

**KERAGAMAN ISOLAT ACTINOMYCETES
BERDASARKAN ANALISIS RFLP
TERHADAP GEN NRPS**

**THE DIVERSITY OF ACTINOMYCETES ISOLATES
BASED ON THE RFLP PROFILE OF NRPS GENES**

Nanik Sulistyani

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
Jl. Prof Dr. Supomo, Yogyakarta. Telp. (0274) 379418
Email : naniksulistyani@gmail.com*

Abstrak

*Actinomycetes merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang sangat penting sebagai penghasil senyawa aktif, salah satunya adalah antibiotika. Isolasi Actinomycetes dari rizosfer tanaman padi (*Oryza sativa* L) dan tanaman tin (*Ficus carica* L.) telah menghasilkan 13 isolat Actinomycetes penghasil antibiotik. Penelitian ini bertujuan mengetahui keragaman isolat berdasarkan analisis RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) terhadap gen NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase). Penelitian dilakukan dengan mengisolasi DNA isolat Actinomycetes dan dilakukan PCR terhadap gen 16SrRNA dan gen NRPS. Produk PCR terhadap gen NRPS selanjutnya dilakukan analisis RFLP menggunakan enzim HaeIII. Identifikasi keberadaan DNA, hasil PCR dan hasil RFLP dilakukan dengan elektroforesis gel agarose. Keragaman isolat dianalisis dengan analisis multivariate. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari keragaman 13 isolat Actinomycetes dapat dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu isolat 5 (kelompok 1), isolat 8 (kelompok 2), isolat 11 (kelompok 3), isolat 6,7,9 (kelompok 4) dan isolat 1,2,3,4,10,12,13 (kelompok 5).*

Kata Kunci : *Actinomycetes, antibiotik, keragaman, NRPS*

Abstract

Actinomycetes is one of the types of microorganisms that is essential for producing the active compounds, one of which is an antibiotic. Isolation of Actinomycetes from the rhizosphere of rice plant (Oryza sativa L) and tin plant (Ficus carica L.) has yielded 13 isolates of antibiotic-producing Actinomycetes. This study aims to determine the diversity of isolates by RFLP analysis (Restriction Fragment Length Polymorphism) of the NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase) gene. The study was carried out by isolating Actinomycetes isolate DNA and performed PCR on the 16SrRNA and NRPS genes. The RFLP analysis of the NRPS gene PCR products is then performed using the enzyme HaeIII. Identify the presence of DNA, the PCR product and RFLP results was performed by agarose gel electrophoresis. The diversity of isolates was analyzed by multivariate analysis. The results showed that the diversity of 13 isolates of Actinomycetes can be grouped into 5 groups: isolates 5 (group 1), isolates 8 (group 2), isolates 11 (group 3), isolates 6,7,9 (group 4) and isolates 1,2,3,4,10,12,13 (group 5).

Key words : *Actinomycetes, antibiotic, diversity, NRPS*

PENDAHULUAN

Munculnya berbagai patogen yang multiresisten terhadap antibiotik menjadi problem yang pelik dalam terapi klinis. Multiresistensi menyebabkan penyakit menjadi semakin parah dan bahkan menyebabkan kematian pasien. Oleh karena itu pencarian antibiotik baru merupakan hal yang harus dilakukan untuk mengatasi hal tersebut (Oskay *et al.*, 2004; Parungao *et al.*, 2007, Sulistyani dkk, 2009). Selama beberapa dekade, metabolit mikroba telah menjadi salah satu sumber utama obat baru bagi industri farmasi. Salah satu sumber mikrobial yang potensial adalah *actinomycetes* (Genilloud *et al*, 2010). Secara historis, *actinomycetes* menghasilkan jumlah terbesar calon obat antibiotik baru (Berdy, 2005).

Actinomycetes termasuk bakteri yang berbentuk batang, gram positif, bersifat anaerobik atau fakultatif. Struktur *Actinomycetes* berupa filament lembut yang sering disebut hifa atau miselia, sebagaimana yang terdapat pada fungi, memiliki konidia pada hifa yang menegak. Actinomycetes merupakan bakteri yang bereproduksi dengan pembelahan sel, rentan terhadap penisilin tetapi tahan terhadap zat antifungi (Rollin and Joseph, 2000; Ambarwati dan Azizah, 2009). Sebanyak sekitar 70% antibiotik yang telah ditemukan berasal dari Actinomycetes (Ogunmwonyi *et al*, 2010), oleh karena itu Actinomycetes merupakan sumber potensial dalam eksplorasi antibiotik baru. Namun, dalam proses skrining antibiotik secara konvensional sering muncul permasalahan, yaitu penemuan

kembali molekul yang sudah dikenal setelah penelitian panjang dan berkelanjutan dilakukan (Busti *et al.*, 2006; Genilloud *et al.*, 2010). Oleh karena itu perlu pendekatan dan teknologi baru untuk menghindari hal tersebut, salah satunya adalah pendekatan genomik.

Sumber informasi genomik telah digunakan untuk pencarian obat (senyawa penuntun) baru (Challis, 2008; Hornung *et al.*, 2007; Tohyama *et al.*, 2004; Zazopoulos *et al.*, 2003). Pendekatan genomik ini menunjukkan perkembangan luar biasa pada beberapa tahun terakhir (Banik and Brady, 2008; Brady *et al.*, 2009; Corre and Challis, 2009; Craig *et al.*, 2009; Nett *et al.*, 2009; Scherlach and Hertweck, 2009). Berdasarkan hipotesis bahwa metabolit sekunder dengan struktur serupa disintesis oleh klaster gen yang mengandung gen-gen homolog tertentu, maka gen-gen homolog ini dapat berlaku sebagai penanda klaster-klaster gen *natural product* yang berbeda. (Liu *et al.*, 2003, Zazopoulos *et al.*, 2003). Salah satu klaster gen yang dapat digunakan untuk pendekatan ini adalah analisis gen yang mengkode *Non Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS) (Ansari *et al.*, 2004; Ayuso *et al.*, 2005). NRPS adalah multi-enzimatik, multi-domain megasynthase yang terlibat dalam biosintesis peptida non ribosomal. Metabolit sekunder yang diproduksi oleh enzim ini menunjukkan aktivitas biologis dan bermanfaat secara klinis sebagai anti-mikroba, anti-fungi, anti-parasit, anti-tumor dan immunosupresan (Cane *et al.*, 1998; Cane and Walsh, 1999; Marahiel *et al.*, 1997). NRPS merupakan salah satu klaster enzim yang mensintesis sebagian besar senyawa

bioaktif (Marahiel, 1997; Metsa-Ketela *et al.*, 1999; Ayuso-Sacido and Genilloud, 2005).

Keragaman genetik gen NRPS isolat Actinomycetes dapat dianalisis antara lain dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Prinsip metode ini adalah pemotongan gen menjadi fragmen-fragmen menggunakan enzim restriksi. Perbedaan ukuran fragmen-fragmen hasil pemotongan menunjukkan keragaman gen yang dianalisis. Demikian halnya, bila profil RFLP gen NRPS berbeda, maka hal ini menunjukkan adanya perbedaan metabolit sekunder yang dihasilkan (Faizal *et al.*, 2008; Hartanto, 2012).

Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keragaman 13 isolat Actinomycetes penghasil antibiotik berdasarkan profil RFLP dari gen NRPS-nya. Isolat-isolat tersebut diperoleh dari rizosfer tanaman tin (*Ficus carica* L.) dan padi (*Oriza sativa* L.).

METODE PENELITIAN

Bahan

Media Solid Starch Nitrat, media *Nutrient Agar*, media agar Mueller Hinton, *Staphylococcus aureus*, primer gen NRPS (A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACST CSGG-3'), A7R(5'-ASGTCVCCSGTSC GGTAS-3')), Ready To Go PCR Beads 0.5 ml (GE Healthcare), enzim restriksi HaeIII (BsuRI) (Thermo Scientific), GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), bahan elektroforesis gel agarose.

Jalannya Penelitian

1. Isolasi dan uji potensi isolat actinomycetes sebagai penghasil antibiotik

a. Penyiapan kultur *actinomycetes* pada media Solid Starch Nitrat

1 ose dari masing-masing isolate *actinomycetes* dikultur pada media Solid Starch Nitrat lalu diinkubasi pada suhu kamar (25-30°C) selama 11 hari.

b. Uji potensi antibakteri dengan metode *agar blocks* (Nedialkova and Naidenova, 2005)

Satu blok silindris (diameter 8 mm) kultur *actinomycetes* di media padat diletakkan di atas media *Nutrient Agar* (oxid) yang sebelumnya ditanam 0,1 ml bakteri uji (*Staphylococcus aureus*) 10^8 cells/ml dengan teknik *spread plate*. Kultur didiamkan selama 14-18 jam pada 2 - 8°C agar terjadi difusi substansi antibakterialnya, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Zone steril (radikal) diukur pada jam ke 48. Adanya zone penghambatan pertumbuhan bakteri pada hasil inkubasi menunjukkan bahwa *isolate actinomycetes* menghasilkan antibakteri.

2. Analisis Gen NRPS (non ribosomal peptida sintetase)

a. Penyiapan kultur *actinomycetes* pada media cair

1 ose (lup) koloni *actinomycetes* yang menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri uji dinokulasi pada 5 ml media Liquid Starch-Nitrat. Lalu diinkubasi pada

rotary shaker 200-250 rpm selama 5 hari pada suhu kamar.







b. Ekstraksi DNA genom (Song *et al*, 2004; Farida *et al*, 2007)








Micelia (5 ml) yang tumbuh pada kultur gojog dalam media Liquid Starch-Nitrat, disentrifus, dicuci dengan TE dan diresuspensi dalam 0,4 bufer SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,5). Lyzozim ditambahkan kurang lebih 50 µl (10mg/ml) dan diinkubasi 37°C selama 1 jam. Kurang lebih 50 µl 10% SDS ditambahkan dan diinkubasi 65°C selama 1 jam dengan sesekali dibalik. Kurang lebih 50 µl 5 M NaCl ditambahkan dan diinkubasi 65°C selama 1 jam. Kloroform 400 µl ditambahkan dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit dengan sering dibalik. Campuran disentrifus pada 13000 rpm 10 menit dan fase air ditransfer ke tube baru. DNA kromosomal diendapkan dengan penambahan 1 volume 2-propanol dengan dibalik pelan. DNA ditransfer ke tube baru, dicuci dengan 70% etanol, dikeringkan, dilarutkan dalam buffer TE dengan volume yang sesuai. Sampel diekstraksi dengan volume sama banyak fenol/kloroform/isoamilalkohol (25:24:1) dan diendapkan dengan 0,1 volume 3 M natrium asetat. Endapan dicuci dengan etanol 70%, dikeringkan, dilarutkan dalam buffer TE.

c. Amplifikasi PCR terhadap sekuen NRPS (Ayudo sacido and Genilloud, 2005).

Primer A3F (5'-GCSTACSYSATSTACA CSTCSGG-3') dan A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'),

Tabel I. Gambaran Morfologi dan Aktivitas Isolat Actinomycetes Penghasil Antibiotik

nomor isolat	morfologi	aerial hypha	vegetative hypha	pigmen terdifusi	aktivitas terhadap mikroba uji
1		hitam	hitam	coklat	Menghambat <i>C. albicans</i>
2		coklat	coklat	merah jambu	Menghambat <i>C. albicans</i>
3		putih kuning	putih kuning	-	Menghambat <i>B. subtilis</i> dan <i>C. albicans</i>
4		hijau kehitaman	putih kuning	-	Menghambat <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> , dan <i>S. Thyphi</i>
5		putih kuning	putih kuning	-	Menghambat <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> , dan <i>S. Thyphi</i>
6		kuning kehijauan	kuning	-	Menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>

nomor isolat	morfologi	aerial hypha	vegetative hypha	pigmen terdifusi	aktivitas terhadap mikroba uji
7		kuning kehijauan	kuning kehijauan	-	Menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>
8		kuning	kuning	-	Menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>
9		kuning	kuning	-	Menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>
10		putih kuning	kuning	kuning	Menghambat <i>S. aureus</i>
11		putih kuning	kuning	kuning hitam	Menghambat <i>S. aureus</i>
12		hijau kehitaman	hitam	-	Menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>S. typhi</i>
13		putih	putih	-	Menghambat <i>S. aureus</i> dan <i>S. typhi</i>

digunakan untuk amplifikasi sampel DNA. Campuran PCR mengandung : 2 µl H₂O, 1 µl DNA genom *actinomycetes* sebagai template (50 ng/µl), 0,5 µl masing-masing primer (15 pmol) dan 5 µl Mega Mix Blue (MMB). *Temperature* PCR : panas awal selama 5 menit pada suhu 95°C, kemudian 35 siklus 0,5 menit suhu 95°C, 2 menit suhu 58°C, 4 menit suhu 72°C dan pemanasan tahap akhir suhu 68°C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis dengan gel agaros 2%. Pewarnaan bercak menggunakan etidium bromida.

d. Analisis RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

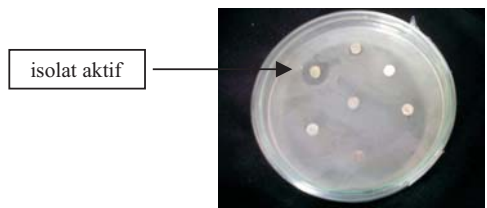
Produk PCR dipotong dengan enzim restriksi BsuRI (HaeIII), kemudian dielektroforesis dengan gel agaros 1%. Hasil RFLP dianalisis dengan statistic multivariate MVSP 3.21 untuk mengetahui keragamannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Morfologi Actinomycetes dan Uji Aktivitas terhadap Bakteri Uji

Koloni *actinomycetes* dicirikan dengan koloni yang kering, tampak seperti berkapur dan seperti ada inti di tengah koloni. Sejumlah 13 isolat *Actinomycetes* hasil isolasi dari rizosfer tanaman tin dan padi menunjukkan aktivitas sebagai penghasil antibiotik. Skrining aktivitas sebagai penghasil antibiotik tidak hanya dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* saja tetapi juga mikroba lain yaitu *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella thypi* dan *Candida albicans*.

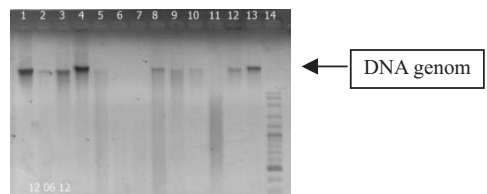
Gambaran morfologi dan aktivitas koloni isolat *Actinomycetes* tersebut dirangkum pada tabel I. Isolat *actinomycetes* yang menghasilkan antibiotik terhadap bakteri uji memberikan zone jernih sebagai zone penghambatan pertumbuhan mikroba uji sebagaimana ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Contoh Hasil Uji Aktivitas Isolat Actinomycetes Terhadap Mikroba Uji Blok isolat aktif ditunjukkan dengan adanya zone jernih di sekeliling blok

B. Isolasi DNA Genom Isolat Aktif Actinomycetes

Untuk melakukan analisis genomik maka dilakukan isolasi DNA terlebih dahulu. Isolasi dilakukan dengan kit dengan terlebih dahulu diperlakukan dengan bufer lisis. Hasil isolasi DNA kemudian dielektroforesis dan hasilnya disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Elektrofogram DNA Isolat Actinomycetes

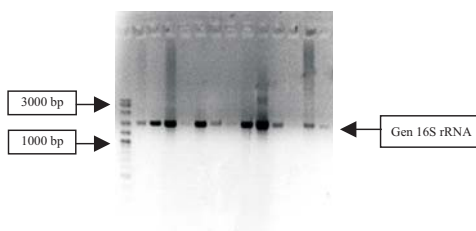
Keterangan : dari kiri ke kanan adalah isolat no 1 s/d 13, lajur 14 adalah Marker

Tabel II. Hasil Pengukuran OD pada 260 nm dan 280 nm beserta perhitungan konsentrasi DNA

No isolat	OD pd 260 nm	OD pd 280 nm	Kemurnian DNA (ratio OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	Faktor pengenceran	Kons tana	Konsentra si DNA (ug/ul) = a.b.c/1000	Vol max PCR (~1ug) (ul)	Vol min PCR (~50ng) (ul)
	a			b	c	d	1/d	
1	0,025	0,019	1,31	50	50	0.0625	16	0,8
2	0,013	0,011	1,17	50	50	0.032468	30,8	1,5
3	0,010	0,008	1,25	50	50	0.025	40	2
4	0,042	0,033	1,27	50	50	0.105263	9,5	0,5
5	0,007	0,006	1,17	50	50	0.017513	57,1	3
6	0,005	0,005	1	50	50	0.0125	80	4
7	0,005	0,005	1	50	50	0.0125	80	4
8	0,010	0,008	1,25	50	50	0.025	40	2
9	0,006	0,006	1	50	50	0.014993	66,7	3,5
10	0,006	0,006	1	50	50	0.014993	66,7	3,5
11	0,010	0,008	1,25	50	50	0.025	40	2
12	0,042	0,037	1,14	50	50	0.105263	9,5	0,5
13	0,055	0,047	1,17	50	50	0.136986	7,3	0,4

Gambar 2 menunjukkan bahwa semua isolat *Actinomycetes* dapat diisolasi semua dengan ukuran lebih dari 3000 bp. Meskipun isolat 6 dan 7 sangat tipis serta isolat 11 tampak terdegradasi, namun cukup untuk dilakukan proses berikutnya yaitu PCR. Kemurnian DNA

hasil isolasi diukur dengan spektrofotometri UV pada 260 nm dan 280 nm. Hasil uji kemurnian DNA hasil isolasi disajikan pada tabel II. Kemurnian DNA yang baik adalah apabila nilai rasio OD₂₆₀/OD₂₈₀ lebih dari 2. Hasil pengukuran OD (optical density) kemudian digunakan untuk menghitung rentang volume DNA yang digunakan sebagai cuplikan untuk PCR.



Gambar 3. Elektroforegram Hasil PCR Gen 16S rRNA Isolat *Actinomycetes*

C. PCR DNA 16S rRNA

Sebelum dilakukan PCR terhadap gen NRPS, maka terlebih dahulu dilakukan PCR terhadap gen 16S rRNA untuk memastikan bahwa DNA semua isolat *Actinomycetes* dapat di-amplifikasi. Gen 16S rRNA digunakan sebagai indikator proses amplifikasi

DNA karena setiap mikroorganisme mengandung gen tersebut. Dilakukan dengan primer F27 dan R1492 konsentrasi 0,1 uM serta template DNA 50 ng pada kondisi sebagai berikut :

- pra siklus : selama 3 menit pada suhu 96°C
- siklus (30 siklus) : denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, annealing selama 1 menit pada suhu 53°C, ekstensi selama 5 menit pada suhu 72°C,
- final ekstensi : selama 5 menit pada suhu 72°C

Hasil PCR seperti dicantumkan pada gambar 3, menunjukkan bahwa semua DNA isolat *actinomycetes* adalah amplicable karena semua gen 16S rRNA terdeteksi yaitu berukuran 1500 bp, sehingga semua bisa dilanjutkan ke proses PCR terhadap gen NRPS.

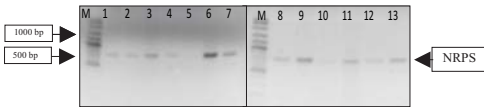
D. PCR Gen NRPS

Gen NRPS merupakan gen yang mengkode metabolit sekunder turunan peptida (NRPS). Tidak semua mikroorganisme memiliki gen tersebut. Pada penelitian ini analisis kedua gen tersebut untuk mendeteksi keberagaman isolat *actinomycetes*. PCR terhadap gen NRPS dilakukan dengan menggunakan primer A3F dan A7R sebanyak 0,2 uM serta template DNA 250 ng pada kondisi sebagai berikut (Ayudo-Sacido and Genilloud, 2005) :

- pra siklus : selama 5 menit pada suhu 95°C
- siklus 30 siklus) : denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C, annealing selama 2 menit pada suhu 59°C, ekstensi selama 4 menit pada suhu 72°C,
- Binal ekstensi : selama 10 menit pada suhu 72°C

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen NRPS adalah A3F (*forward primer*) dan A7R (*reverse primer*). Primer ini akan menempel pada domain adenilasi pada gen NRPS dan menghasilkan produk PCR yang berukuran 700-800 bp. Klaster gen NRPS memiliki modul inti terdiri dari domain kondensasi (domain C), adenilasi (domain A) dan tiolasi atau protein pembawa peptida (domain T/PCP). Domain A berfungsi untuk seleksi dan aktivasi monomer asam amino, domain C untuk mengkatalisis pembentukan ikatan peptida, sedangkan domain T untuk proses transfer dan pertumbuhan rantai monomer ke berbagai situs katalitik (Ansari *et al.*, 2004).

Hasil PCR tercantum pada gambar 4 yang menunjukkan bahwa berdasarkan hasil elektroforesis, semua produk PCR gen NRPS memiliki ukuran 700-800 bp. Tampak bahwa di antara 13 isolat *Actinomycetes* yang diuji, hanya satu isolat yang tidak menghasilkan produk PCR gen NRPS yaitu isolat 5.



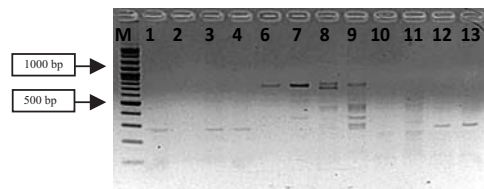
Gambar 4. Elektroforegram Hasil PCR Gen NRPS

RFLP gen NRPS

Metode RFLP digunakan untuk mengetahui profil fragmen-fragmen DNA hasil pemotongan gen NRPS isolat *Actinomycetes* oleh enzim *HaeIII*. Enzim *HaeIII* memotong DNA hasil amplifikasi gen NRPS pada daerah kaya pasangan basa GC dan *Actinomycetes* memiliki kandungan GC yang tinggi yaitu 56-64%. Enzim ini memiliki sisi pengenalan pada empat basa yaitu memotong pada daerah yang memiliki urutan basa GGCC (Dharmaraj, 2010). Oleh karena itu, hasil pemotongan enzim *Hae III* akan menunjukkan profil yang berbeda pada isolat *Actinomycetes* yang berbeda.

Hasil RFLP dirangkum pada gambar 5 dan tabel II. Keragaman profil RFLP dapat diamati dari jumlah dan ukuran fragmen hasil pemotongan. Untuk mengetahui keragamannya secara statistik, maka hasil tersebut dianalisis dengan analisis multivariate UPGMA dengan aplikasi mvsp dan diperoleh hasil pada gambar 6. Berdasarkan gambar 6 dapat dicermati bahwa ada isolat yang memiliki koefisien 1 yang berarti

ketiganya sama yaitu isolat 1,3 dan 4. Isolat yang sama sekali beda dengan lainnya adalah isolat 5 karena tidak memiliki gen NRPS dan isolat 8. Jadi dari 13 isolat dapat dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu isolat 5 (kelompok 1), isolat 8 (kelompok 2), isolat 11 (kelompok 3), isolat 6,7,9 (kelompok 4) dan isolat 1,2,3,4,10,12,13 (kelompok 5).



Gambar 5. Elektroforegram Hasil Pemotongan Gen NRPS oleh Enzim *HaeIII*

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis RFLP terhadap gen NRPS, maka dari sejumlah 13 isolat *Actinomycetes* yang diuji dapat dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu isolat 5 (kelompok 1), isolat 8 (kelompok 2), isolat 11 (kelompok 3), isolat 6,7,9 (kelompok 4) dan isolat 1,2,3,4,10,12,13 (kelompok 5).

Saran

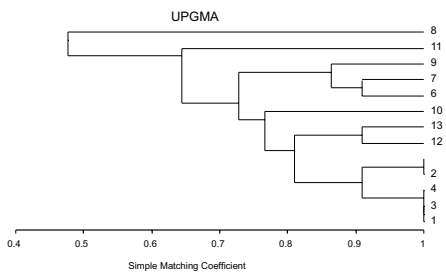
Penelitian perlu dilanjutkan untuk mengetahui isolat yang menghasilkan antibiotik baru menggunakan satu isolat dari tiap kelompok.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan

Tabel II. Ukuran Fragmen DNA Hasil Pemotongan Gen NRPS Isolat Actinomycetes oleh Enzim HaeIII

Ukuran Fragmen DNA	Isolat												
	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	
800							x						
750					x	x		x					
700							x						
500								x		x			
450							x	x		x			
350						x		x					
325										x			
300							x				x	x	
290							x						
280	x		x	x									
250									x	x			



Gambar 6. Dendrogram Ukuran Fragmen Hasil Pemotongan Gen NRPS Oleh Enzim Hae

Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Hibah Fundamental.

DAFTAR PUSTAKA

Ambarwati, Gama, 2009, Isolasi Actinomycetes Dari Tanah Sawah Sebagai Penghasil Antibiotik, *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, Vol. 10, No. 2, 2009: 101 - 111.

Ansari, Yadav, Gokhale, Mohanty, 2004, NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases, *Nucleic Acids Research*, 32:W405-W413.

Ayudo-Sacido, and Genilloud, 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS - I systems in actinomycetes : detection and distribution of these byosynthetic gene sequences in

- major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* 49, 10- 24.
- Ayuso, Clark, Gonzalez, Salazar, Anderson, Genilloud, 2005, A novel Actinomycetes strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways, *App Microbiol Biotechnol*, 67:795-806
- Banik, Brady, 2008, Cloning and characterization of new glycopeptides gene clusters found in an environmental DNA megalibrary, *Proc Natl Acad Sci* 105:17273-17277
- Brady, Simmons, Kim, Schmidt, 2009, Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms, *Nat Prod Rep* 26:1488-1503
- Berdy, 2005, Bioactive microbial metabolites. A personal view. *J Antibiot* 58(1) :1-26
- Busti, Monciardini, Cavaletti, Bamonte, Lazzarini, Sosio, Donadio, 2006, Antibiotic- producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes, *Microbiology*. 152: 675-683.
- Cane, Walsh, Khosla, 1998, Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations, *Science*, 282:63-68.
- Cane, Walsh, 1999, The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, *Chem Biol*, 6:R319-R325.
- Challis, 2008, Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways, *Microbiolog*, 154:1555-1569.
- Corre, Challis, 2009, New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat Prod Rep* 26:977-986
- Craig, Chang, Brady, 2009, Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*, *ACS Chem Biol*, 4:23-28.
- Dharmaraj, 2010, Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substance, A review, *World J Microbiol Biotechnol* 26.
- Faizal, Lestari, Kurnia, Latif, Hadiano, Kusumawati, Rachmawati, Marwoto, Purbowasito, 2008, Polymorphism analysis of polyketide synthase gene from actinomycetes genome DNA of Taman Nasional Gunung Halimun soil by using metagenome method, *J Biotechnol Res In Tropical Region* 1(Special Edition):1-4.
- Farida,, Widada, Meiyanto, 2007, Combination Methods for Screening Marine Actinomycetes Producing Potential Compounds as Anticancer, *Indonesian Journal of Biotechnology*, Vol. 12. No. 2, pp. 988-997.
- Genilloud, Gonzalez, Salazar, Jesus Martin, Tormo, Vicente, 2010, Current approaches to exploit *actinomycetes* as a source of novel natural products, *J Ind Microbiol*

- Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-010-0882-7.
- Hartanto, 2012, Keragaman sekuen gen NRPS 14 isolat Actinomycetes laut yang berpotensi menghasilkan senyawa antikanker, *Tesis*, Universitas Gadjah Mada.
- Hornung, Bertazzo, Dziarnowski, Schneider, Welzel, Wohler, Holzenkampfer, Nicholson, Bechthold, Sussmuth, Vente, Pelzer, 2007, A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources, *Chembiochem*, 8:757-766.
- Liu, Ahlert, Gao, Wendt-Pienkowski, Shen, Thorson, 2003, *Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:11959-11963.
- Marahiel, 1997, Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics, *Chem Biol* 4:561-567.
- Marahiel, Stachelhaus, Mootz, 1997, Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis, *Chem Rev*, 97:2615-2673.
- Metsa-Ketela, Salo, Halo, Hautala, Hakala, Mantsala, K. Ylihonko, 1999, An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces, *FEMS Microbiol Lett*, 180:1-6.
- Nedialkova, Naidenova, 2005, Screening the Antimicrobial Activity of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica, *Journal of Culture Collections Volume 4*, 2004-2005, pp. 29-35.
- Nett, Ikeda, Moore, 2009, Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes, *Nat Prod Rep* 26:1362-1384.
- Ogunmwonyi, Mazomba, Mabinya, Ngwenya, Green, Akinpelu, Olaniran, Bernard, Okoh, 2010, Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa, *Afr. J. Microbiol. Res.* pp.2223-2230
- Oskay, Tamer, Azeri, 2004, antibacterial activity of some *Actinomycetes* isolated from farming soil of Turkey, *Afr J Biotechnol*, 3 (9): 441-446.
- Parungao, Maceda,, Villano, 2007, Screening of Antibiotic-Producing *Actinomycetes* from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Philippines, *Journal of Research in Science, Computing, and Engineering* 4:3, pp. 29-38
- Rollins,, and Joseph,, 2000, *Actinomycetes Summary*, University of Maryland, Diakses : 10 April 2011. <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Actinomycetes.html>
- Scherlach Hertweck, 2009, Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms, *Org Biomol, Chem* 7:1753-1760

- Song, Lee, Kang, Baek, and Suh, 2004, Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 203-209
- Sulistiyani, Muhlis, Kustanti, Erinto, Aquina, Zainab, 2009, Studi Resistensi *Staphylococcus aureus* Yang Diisolasi Dari Limbah Cair Beberapa Rumah Sakit Terhadap Antibiotika, *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan Lingkungan Untuk Mewujudkan Sehat Jasmani Rohani Bagi Anak Bangsa*, 6 Januari 2009, Fakultas Kesehatan Masyarakat UAD, Yogyakarta.
- Tohyama, Eguchi, Dhakal, Akashi, Otsuka, Kakinuma, 2004, Genome-inspired search for new antibiotics Isolation and structure determination of new 28-membered polyketide macrolactones, halstoctacosanolides A and B, from *Streptomyces halstedii* HC34, *Tetrahedron* 60:3999-4005
- Zazopoulos, Huang, Staffa, Liu, Bachmann, Nonaka, Ahlert, Thorson, Shen, Farnet, 2003, A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways, *Nat Biotechnol*, 21:187-190