

## Tumbuhan Etnoperubatan Sebagai Perumah Aktinomiset Endofit yang Bersifat Bioaktif

(Ethnomedicinal Plants as Host of Bioactive Endophytic Actinomycetes)

NURUL 'IZZAH MOHD SARMIN, NORAZIAH M. ZIN\*, NG KIM TIEN, NIK MARZUKI SIDIK, ONUMA KAEWKLA & CHRISTOPHER M.M. FRANCO

### AKSTRAK

Sembilan aktinomiset endofit telah berjaya dipencilkan daripada pokok yang mempunyai nilai ubatan dari beberapa tempat di Semenanjung Malaysia. Pencilan tersebut telah dikenalpasti melalui pemerhatian morfologi, amplifikasi gen 16S rRNA dan analisis penjujukan 16S rRNA. Saringan awal terhadap aktiviti antimikrob telah dilakukan dengan menggunakan teknik calitan plat. Pembentukan miselium substrat dan aerial, warna jisim spora, pigmen larut dan morfologi rantai spora pada semua pencilan menyerupai *Streptomyces* sp. dan *Microbispora* sp. Analisis filogenetik jujukan separa 16S rRNA mendapati pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 saling berkaitan dengan *Streptomyces eurythermus* ATCC 14975<sup>T</sup>. Walau bagaimanapun pencilan ini telah dipencilkan dari tumbuhan yang berbeza. Pencilan ini didapati mempunyai aktiviti antimikrob terhadap bakteria dan kulat kajian. Empat pencilan aktif iaitu SUK 08, SUK 10, SUK 12 dan SUK 15 berupaya untuk membunuh dan merencat sehingga 100% satu atau lebih organisma patogen seperti *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* dan *Trichoderma viride*. Kajian ini mengesahkan bahawa tumbuhan etnoperubatan adalah sumber pencarian aktinomiset endofit bioaktif yang berupaya menjadi sumber novel dalam pencarian agen antibakteria dan antimikotik.

**Kata kunci:** 16S rRNA; aktinomiset; endofit; tumbuhan etnoperubatan

### ABSTRACT

Nine endophytic actinomycetes have been isolated from medicinal plants in several parts of the Peninsular Malaysia. The isolates were identified by morphological observation, amplification of 16S rRNA genes and 16S rRNA sequencing analysis. Preliminary screenings of antimicrobial activities were measured by streak plate method. The presence of substrate and aerial mycelium, mass spore colour, diffusible pigment and spore chain morphology of all isolates were identical to *Streptomyces* sp. and *Microbispora* sp. The phylogenetic tree of partial sequence of 16S rRNA showed that isolate SUK 08, SUK 10 and SUK 15 were closely related to *Streptomyces eurythermus* ATCC 14975<sup>T</sup> but yet they were isolated from different plants. All isolates demonstrated antimicrobial activities against tested bacteria and fungi. Four active isolates namely SUK 08, SUK 10, SUK 12 and SUK 15, have killing and inhibition activities up to 100% against one or more pathogenic organism such as *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma viride*. These results confirmed that ethnomedicinal plants harbor bioactive endophytic Actinomycetes which should represent as a novel source in the search of antibacterial and antimicotic agents.

**Keywords:** 16S rRNA; Actinomycetes; endophytes; ethnomedicinal plant

### PENGENALAN

Aktinomiset endofit adalah bakteria gram positif yang mempunyai filamen bercabang dan hidup di ruang interstisial tisu hidup tumbuhan tanpa menyebabkan kesan negatif pada perumahannya serta telah dikenal pasti berguna dalam pertanian dan perubatan (Bentley et al. 2002). Kebanyakan aktinomiset yang menghasilkan antibiotik adalah daripada spesies *Streptomyces* yang menyebabkan peningkatan kepentingannya dari segi ekonomi. *Streptomyces* mempunyai kitaran hidup yang kompleks yang terdiri daripada pertumbuhan filamen vegetatif, pembentukan miselium aerial dan pembezaan miselium tersebut kepada rantai-rantai spora. Peningkatan

minat terhadap aktinomiset telah mendorong kepada pencilan dan deskripsi pelbagai spesies baru yang memerlukan pengelasan kepada subgenusnya. Kaedah berasaskan PCR mampu mengenalpasti bakteria dengan cepat dan tepat (Gurtler et al. 1991) dengan amplifikasi jujukan gen ribosomal RNA (16S rRNA) mampu untuk mengenal pasti taksonomi bakteria (Mehling et al. 1995). Perbandingan jujukan subunit kecil rRNA telah digunakan sebagai sumber untuk penentuan hubungan filogenetik dan perubahan evolusi di kalangan alam Archarea, Eucarya dan Bakteria (Gutell et al. 1994). Kajian ini menerangkan mengenai pencilan, pencirian dan bioaktiviti aktinomiset endofit yang dipencilkan daripada tumbuhan ubatan yang dipilih berdasarkan kegunaannya secara tradisi.

## BAHAN DAN KAEDAH

## PENSAMPELAN

Sampel tumbuhan yang sihat daripada bahagian batang dan akar diperolehi dari beberapa kawasan di Semenanjung Malaysia iaitu *Scindapsus hederaceus* Miq., *Shorea ovalis* (Korth.) Blume ssp. *sericea* (Dyer) P.S. Ashton, *Cinnamomum mollissimum* Hook.f., *Alpinia conchigera* Griff., *Portulaca oleracea* Linn., *Labisia pumila* Blume, *Cinamomum sintoc* Blume dan *Polyalthia sclerophylla* Hook.f. & Thomson.

## PENCILAN AKTINOMISET ENDOFIT

Bahagian batang dan akar tumbuhan yang telah dipilih dicuci dengan air dan dikeringkan. Permukaan luarnya disteril untuk menyingkirkan epifit dengan menggunakan kaedah Ghadin dan rakan-rakan (2008). Tisu tumbuhan diproses, diletakkan di atas plat pencilan agar dan diinkubasi pada suhu 27°C selama empat minggu (Zin et al. 2007, 2010). Kemudian, kultur aktinomiset dipilih berdasarkan morfologinya dan dimurnikan di atas agar ISP 2 (Shirling & Gottlieb 1966). Potongan agar kecil yang mengandungi hifa dan spora aktinomiset disimpan di dalam 15% gliserol dalam air (v/v) pada suhu -80°C untuk penyimpanan kultur stok.

## PEMERHATIAN MORFOLOGI

Morfologi aktinomiset seperti pembentukan miselium aerial, warna jisim spora, pembentukan miselium substrat dan pigmen larut diperhatikan pada hari ke 14 (Shirling & Gottlieb 1966) dan kultur slaid disediakan di atas agar oatmeal (HiMedia®) untuk pemerhatian morfologi rantai sporanya secara mikroskopik. Ciri-ciri kultur tersebut direkod dan diberi nombor rujukan untuk didepositkan di dalam koleksi Makmal Penyelidikan Antibiotik Novel di Universiti Kebangsaan Malaysia.

## EKSTRAKSI DNA DARIPADA AKTINOMISET

Pengekstrakan DNA dilakukan dengan modifikasi daripada kaedah yang digunakan oleh Coombs dan rakan-rakan (2003).

## ANALISIS PENJUJUKAN GEN SEPARA 16S RRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan kaedah Tindak Balas Rantai Polimerase (PCR) dengan menggunakan primer 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 765r (5'-CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC-3'). Campuran tindak balas 50 µL mengandungi: 2 µL primer (5 µM) *forward* dan *reverse*, 5 µL 10x penimbal PCR, 4 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 2U/µL *Taq* polimerase dan 2 µL templat DNA. Profil suhu untuk kitaran tindak balas pada *thermal cycler* (Bio-Rad®) adalah seperti berikut: 94°C selama 2 min; diikuti dengan 40 kitaran bagi 94°C selama 1 min, 45°C selama 1 min, 72°C selama 2 min; diikuti dengan 72°C selama 10 min. Produk PCR dimurnikan

dengan menggunakan kit *UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification* (MO BIO Laboratory, Inc) sebelum penjujukan DNA dilakukan dengan menggunakan 3100 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems). Data penjujukan yang diperolehi dibandingkan dengan data yang terdapat di dalam GenBank dengan menggunakan perisian BLASTN melalui laman sesawang <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

## ANALISIS FILOGENETIK NJ

Analisis filogenetik *Neighbour-joining* (NJ) dilakukan untuk jujukan separa 16S rRNA. Jujukan disejajarkan dan hasilnya diedit dengan menggunakan perisian BioEdit versi 7. Hujung yang terunjur pada kedua-dua hujung dibuang untuk memastikan semua jujukan adalah sama panjang. Pokok filogenetik dibina dengan perisian pakej MEGA4 menggunakan kaedah NJ dengan model Kimura *two-parameter* (Tamura et al. 2007). Ruang dibuang daripada jujukan semasa pengiraan jarak *pairwise* dilakukan. Analisis *bootstrap* dilakukan dengan menggunakan 1 000 pseudoreplikasi.

## BIOASAI AKTINOMISET

Pencilan aktinomiset diinokulasi secara berjalur di bahagian bawah plat agar ISP2 dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 14 hari. Bakteria patogen yang digunakan ialah *Salmonella enteritidis* (NTCT 5188), *Salmonella typhimurium* (NTCT 74), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 6464), *Escherichia coli* (NCTC 12079), *Escherichia coli* (NCTC 10964) dan Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591). Selain itu, bakteria patogenik *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *B. cereus*, *E. coli* dan semua kulat patogen yang digunakan diperolehi daripada kultur makmal penyelidikan Antibiotik Novel, Fakulti Sains Kesihatan, UKM Kuala Lumpur. Bakteria kemudiannya diinokulasi seranjang dengan pencilan aktinomiset dan diinkubasi pada 37°C semalaman (Arasu et al. 2009). Bagi kajian terhadap kulat patogeni, setiap pencilan aktinomiset ditumbuhkan dalam 2 cm koloni untuk 14 hari di atas agar ISP 2. Kemudian, plak agar yang terdiri daripada kulat kajian diletakkan 1 cm daripada koloni aktinomiset. Pertumbuhan mikroorganisma kajian diperiksa selepas 24, 48 dan 72 jam dan direkodkan sebagai hidup, direncat atau dibunuh berbanding dengan plat kawalan yang tidak mempunyai koloni aktinomiset (Zin et al. 2007).

## HASIL DAN PERBINCANGAN

## PENCILAN DAN IDENTIFIKASI AKTINOMISET ENDOFIT

Sembilan pencilan aktinomiset endofit dilabel sebagai SUK 08 hingga SUK 16 berjaya dipencilkan yang mana setiap pencilan adalah daripada tumbuhan ubatan yang berbeza kecuali SUK 08 dan SUK 09 (Jadual 2). Pencilan disahkan sebagai aktinomiset berdasarkan ciri-ciri hifa, pembentukan spora dan daripada analisis kesamaan penjujukan separa

gen 16S rRNA dengan GenBank (Jadual 2). Penjujukan gen 16S rRNA menunjukkan bahawa walaupun beberapa pencilan didapati berkait tetapi, pencilan ini tidak sama dengan jujukan aktinomiset lain yang terdapat dalam GenBank (98-99% kesamaan). Ciri-ciri kultur di atas media ISP 2 dan kultur slaid bagi aktinomiset endofit tersebut adalah seperti Jadual 1.

#### ANALISIS PENJUJUKAN SEPARA GEN 16S RRNA

Daripada sembilan pencilan yang diperolehi, lapan daripadanya adalah *Streptomyces* spp. dan satu adalah *Microbispora* sp. Ini menunjukkan bahawa, secara umumnya, *Streptomyces* spp. sering ditemui dalam famili aktinomiset yang dipencil daripada tumbuhan (Sardi et al. 1992). Pokok NJ filogenetik daripada data jujukan separa 16S rRNA adalah seperti Rajah 1. SUK 14 membentuk *clade* filogenetik yang sangat berbeza dengan *clade* *Streptomyces* spp. yang lain. Walaupun ketiga-tiga pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 yang didapati berkaitan dengan *S. eurhythmus* dan mereka diperolehi dari lokasi pensampelan yang sama (Hutan Simpan Bangi) dalam lingkungan yang berdekatan antara satu sama lain tetapi mereka telah di isolasi daripada tumbuhan

yang berbeza (Jadual 2). Ketiga-tiga pencilan ini juga membentuk *clade* yang berbeza dengan pencilan lain yang bukan diperolehi dari Hutan Simpan Bangi. Pemerhatian awal ini mencadangkan bahawa pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 berkemungkinan endemik di Hutan Simpan Bangi tetapi masih terlalu awal untuk merumuskannya. Ini mungkin kerana hutan tersebut menyediakan keadaan yang bersesuaian untuk ketiga-tiga pencilan tersebut terus membuat hubungan di antara mikrob-tumbuhan. Spora endofit ini pula bersedia untuk memasuki tumbuhan berdekatan untuk menjadi perumahannya yang baru. Kesudahannya, ini akan membenarkan hubungan di antara mikrob-tumbuhan secara berterusan (Castillo et al. 2007).

#### BIOAKTIVITI AKTINOMISET

Setiap pencilan menunjukkan aktiviti biologi terhadap mikroorganisma bakteria dan kulat kajian (Jadual 3). Walaupun pencilan SUK 12 hanya mempunyai aktiviti antibakteria terhadap dua bakteria kajian, tetapi ia berupaya untuk merencat 100% *B. subtilis* ATCC 6633. Bagi pencilan SUK 14, ia tidak mempunyai aktiviti antikulat terhadap sebarang kulat kajian (data tidak dinyatakan).

JADUAL 1. Ciri-ciri kultur Aktinomiset endofit

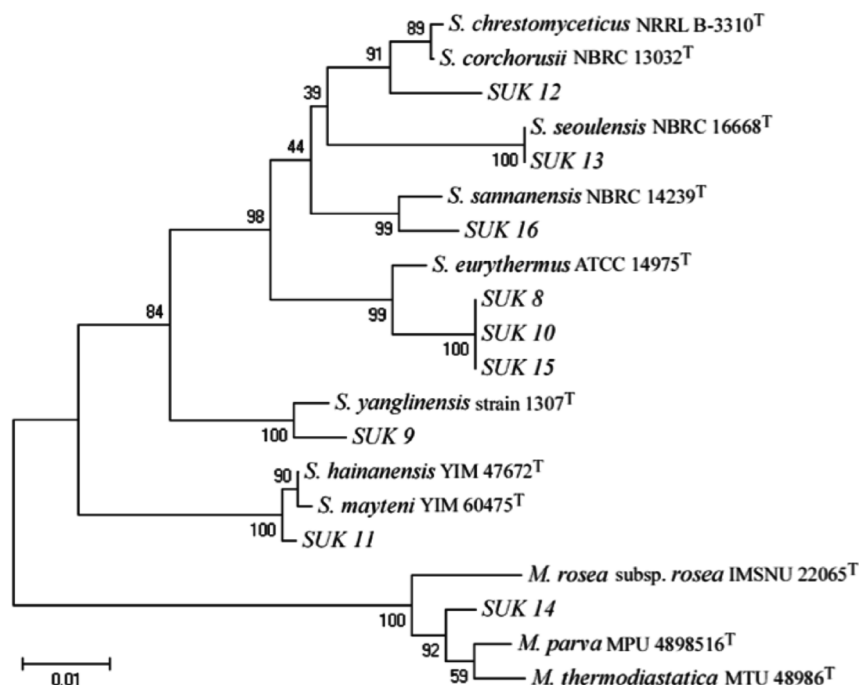
Pencilan	Miselia aerial	Pigmen larut	Miselium substrat	Morfologi rantai spora
SUK 08	Kelabu keputihan	Kuning	Coklat cair	<i>Spiral</i>
SUK 09	Kelabu keputihan	Kuning terang	Kuning terang	<i>Rectiflexibiles</i>
SUK 10	Kelabu keputihan	Kuning kecoklatan	Coklat cair	<i>Spira</i>
SUK 11	Coklat gelap	Coklat gelap	Coklat gelap	<i>Retinaculiaperti</i>
SUK 12	Kelabu keputihan	Kuning kehijauan	Tiada	<i>Rectiflexibiles</i>
SUK 13	Kelabu keputihan	Kuning	Coklat cair	<i>Rectiflexibiles</i>
SUK 14	Hijau gelap	Hijau gelap	Tiada	<i>Disporous</i>
SUK 15	Kelabu keputihan	Coklat	Coklat cair	<i>Retinaculiaperti</i>
SUK 16	Hijau cair	Kuning gelap	Tiada	<i>Spira</i>

JADUAL 2. Sumber tumbuhan bagi pemencilan Aktinomiset endofit, nombor deposit UKM dan nombor deposit jujukan di GenBank

Pencilan	Sumber tumbuhan	No. Deposit UKM	No. Deposit
1	<i>Scindapsus hederaceus</i>	SUK 08	HM449820
2	<i>Scindapsus hederaceus</i>	SUK 09	HM449821
3	<i>Shorea ovalis</i>	SUK 10	HM449822
4	<i>Alpinia conchigera</i>	SUK 11	HM449823
5	<i>Portulaca oleracea</i>	SUK 12	HM449824
6	<i>Cinamomum sintoc</i>	SUK 13	HM449825
7	<i>Labisia pumila</i>	SUK 14	HM449826
8	<i>Cinamomum mollissimum</i>	SUK 15	GU247514
9	<i>Polyalthia sclerophylla</i>	SUK 16	GU247515

JADUAL 3. Aktiviti biologi Aktinomiset endofit terhadap bakteria kajian

Organisma kajian SUK	Peratus perencatan (%)									
	SUK 08	SUK 09	SUK 10	SUK 11	SUK 12	SUK 13	SUK 14	SUK 15	SUK 16	
<i>S. entriditis</i> (NCTC 5188)	20.0	–	47.6	–	–	–	–	59.6	–	
<i>S. typhimurium</i> (NCTC 74)	33.3	–	36.2	–	–	–	–	50.0	–	
<i>P. aeruginosa</i>	40.4	34.5	52.7	4.8	–	3.9	–	58.3	–	
<i>E. faecalis</i>	42.0	43.4	58.5	–	–	7.0	88.4	40.7	–	
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	54.0	44.0	76.2	–	100	8.3	40.0	62.0	17.8	
<i>B. cereus</i>	51.8	41.7	64.8	–	–	20.0	–	71.7	15.4	
<i>B. cereus</i> (ATCC 6464)	60.0	46.0	76.4	–	–	–	33.3	54.2	19.1	
<i>E. coli</i>	38.5	–	54.4	–	–	–	–	58.0	–	
<i>E. coli</i> (NCTC 12079)	46.1	–	60.0	–	–	–	–	58.2	–	



RAJAH 1. Pokok NJ filogenetik daripada jujukan separa 16S rRNA bagi pencilan SUK 08 hingga pencilan SUK 16 dan beberapa spesies Aktinomiset yang diketahui. Jujukan data untuk beberapa jenis kultur Aktinomiset yang paling berkaitan telah diperolehi daripada GenBank dan dimasukkan ke dalam pokok filogenetik. Nilai *bootstrap* daripada 1,000 pseudoreplikasi ditunjukkan pada setiap hujung ranting pokok. Skala bar mewakili 0.01 perubahan per nukleotida

Pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 yang berada dalam *clade* filogenetik yang sama mempunyai aktiviti antimikrob terhadap mikroorganisma yang sama. Hanya SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 daripada kesemua pencilan yang dipencilkan mempunyai aktiviti antibakteria terhadap *S. entriditis* (NCTC 5188), *S. typhimurium* (NCTC 74), *E. coli*, *E. coli* (NCTC 12079) dan *E. coli* (NCTC 10964). Di samping itu, aktiviti antifungus bagi pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 ini amat memberangsangkan di mana ianya berupaya merencat 100% *Aspergillus niger* dan membunuh 100% *Fusarium solani* dan *Trichoderma viridae*. Peratus

perencatan bagi kulat patogen tumbuhan *Geotrichum candidum* oleh SUK 08 dan SUK 10 ialah 91.7% manakala SUK 15 ialah 66.7%. SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 berupaya membunuh 100%, merencat 94.1% dan merencat 100% *Rhizoctonia solani*, masing-masing. Selain itu, SUK 08 dan SUK 10 berupaya merencat melebihi 80% *Aspergillus fumigatus* yang dianggap sebagai kulat patogen yang boleh membunuh manusia. Keputusan ini menunjukkan bahawa kultur endofit ini boleh diketengahkan sebagai agen antimikotik. Hanya sebilangan kecil agen antifungal sedia ada seperti *polyene*, *azole* serta *caspofungin acetate*

yang digunakan untuk merawat penyakit terinfeksi kulat seperti *Candida* spp. yang boleh mengancam nyawa. Tambahan pula, prevalens bagi infeksi kulat sistemik telah meningkat secara signifikan sejak dekad yang lepas (Vicente et al. 2003). Untuk itu, pembangunan agen antifungal yang baru adalah sangat diperlukan di mana ketiga-tiga pencilan ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antifungus.

Pencilan mikroorganisma endofit daripada tisu tumbuhan yang sihat daripada tumbuhan ubatan ini membuktikan bahawa tumbuhan ubatan yang digunakan secara tradisi untuk merawat penyakit tertentu adalah perumah kepada aktinomiset endofit yang mempunyai aktiviti biologi. Kajian ini menyokong penemuan Zin et al. (2007) dan Ghadin et al. (2008) yang telah memencilkan *Streptomyces* endofit daripada tumbuhan ubatan di kawasan persampelan lain di Semenanjung Malaysia. Hubungan simbiosis antara endofit-perumah ini adalah didasarkan oleh metabolit antimikrob yang dihasilkan oleh endofit tersebut untuk melindungi perumahannya. Walau bagaimanapun, pencilan sebatian bioaktif tulen daripada endofit ini diperlukan untuk mengesahkan lagi penemuan ini. Malaysia yang terkenal dengan flora dan fauna dalam Hutan Hujan Tropikanya adalah gedung penuh dengan pokok-pokok yang mempunyai nilai-nilai ubatan yang tidak harus disia-siakan.

#### PENGHARGAAN

Penghargaan buat Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah menaja penyelidikan ini di bawah Geran Penyelidikan Universiti; UKM-OUP-TKP-21-99/2009 dan UKM-GUP-TKP-08-22-074.

#### RUJUKAN

- Arasu, M.V., Duraipandiyan, V., Agastian, P. & Ignacimuthu, S. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale* 19: 22-28.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Nature* 417: 141-147.
- Castillo, U.F., Browne, L., Strobel, G., Hess, W.M., Ezra, S., Pacheco, G. & Ezra, D. 2007. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. *Microbial Ecology* 53(1): 12-19.
- Coombs, J.T. & Franco, C.M.M. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied Environmental Microbiology* 69: 5603-5608.
- Ghadin, N., Zin, N.M., Sabaratnam, V., Badya, N., Basri, D.F., Lian, H.H., Sidik, N.M. 2008. Isolation and identification of novel endophytic *Streptomyces* SUK 06 with antimicrobial activity from Malaysian plant. *Asian Journal of Plant Science* 7 (2): 189-194.
- Gurtler, V., Wilson, V.A. & Mayall, B.C. 1991. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology* 137: 2673-2679.
- Gutell, R., Larsen, N. & Woese, C. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16s and 23s rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiology Review* 58: 10-26.
- Lim, Y.Y. & Quah, E.P.L. 2007. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chemistry* 103: 734-740.
- Mehling, A., Wehmeir, F. & Piepersberg, W. 1995. Nucleotide sequences of Streptomyces 16S ribosomal DNA: Towards a specific identification system for Streptomyces using PCR. *Microbiology* 141: 2139-2147.
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G.E. & Merli, S. 1992. Isolation of endophytic streptomycetes strains from surface-sterilized roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58(2): 2691-2693.
- Shirling, E.B. & Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16: 313-340.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology Evolution* 24: 1596-1599.
- Vicente, M.F., Basilio, A., Cabello, A. & Peláez, F. 2003. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clinical Microbiology Infections* 9: 15-32.
- Zin, N.M., Sarmin, M. N., Ghadin, N., Basri, D. F. Sidik, N.M. & Strobel G. 2007. Bioactive endophytic streptomycetes from Malay Peninsula. *FEMS. Microbiology Letters* 274: 83-88.
- Zin, N.M., Loi, C.S., Sarmin, N.M. & Rosli, A.N. 2010. Cultivation-Dependent characterization of endophytic actinomycetes. *Research Journal of Microbiology* 5(8): 717-724.
- Nurul 'Izzah Mohd Sarmin, Noraziah M. Zin\* & Ng Kim Tien  
Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan  
Fakulti Sains Kesihatan  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz  
50300 Kuala Lumpur  
Malaysia
- Nik Marzuki Sidik  
Pusat Pengajian Biosains & Bioteknologi  
Fakulti Sains & Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor  
Malaysia
- Onuma Kaewkla & Christopher M.M. Franco  
Department of Medical Biotechnology  
School of Medicine  
Flinders University  
Bedford Park, South Australia  
5042, Australia

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: nora@medic.ukm.my

Diserahkan: 26 Julai 2010  
Diterima: 2 November 2011