sedentarius</i>	DSM 20547 <sup>T</sup>	99.78
35.	27	MACMK-54	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	94.73
36.	29	MACMK-73	DD	AIA	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	DSM 45142 <sup>T</sup>	99.49

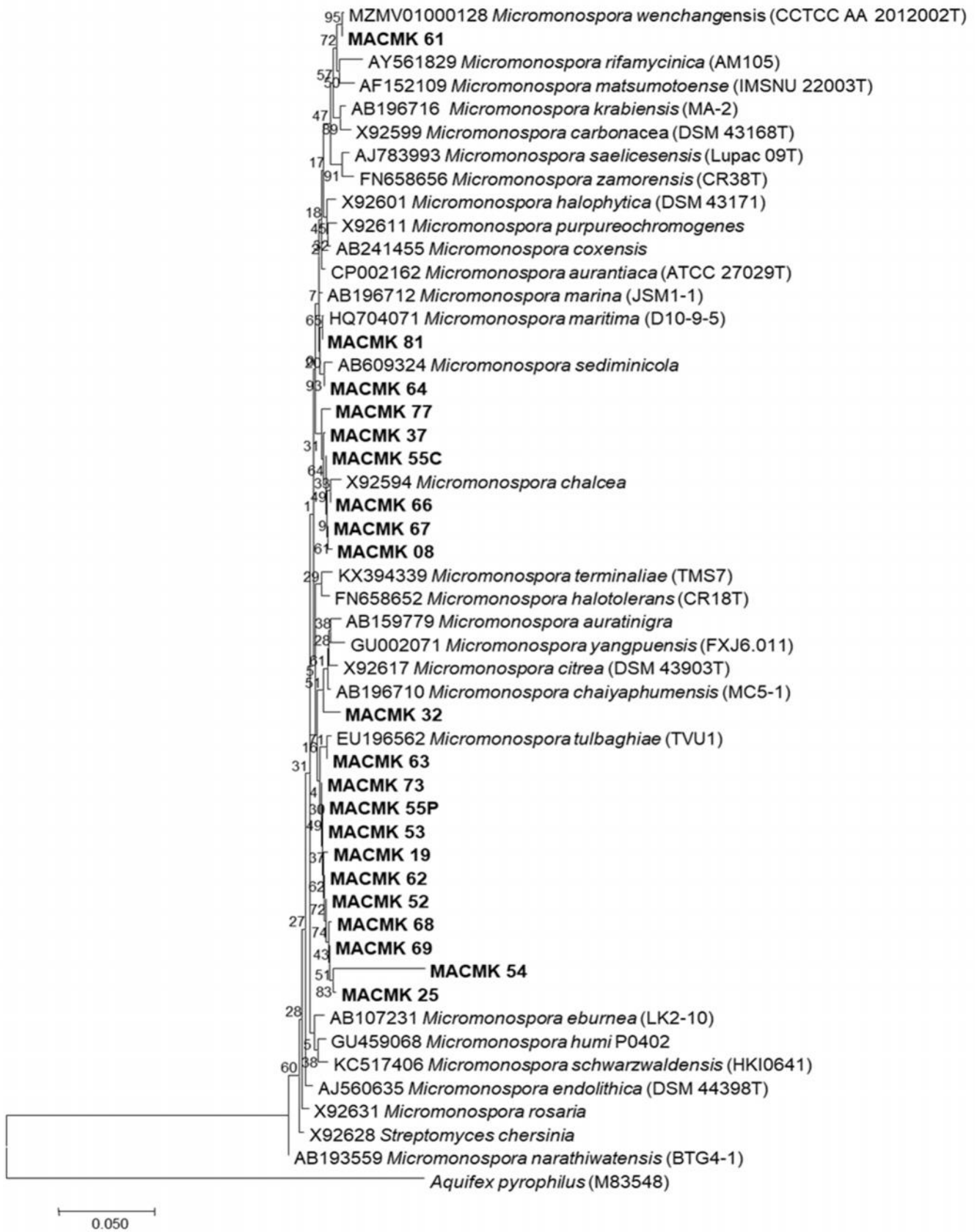


Gambar 2. Keragaman genus aktinomisetes yang ditemukan di dasar laut dalam Selat Makassar.  
 Figure 2. Genus diversity of actinomycetes found from deepsea floor of Makassar Strait.



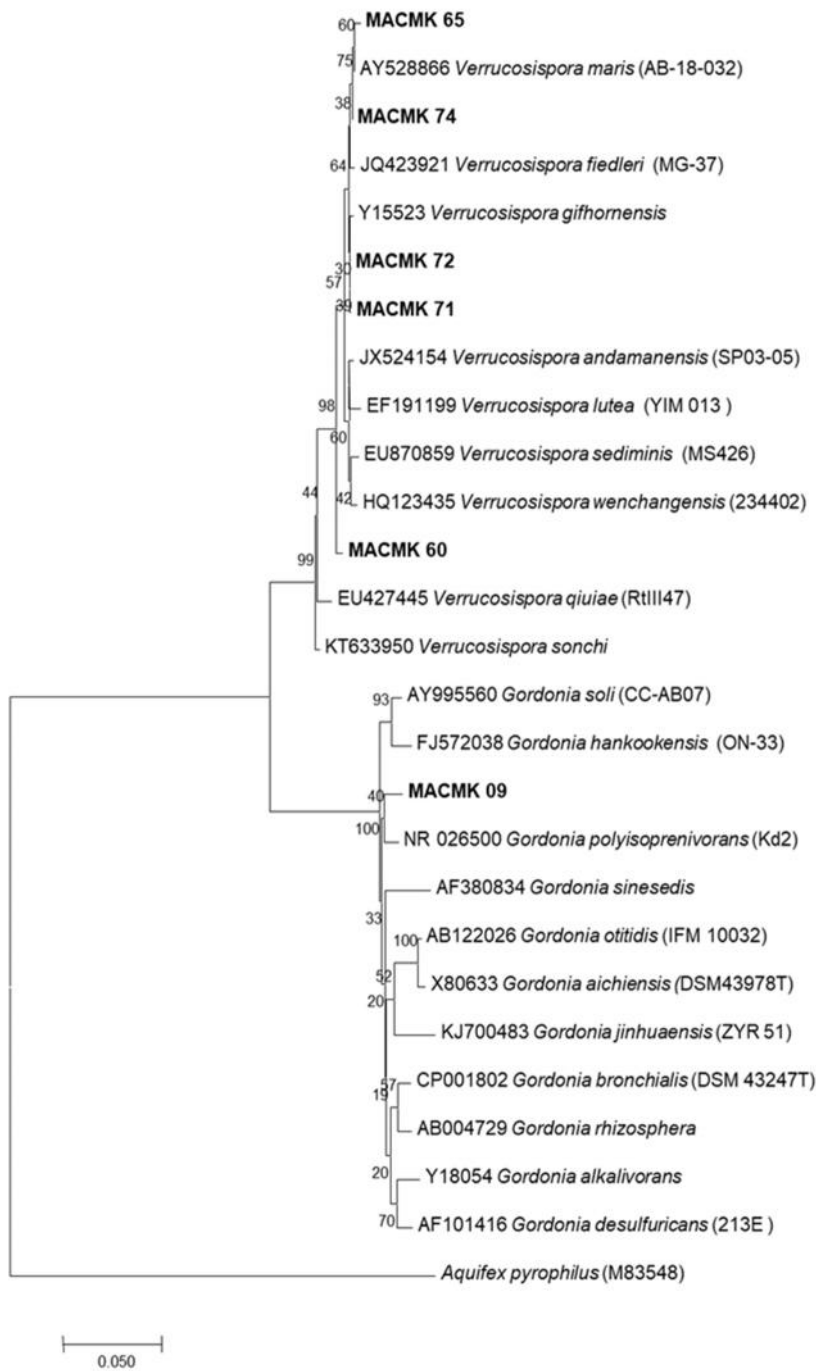
Gambar 3. Jumlah strain aktinomisetes yang berhasil diisolasi pada setiap stasiun.  
 Figure 3. The number of strains isolated on each station.





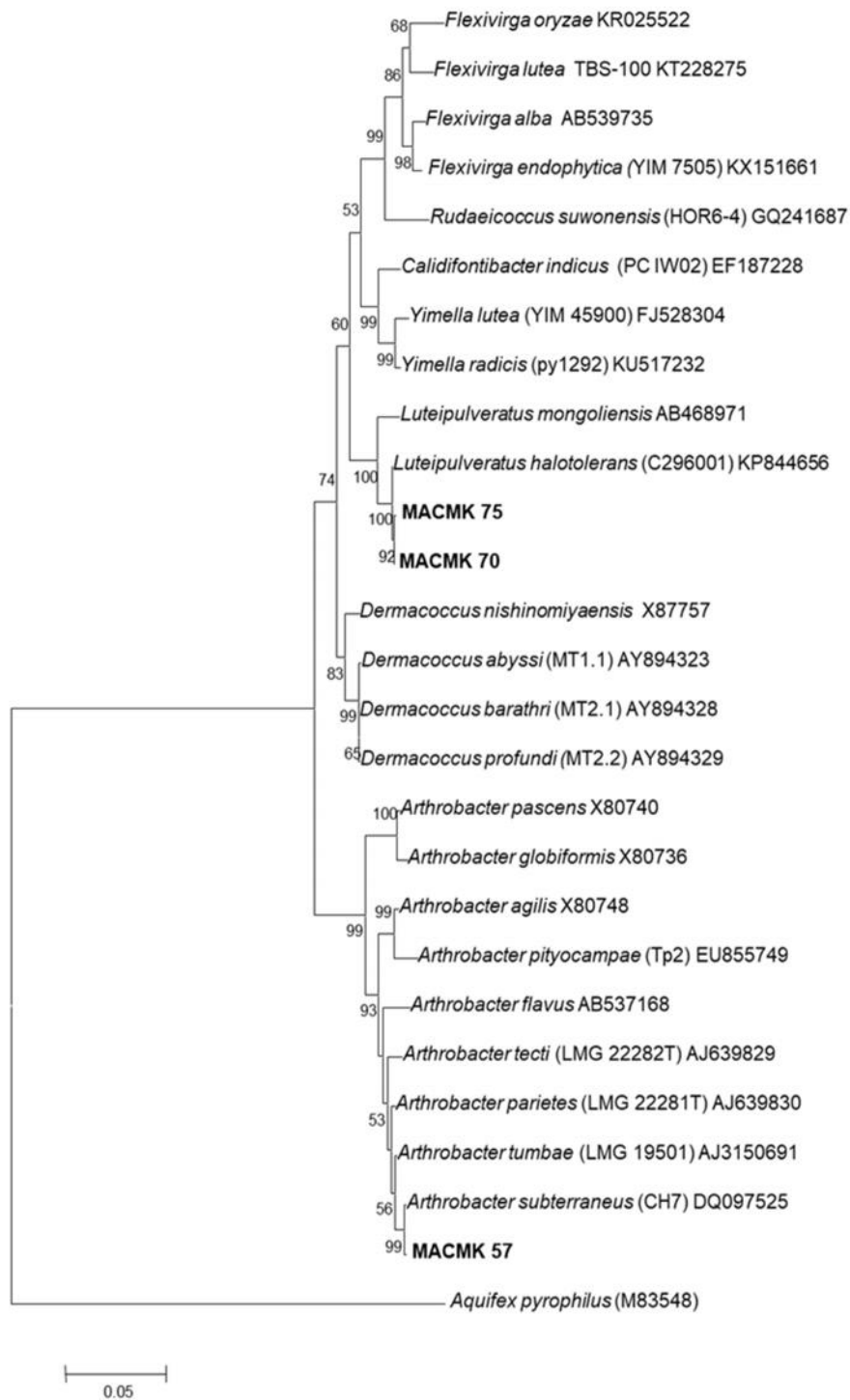
Gambar 4. Pohon filogeni berdasarkan analisis NJ dari sekuen gen 16S rRNA dari strain dan semua spesies pada genus *Micromonospora*.

Figure 4. Phylogenetic tree based on NJ analysis of 16S rRNA gene sequence of the strains and all species in the genus *Micromonospora*

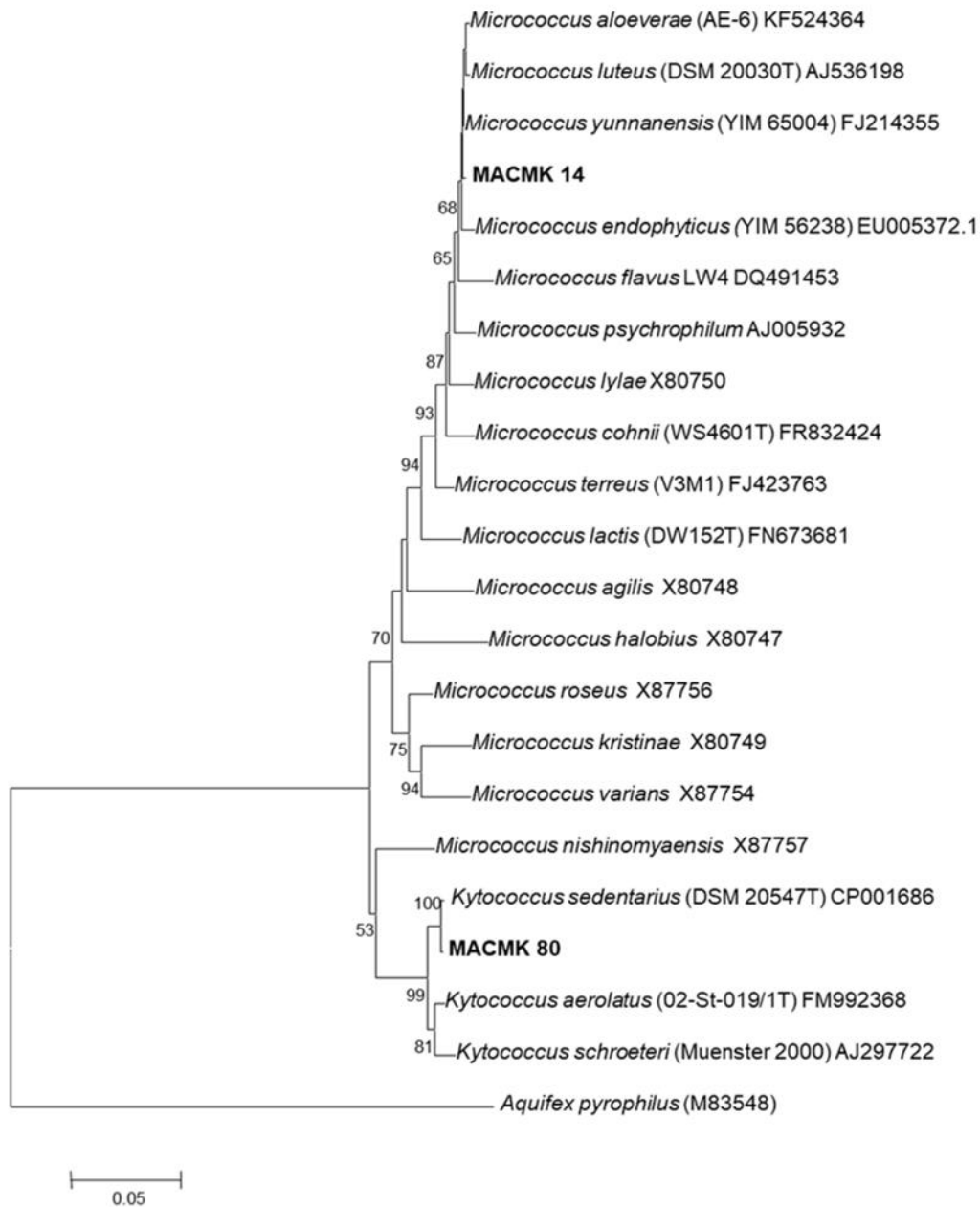


Gambar 5. Pohon filogeni berdasarkan analisis NJ dari sekuen gen 16S rRNA dari strain dan semua spesies pada genus *Verrucosipora* dan *Gordonia*.

Figure 5. Phylogenetic tree based on NJ analysis of 16S rRNA gene sequence of the strains and all species in the genus *Verrucosipora* and *Gordonia*

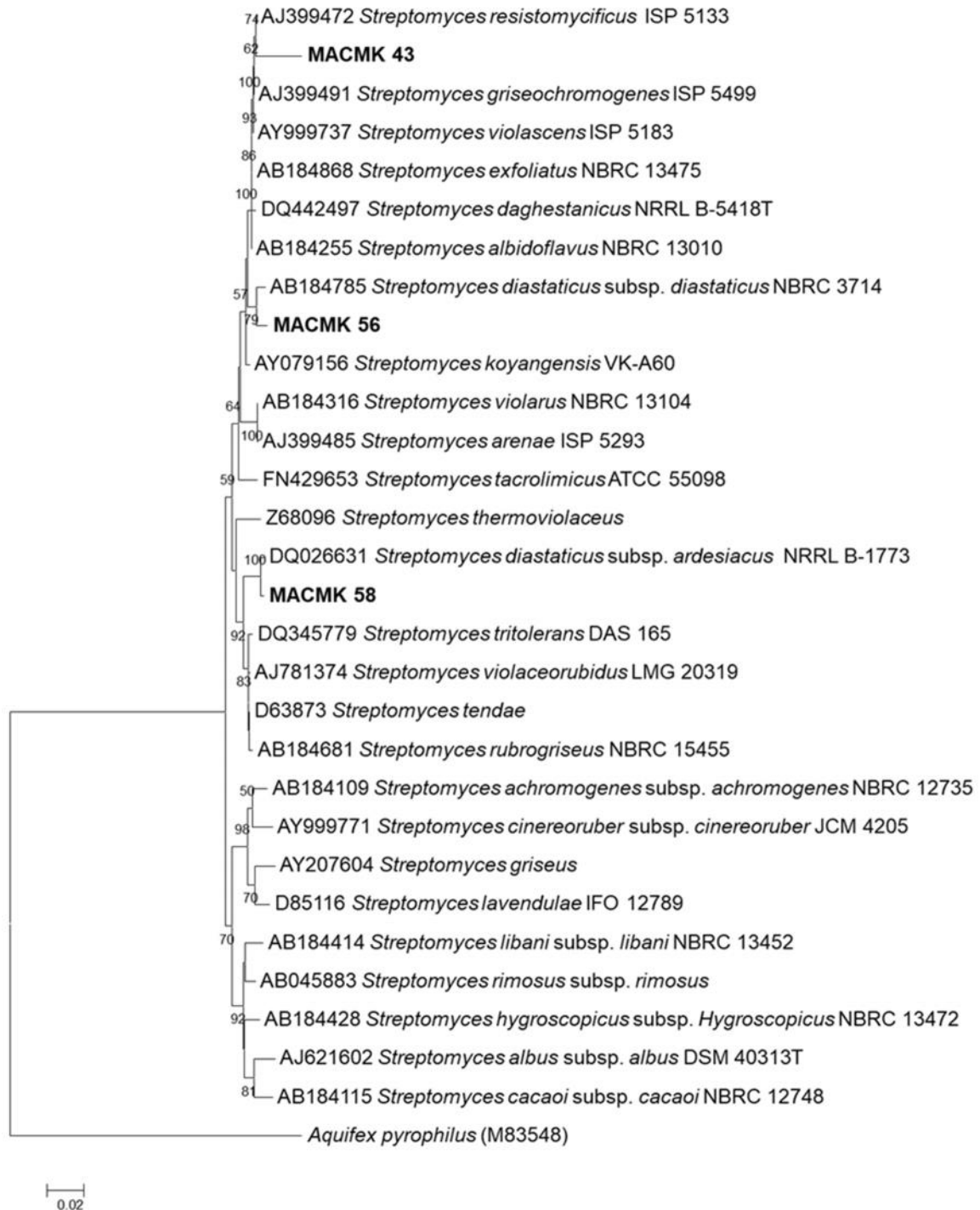


Gambar 6. Pohon filogeni berdasarkan analisis NJ dari sekuen gen 16S rRNA dari strain dan semua spesies pada genus *Luteipulveratus* dan *Arthrobacter*.  
 Figure 6. Phylogenetic tree based on NJ analysis of 16S rRNA gene sequence of the strains and all species in the genus *Luteipulveratus* dan *Arthrobacter*



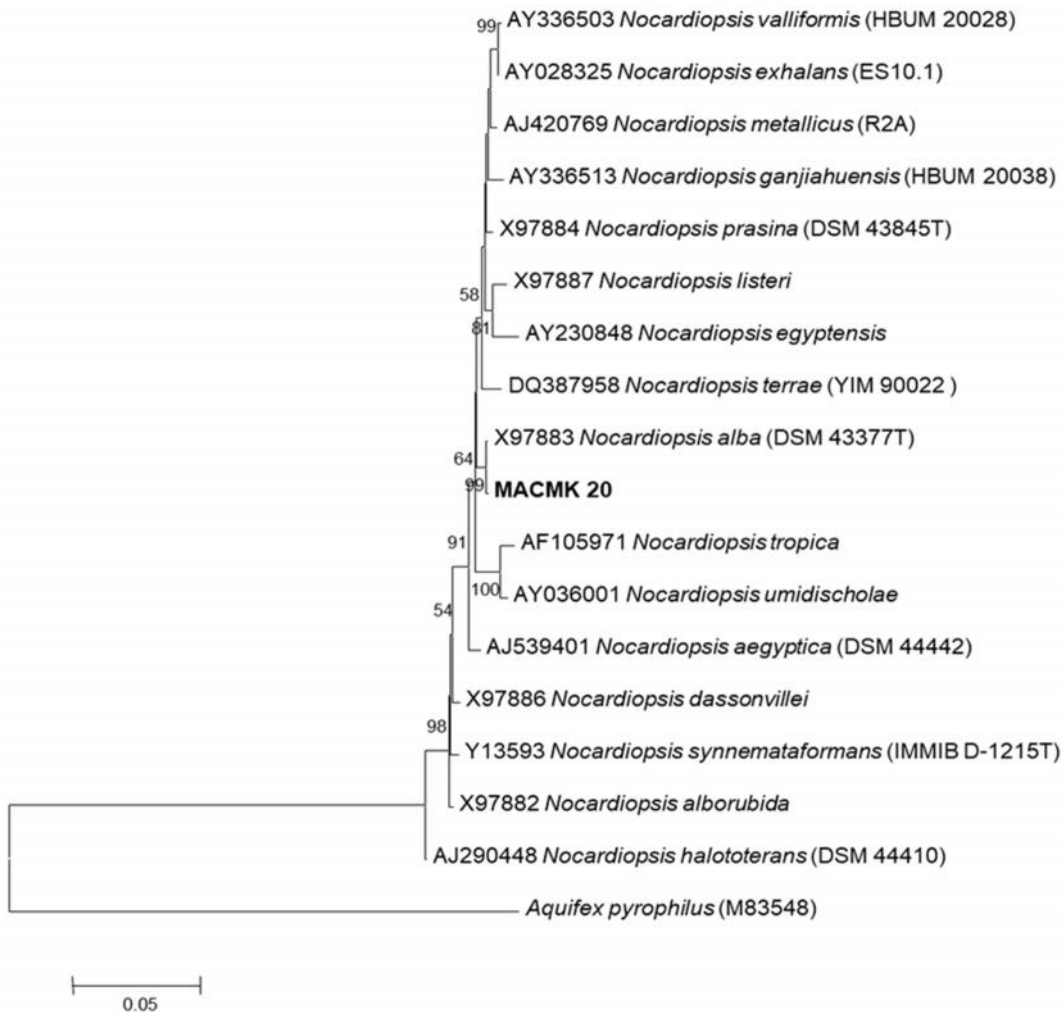
Gambar 7. Pohon filogeni berdasarkan analisis NJ dari sekuen gen 16S rRNA dari strain dan semua spesies pada genus *Micrococcus* dan *Kytococcus*.

Figure 7. Phylogenetic tree based on NJ analysis of 16S rRNA gene sequence of the strains and all species in the genus *Micrococcus* and *Kytococcus*.



Gambar 8. Pohon filogeni berdasarkan analisis NJ dari sekuen gen 16S rRNA dari strain dan semua spesies pada genus *Streptomyces*.

Figure 8. Phylogenetic tree based on NJ analysis of 16S rRNA gene sequence of the strains and all species in the genus *Streptomyces*



Gambar 9. Pohon filogeni berdasarkan analisis NJ dari sekuen gen 16S rRNA dari strain dan semua spesies pada genus *Nocardiopsis*.

Figure 9. Phylogenetic tree based on NJ analysis of 16S rRNA gene sequence of the strains and all species in the genus *Nocardiopsis*.

## Pembahasan

### Isolasi Aktinomisetes dari Sampel Sedimen Dasar

Hanya 10 sampel sedimen dari 21 sampel yang menunjukkan terdapat koloni aktinomisetes, sementara pada sebelas sampel yang lain tidak ditemukan koloni aktinomisetes. Seperti disebutkan dalam metode penelitian, proses isolasi aktinomisetes dalam penelitian ini telah digunakan tiga metode isolasi yaitu, *DD Method*, *SDS-YE Method*, dan *RC Method* serta dua media isolasi, yaitu NBRC 802 dan AIA medium. Proses isolasi aktinomisetes dilakukan pada 21 sampel dari 21

stasiun. Pada setiap kombinasi metode, media, dan juga serial pengenceran, dilakukan pengulangan 2 kali (duplo). Tabel 2 memperlihatkan terdapat dua jenis aktinomisetes berhasil diisolasi dengan teknik *RC* (5,56%), yaitu *Micromonospora tulbaghia* dan *Micrococcus yunnanensis*, dan satu isolat dengan teknik *SDS-YE* (2,78%), yaitu *Verrucosipora gifhornensis*, sedangkan 33 strain yang lain diperoleh dengan teknik *DD* (91,67%). Jenis media juga memengaruhi jenis aktinomisetes yang terisolasi. Pada penelitian ini diperoleh 9 strain (25%) dapat diisolasi menggunakan media NBRC 802, sementara 27 isolat lainnya (75%) diisolasi menggunakan media AIA. Cara isolasi

mikrob sangat menentukan mikrob yang didapatkan. Kombinasi metode isolasi, media isolasi dan sumber sampel, sangat memengaruhi jenis mikrob yang dapat diisolasi (Lisdiyanti et al. 2010; 2012, Ratnakomala et al. 2016).

Dari sedimen di 10 stasiun yang berhasil diisolasi aktinomisetes, yang paling dangkal adalah Stasiun 29 dengan kedalaman 150 m di bawah permukaan laut dan yang paling dalam adalah Stasiun 27 dengan kedalaman 3.135 m di bawah permukaan laut. Ini menunjukkan laut Makassar sangat bervariasi kedalaman dasar lautnya. Jenis sedimen juga bervariasi dari jenis pasir kasar dan pecahan karang, pasir kasar berlumpur, pasir berlumpur, lumpur berpasir, dan lumpur. Pada sampel yang diambil dari Stasiun 25 dengan kedalaman 1.547 m, diperoleh 18 strain aktinomisetes dengan menggunakan metode isolasi Dilusi Langsung baik menggunakan media NBRC 802 maupun AIA. Dari 18 strain, 10 strain diidentifikasi molekuler berdasarkan analisis 16S rRNA gen sebagai genus *Micromonospora*, 3 strain sebagai *Verrucosipora*, 2 strain sebagai *Luteipulveratus*, 1 strain sebagai *Gordonia*, 1 strain sebagai *Nocardiopsis*, dan 1 strain sebagai *Kytococcus*.

Selain media dan metode yang digunakan, faktor fisik juga memengaruhi proses isolasi aktinomisetes. Pada penelitian ini, suhu yang digunakan untuk mengisolasi aktinomisetes merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan yaitu antara 25-30 °C (Ratnakomala et al. 2016), bukan suhu yang sesuai dengan habitat (suhu *in situ*). Hal ini dilakukan dengan pertimbangan ekonomis, karena untuk tujuan industri farmasi dibutuhkan aktinomisetes yang dapat tumbuh dengan faktor pertumbuhan yang mudah dan tidak membutuhkan teknik isolasi dan fermentasi yang mahal. Gambar 10 menunjukkan hubungan antara kedalaman dan suhu *in situ* pada masing-masing stasiun pengambilan sampel. Gambar tersebut menunjukkan bahwa pada kedalaman lebih dari 2.000 meter maka suhu di dasar laut berkisar antara 3,9 – 4,2 °C, sedangkan pada kedalaman antara 450 m - >1.000 m maka suhu berkisar antara 6,2 – 8,5 °C, dan pada kedalaman antara 100 - >200 m maka kisaran suhunya antara 16 – 17 °C. Perubahan suhu di dasar laut dipengaruhi oleh penetrasi sinar matahari terhadap dasar laut. Kedalaman suatu perairan akan membatasi penetrasi cahaya matahari yang secara langsung membatasi kehidupan biota dasar. Penyerapan cahaya matahari berkurang secara cepat sesuai dengan makin tingginya kedalaman lautan (Nybakken 1988). Perbedaan suhu isolasi tersebut diperkirakan merupakan salah satu faktor yang memengaruhi

banyak/sedikitnya aktinomisetes yang dapat diisolasi dari sedimen dasar laut Selat Makassar.

### Keragaman Aktinomisetes di Dasar Laut Selat Makassar

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktinomisetes dapat diisolasi dari berbagai kedalaman dasar laut di Selat Makassar, antara 100 hingga lebih dari 2.000 meter. Hal ini membuktikan bahwa aktinomisetes terdapat di seluruh kedalaman laut (Lam 2006). Pada sedimen dasar laut Selat Makassar telah berhasil dikultur beberapa jenis aktinomisetes sebagai berikut: *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Streptomyces*, *Luteipulveratus*, *Nocardiopsis*, *Micrococcus*, *Gordonia*, *Kytococcus*, dan *Arthrobacter*, dimana Genus *Micromonospora* adalah yang paling dominan, yaitu 58 % (Gambar 2).

*Micromonospora* telah berhasil diisolasi oleh beberapa peneliti dari berbagai habitat laut dalam. Goodfellow & Haynes (1984) yang pertama kali menetapkan bahwa *Micromonospora* merupakan salah satu dari tiga taksa utama aktinomisetes yang berhasil diisolasi dari sedimen laut. Selanjutnya Pathom-aree et al. (2006) mampu mengisolasi *Micromonospora* dari Mariana Trench pada kedalaman 10.898 m, Bredholdt et al. (2007) juga telah menemukan bahwa predominasi genera aktinomisetes laut dari Trondheim fjord Norway adalah *Streptomyces* dan *Micromonospora*. Gartner et al. (2016) telah mengisolasi 21 isolat *Micromonospora* dari laut dalam Eastern Mediterranean, yaitu dari Ierapetra Basin (4.400 m) dan Herodotos Plain (2.800 m) dan mayoritas isolat *Micromonospora* tersebut (90 %) mengandung sedikitnya satu klaster gen untuk biosintesis metabolit sekunder untuk *polyketide synthases* type I dan II. Determinasi aktivitas biologi dari ekstrak kultur memperlihatkan hampir setengah dari strain-strain tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Oleh karena itu isolat-isolat *Micromonospora* laut dalam dipertimbangkan kemampuannya untuk menghasilkan senyawa-senyawa antimikrob yang baru (Gartner et al. 2016). Hal ini memberikan harapan bahwa di dalam laut Selat Makassar pun mempunyai potensi sebagai sumber untuk eksplorasi aktinomisetes dan senyawa antimikrob yang baru.

Genus *Micromonospora* pertama kali dideskripsikan oleh Orskov (1923). Spesies ini tersebar luas di berbagai lingkungan seperti tanah (Hayakawa et al. 1991), tanah pasir (Tanasupawat et al. 2010), sedimen laut (Phongsopitanun et al. 2015) sponge laut (Supong et al. 2013), nodul akar atau akar (Trujillo et al. 2006; Kuncharoen et al. 2018), akar padi (Kittiwongwattana et al. 2015), daun tanaman obat (Thawai 2015), sedimen laut

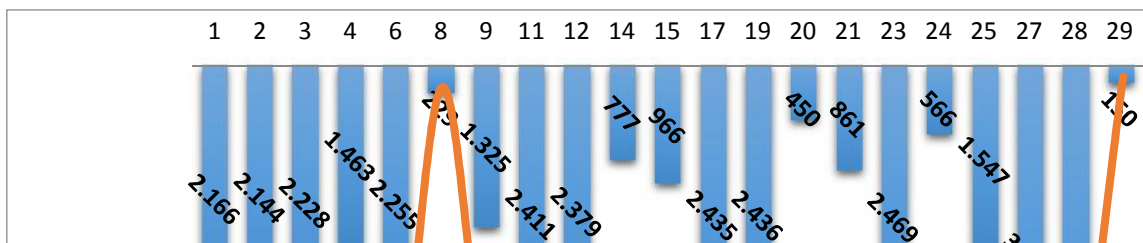
(Goodfellow & Haynes 1984; Pathom-aree 2006; Bredholdt et al. 2007; Gartner et al. 2016) dan lain sebagainya. Sampai saat ini genus *Micromonospora* terdiri atas 80 valid species (<http://www.bacterio.net/micromonospora.html>). Beberapa strains dari genus *Micromonospora* menghasilkan metabolit sekunder seperti gentamisin, netamisin, lupinacidins A-C dan tetrokrasin (Berdy 2005; Zhao et al. 2016).

Genus *Verrucosipora* merupakan genus terbanyak kedua setelah *Micromonospora* yang berhasil diisolasi dari sedimen dasar laut Selat Makassar (14%). *Verrucosipora* pertama kali dideskripsikan oleh Rheims et al. (1998) sebagai anggota family *Micromonosporaceae*. Sampai saat ini genus *Verrucosipora* terdiri atas 10 valid species (<http://www.bacterio.net/verrucosipora.html>). Beberapa strain dari genus *Verrucosipora* menghasilkan metabolit sekunder seperti abyssomicins (Bister et al. 2004) dan Proximicin A (Schneider et al. 2008), gifhornenolones A dan B (Shirai et al. 2010), proximicins A-C (Fiedler et al. 2008), thiocoraline A (Wyche et al. 2011), butrepyrazinone (Kyeremeh et al. 2014) dan brevianamide F (Huang et al. 2016).

Genus terbanyak ketiga yang berhasil diisolasi dari sedimen dasar laut Selat Makassar adalah *Streptomyces*, yaitu sebanyak 8%. Ketiga strain *Streptomyces* yang berhasil diisolasi dari sedimen dasar laut Selat Makassar ditemukan pada stasiun yang berada di pesisir, yaitu stasiun 15 (966 m), stasiun 21 (861 m) dan stasiun 24 (566 m), pada kedalaman kurang dari 1,000 meter. Hal ini memperkuat keyakinan bahwa hampir sebagian besar *Streptomyces* berasal dari darat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Bredholdt et al. (2007) di perairan Trondheim Fjord, ditemukan

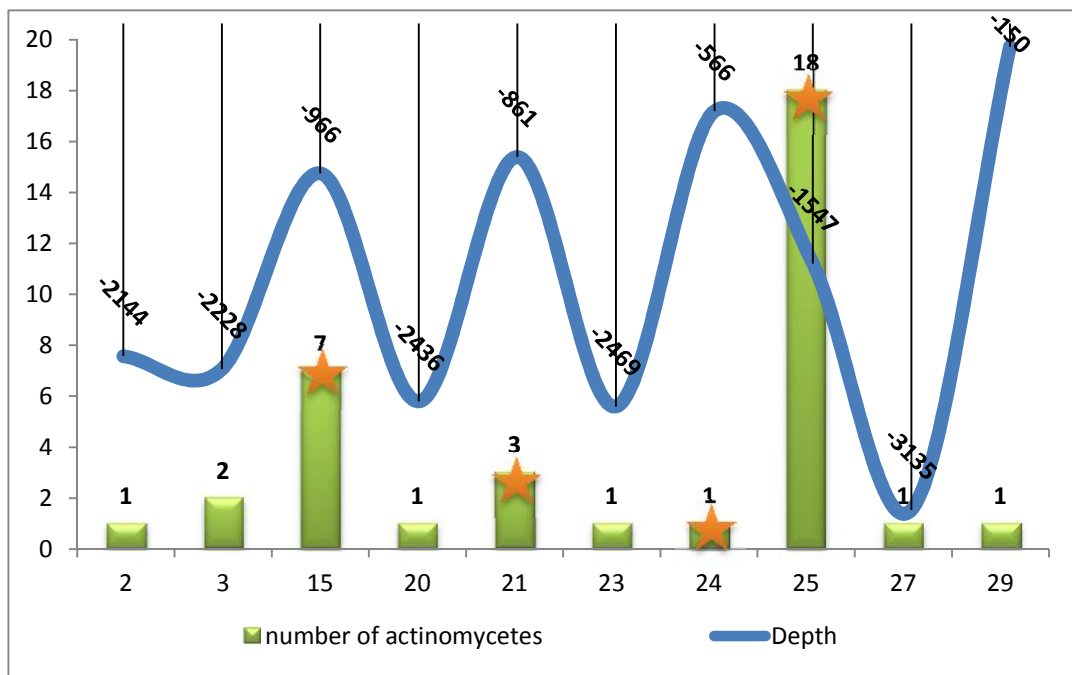
bahwa jumlah relatif *Streptomyces* tergantung pada kedalaman sedimen dikoleksi. Semakin dalam sedimen diambil, semakin sedikit jumlah *Streptomyces* yang dapat diisolasi. Trend yang sama juga telah diobservasi oleh Weyland (1981) dan Jensen et al. (1991). Walaupun demikian, tidak menutup kemungkinan *Streptomyces* dapat pula diisolasi dari sedimen laut dalam, seperti *Streptomyces indicus* sp. nov. yang diisolasi dari sedimen laut dalam Indian Ocean pada kedalaman 2.434 m (Luo et al. 2011), *Streptomyces* sp 12A35 dari kedalaman 2.134 m Laut Cina Selatan (Pan et al. 2013), *Streptomyces scopuliridis* dari kedalaman 3.536 m Laut Cina Selatan (Song et al. 2014), *Streptomyces cavourensis* NA4 dari kedalaman 1.464 m Laut Cina Selatan (Pan et al. 2015) dan *Streptomyces* sp. SCSIO 11594 dari kedalaman 2.403 m Laut Cina Selatan (Song et al. 2015). Bahkan strain-strain dari Laut Cina Selatan tersebut teruji menghasilkan senyawa antimikrob yang telah dilaporkan, di antaranya Lobophorins H & I, D. sotamides B-D, Bafilomycins B1 & C1 serta Dehydroxy-aquayamycins.

Gambar 11 menggambarkan hubungan antara kedalaman laut di Selat Makassar dengan jumlah aktinomisetes yang berhasil diisolasi pada sedimen di kedalaman tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan semakin dalam dasar laut, semakin sedikit aktinomisetes yang dapat diisolasi. Namun tidak demikian pada stasiun 24 dan 29, karena walaupun termasuk dangkal yaitu 566 m dan 150 m, namun hanya 1 isolat aktinomisetes yang berhasil diisolasi. Tren yang kedua adalah, pada stasiun yang dekat dengan pesisir, yaitu yang bertanda (bintang), diperoleh jumlah aktinomisetes lebih banyak daripada stasiun yang berada di tengah laut.





Gambar 10. Hubungan antara kedalaman dasar laut Selat Makassar dan suhu *in situ*.  
 Figure 10. Relationship between depth of the Makassar Strait seafloor and in situ temperature



Gambar 11. Hubungan antara kedalaman laut dan jumlah aktinomisetes yang berhasil diisolasi.  
 Figure 11. Relationship between depth of Makassar Strait and isolated actinomycetes.

## Kesimpulan

Penelitian ini telah dapat mengisolasi 36 aktinomisetes dari sampel sedimen yang diambil dari laut dalam di Selat Makassar dan memberikan informasi keanekaragamannya baik dari sisi titik pengambilan sampel dan genus. Aktinomisetes dari genus *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Streptomyces*, *Luteipulveratus*, *Nocardiopsis*, *Micrococcus*, *Gordonia*, *Kytococcus*, dan *Arthrobacter* telah berhasil diisolasi dari sedimen Selat Makassar. *Micromonospora* merupakan genus yang paling banyak ditemukan (58%). Pada sedimen dari Stasiun 25 dengan kedalaman 1.547 m berhasil dikultur aktinomisetes dengan jumlah terbanyak, yaitu 18 strain yang terdiri dari 6 genus, yaitu *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Luteipulveratus*, *Nocardiopsis*, *Gordonia*, dan *Kytococcus*. Penelitian lebih lanjut tentang potensi aktinomisetes yang diperoleh, perlu dilakukan.

### Persantunan

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Pusat Penelitian Oseanografi LIPI yang telah memberi kesempatan penulis mengikuti kegiatan Ekspedisi Widya Nusantara 2013 yang merupakan kegiatan yang dibiayai oleh DIPA, LIPI melalui Kegiatan Unggulan LIPI Sub Kegiatan Ketahanan Pangan dan Obat, Pengembangan Bahan Baku Obat Berbasis Bioresources 2016, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Pusat Penelitian Biologi LIPI, khususnya Indonesian Culture Collection (InaCC) dimana penelitian ini dilakukan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Shanti Ratnakomala, Dr. Tutik Murniasih, dan Dinihari Indah Kusumawardani yang berpartisipasi dalam kegiatan penelitian yang dilakukan, juga kepada Dra. Lies Indah Sutiknowati dan Dian Alfian Nurcahyanto atas sampel sedimen EWIN 2014.

### Daftar Pustaka

Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers & DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.

Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot*, 58:1-26.

Bister B, D Bischoff, M Ströbele, J Riedlinger, A Reicke, F Wolter, AT Bull, H Zahner, HP Fiedler & RD Süßmuth. 2004. Abyssomicin C—A Polycyclic Antibiotic from a Marine *Verrucosipora* Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway. *Angew Chem. Int Ed.*, 43(19): 2574-2576.

Bredholdt H, OA Galatenko, K Engelhardt, E Fjærvik, LP Terekhova & SB Zotchev. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental microbiology*, 9(11): 2756-2764.

Bull AT, JEM Stach, AC Ward & M Goodfellow. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 65-79.

Cragg GM, DGI Kingston & DJ Newman. 2011. Development and Future Trend in Anticancer Natural Product Drug Discovery. In Cragg GM, DGI Kingston, & DJ Newman (Eds). *Anticancer Agents from Natural Products*. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Rotan, US p 699 – 728.

Felsenstein J. 1985. Confident limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 : 783-791.

Fenical W, D Baden, M Burg, CV De Goyet, JD Grimes, M Katz, NH Marcus, S Pomponi, P Rhines, P Tester & J Vena. 1999. Marine derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. *From monsoons to microbes: understanding the ocean's role in human health*, 71-86.

Fiedler HP, C Bruntner, AT Bull, AC Ward, M Goodfellow, O Potterat, C Puder & G Mihm. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 37-42.

Fiedler HP, C Bruntner, J Riedlinger, AT Bull, G Knutsen, M Goodfellow, A Jones, L Maldonado, W Pathom-Aree, W Beil & K Schneider. 2008. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosipora*. *The Journal of Antibiotics*, 61(3): 158.

Gartner, A., W Jutta & F. I. Johannes. 2016. Diversity of *Micromonospora* strains from the deep Mediterranean Sea and their potential to produce bioactive compounds. *AIMS Microbiology* 2(2):205-221.

Goodfellow M & JA Haynes. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In L. Ortiz-ortiz, L.F. Bojalil & V. Yakoleff (eds) *Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes*. Academic Press, Inc., New York, N.Y. p. 453-472.

Haefner B. 2003. Drug from deep : marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 9: 536-544.

Hamada M, C Shibata, T Tamura & K Suzuki. 2013. *Zhihengliuella flava* sp. nov., an

- actinobacterium isolated from sea sediment, and emended description of the genus *Zhihengliuella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 4760-4764.
- Hamada M, C Sibata, A Nurkanto, S Ratnakomala, P Lisdiyanti, T Tamura & K Suzuki. 2015a. *Tropicihabitans flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Cellulomonadaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107: 1299-1306.
- Hamada M, C Sibata, A Nurkanto, S Ratnakomala, P Lisdiyanti, T Tamura & K Suzuki. 2015b. *Serinibacter tropicus* sp. nov., an actinobacterium isolated from the rhizosphere of a mangrove, and emended description of the genus *Serinibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 1151-1154.
- Hayakawa M & H Nonomura. 1989. A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycetologica*, 3(2): 95-104.
- Hayakawa M, T Sadakata, T Kajiura & H Nonomura. 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(5): 320-326.
- Hayakawa M, T Takeuchi & T Yamazaki. 1996. Combined use of trimethoprim with nalidixic acid for the selective isolation and enumeration of actinomycetes from soil. *Actinomycetologica*, 10(2): 80-90.
- Hayakawa M, M Ootoguro, T Takeuchi, T Yamazaki & Y Iimura. 2000. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2): 171-185.
- Helmke E & H Weyland. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *International Journal of Systematics of Bacteriology*, 34: 127-138.
- Huang P, F Xie, B Ren, Q Wang, J Wang, Q Wang, WM Abdel-Mageed, M Liu, J Han, A Oyeleye & J Shen. 2016. Anti-MRSA and anti-TB metabolites from marine-derived *Verrucosipora* sp. MS100047. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17): 7437-7447.
- Jensen PR, R Dwight & W Fenical. 1991. Distribution of actinomycetes in near shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 1102-1108.
- Jensen PR, TJ Mincer, PG Williams & W Fenical. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 43-48.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kittiwongwattana C, D Thanaboripat, C Laosinwattana, P Koohakan, N Parinthawong & C Thawai. 2015. *Micromonospora oryzae* sp. nov., isolated from roots of upland rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 3818-3823.
- Kumar S, K Tamura & M Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.*, 5:150-163.
- Kuncharoen N, P Pittayakhajonwut & S Tanasupawat. *Micromonospora globbae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of *Globba winitii* C. H. Wright. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4) : 1-5. DOI 10.1099/ijsem.0.002625.
- Kyeremeh, K, KS Acquah, M Camas, J Tabudravu, W Houssen, H Deng & M Jaspars. 2014. Butrepyrazinone, a New Pyrazinone with an Unusual Methylation Pattern from a Ghanaian *Verrucosipora* sp. K51G. *Mar. Drugs*, 12(10): 5197-5208.
- Lam KS. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion of Microbiology*, 9: 245-251.
- Lisdiyanti P, M Ootoguro, S Ratnakomala, Y Lestari, RD Hastuti, E Triana, K Ando & Y Widyastuti . 2010. *Actinokineospora baliensis* sp. nov., *Actinokineospora cibodasensis* sp. nov. and *Actinokineospora cianjurenensis* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10): 2331-2335.
- Lisdiyanti P, T Tamura, S Ratnakomala, R Ridwan, G Kartina, Y Lestari, K Ando & Y Widyastuti. 2012. Diversity of actinomycetes from soil samples collected from Lombok island, Indonesia. *Annales Bogorienses*, 16(1): 35-40.
- Luo Y, J Xiao, Y Wang, J Xu, S Xie & J Xu. 2011. *Streptomyces indicus* sp. nov., an actinomycete isolated from deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11): 2712-2716.
- Manivasagan P, V Jayachandran, S Kannan & K See-Kwon. 2013. Marine actinobacterial metabolites: Current status and Future perspective. *Microbiological Research*, 168: 311-332.

- Mann J. 2001. Natural products as immunosuppressive agents. *Natural product reports*, 18(4), 417-430.
- Nybakken, J. W. 1988. *Biologi Laut: Suatu Pendekatan Ekologis*. PT. Gramedia, Jakarta. 580 pp.
- Oldfield C, NT Wood, SC Gilbert, FD Murray & FR Faure. 1998. Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74: 119-132.
- Orskov J. 1923. Investigations into the Morphology of the Ray Fungi. *Copenhagen: Levin and Munksgaard*. 174 pp.
- Pan HQ, SY Zhang, N Wang, ZI Li, HM Hua, JC Hu & SJ Wang. 2013. New spirotetronate antibiotics Iobophorins H and I from a South China sea derived *Streptomyces* sp. 12A35. *Mar. Drugs*, 11:3891-3901. doi : 10.3390/md11103891.
- Pan HQ, SY Yu, CF Song, N Wang, HM Hua, JC Hu & SJ Wang. 2015. Identification and characterization of the antifungal substances of a novel *Streptomyces cavourensis* NA4. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25:353-357. doi : 10.4014/jmb.1407.07025.
- Pathom-Aree W, JEM Stach, AC Ward, K Horikoshi, AT Bull & M Goodfellow. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10.898 m) from Mariana Trench. *Extremophiles*, 10: 181-189.
- Peczynska-Czoch W & M Mordarski. 1988. Actinomycete enzymes. In M Goodfellow, ST Williams, M Mordarski (Eds). *Actinomycetes in Biotechnology*. London: Academic Press p. 219-283.
- Phongsopitanun W, T Kudo, M Mori, K Shiomi, P Pittayakhajonwut, K Suwanborirux & S Tanasupawat. 2015. *Micromonospora fluostatini* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), 4417-4423.
- Ramesh, S., M Rajesh & N Mathivanan. 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produce by marine *Streptomyces fungicidicus* MML 1614. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32: 791-800.
- Ratnakomala S, P Apriliana, F Fahrurrozi, P Lisdiyanti & W Kusharyoto, 2016. Aktivitas Antibakteri Aktinomisetes Laut Dari Pulau Enggano [Antibacterial Activity of Marine Actinomycetes From Enggano Island]. *Berita Biologi*, 15(3): 275-283.
- Ratnakomala S, P Lisdiyanti & Y Widyastuti. 2016. Collection of Indonesian Actinomycetes and Its Prospect Uses. In E Sukara & P Lisdiyanti (Eds). *Exploring Indonesian Microbial Genetic Resources for Industrial Application*. LIPI Press, Jakarta. p. 31-54.
- Rheims H, P Schumann, M Rohde & E Stackebrandt. 1998. *Verrucosipora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family Micromonosporaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 1119-1127.
- Saitou, H & M. Nei. 1987. The neighbour-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 : 406-425.
- Schneider K, S Keller, FE Wolter, L Ro`glin, W Beil, O Seitz, G Nicholson, C Bruntner, J Riedlinger, HP Fiedler & RD Su`ssmuth. 2008. Proximicins A, B, and C-antitumor furan analogues of netropsin from the marine actinomycetes *Verrucosipora* induce upregulation of p53 and the cyclin kinase inhibitor p21. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47(17): 3258-3261.
- Shirai M, M Okuda, K Motohashi, M Imoto, K Furihata, Y Matsuo, A Katsuta, Y Shizuri & H Seto. 2010. Terpenoids produced by actinomycetes: isolation, structural elucidation and biosynthesis of new diterpenes, gifhornenolones A and B from *Verrucosipora gifhornensis* YM28-088. *J. Antibiot.*, 63(5): 245-250.
- Song Y, Q Li, X Liu, Y Chen, Y Zhang, A Sun, W Zhang, J Zhang, & J Ju. 2014. Cyclic hexapeptides from the deep South China Sea derived *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 active against pathogenic gram positive bacteria. *J. Nat. Prod.*, 77: 1937-1941. doi: 10.1021/np500399v.
- Song Y, G Liu, J Li, H Huang, X Zhang, H Zhang & J Ju. 2015. Cytotoxic and antibacterial Angucycline- and Prodigiosin- analogues from the deep sea derived *Streptomyces* sp. SCSIO 11594. *Mar. Drugs*, 13: 1304-1316. doi: 10.3390/md13031304.
- Stach JE, LA Maldonado, DG Masson, AC Ward, M Goodfellow and AT Bull. 2003a. Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments. *Appl. Env. Microbiol.*, 69: 6189-6200.
- Strohl WR. 2004. Antimicrobials. In Bull AT.(Ed) *Microbial Diversity and Bioprospecting*. ASM Press, Washington DC. p. 336-355.
- Supong K, C Suriyachadkun, P Pittayakhajonwut, K Suwanborirux & C Thawai. 2013. *Micromonospora spongicola* sp. nov., an

- actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. *J. Antibiot*, 66: 505–509.
- Tanasupawat S, S Jongrungruangchok & T Kudo. 2010. *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60: 648–652.
- Thawai C. 2015. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *Int J Syst. Evol. Microbiol.*, 65: 1456–1461.
- Thompson JD, DG Higgins and TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W.: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22: 4673–4680.
- Trujillo ME, RM Kroppenstedt, P Schumann, L Carro & E Martínez Molina. 2006. *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int J Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 2381–2385.
- Valli S, SS Suvathi, OS Aysha, P Nirmala, KP Vinoth & A Reena. 2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2(6): 469–473.
- Weyland H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Zentralbl Bacteriol. Supplement*, 11: 185–193.
- Widawati S, S Suliasih, H Latupapua & A Sugiharto. 2005. Biodiversity of Soil Microbes from Rhizosphere at Wamena Biological Garden (WBiG), Jayawijaya, Papua. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 6(1): 6–11.
- Wyche TP, Y Hou, D Braun, HC Cohen, MP Xiong & TS Bugni. 2011. First natural analogs of the cytotoxic thiodepsipeptide thiocoraline A from a marine *Verrucosipora* sp. *J. Org. Chem.*, 76(16): 6542–6547.
- Zhao J, L Guo, C Liu, Y Zhang, X Guan, J Li, S Xu, W Xiang & X Wang. 2016. *Micromonospora lycii* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from wolfberry root (*Lycium chinense* Mill). *J. Antibiot.*, 69: 153–158.