

## Pemencilan, Pencirian dan Afiliasi Filogenetik Endofit *Streptomyces* sp. Bioaktif daripada Pokok yang Mempunyai Nilai Perubatan

(Isolation, Characterisation and Phylogenetic Affiliation of Bioactive Endophytic *Streptomyces* sp. Associated with Medicinal Plants)

NURUL 'IZZAH MOHD SARMIN<sup>1,2</sup> & NORAZIAH MOHAMAD ZIN<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre of Preclinical Science Studies, Universiti Teknologi MARA, Sungai Buloh Campus, Jalan Hospital, 47000 Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Atta-ur-Rahman Institute for Natural Product Discovery, Universiti Teknologi MARA, Selangor Branch, 42300 Selangor, Malaysia

<sup>3</sup>Centre for Diagnostic, Therapeutic and Investigative Studies, Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

Diserahkan: 29 Ogos 2023/Diterima: 6 September 2024

### ABSTRAK

Kepelbagaian biologi tumbuhan di hutan Malaysia menyediakan persekitaran yang sesuai untuk pemencilan *Streptomyces* endofit. Strain novel *Streptomyces* merupakan sumber berpotensi dalam menghasilkan sebatian farmaseutikal bioaktif yang boleh dibangunkan sebagai ubatan baharu. Kajian ini bertujuan untuk memencilkan *Streptomyces* endofit daripada tumbuhan ubatan yang berbeza di Hutan Simpan Bangi, pengenalpastian, pencirian dan analisis filogenetik pencilan tersebut. *Streptomyces* endofit dipencilkan menggunakan kaedah sterilisasi permukaan dan pencilan ini seterusnya dikenal pasti menggunakan pemerhatian morfologi. *Streptomyces* endofit yang dipencilkan telah dikelaskan ke dalam kumpulan berdasarkan warna miselium aerial. Analisis jujukan gen 16S rRNA telah dijalankan untuk mentakrifkan hubungan filogenetik antara spesies yang berkait rapat dan juga antara strain yang tergolong dalam satu spesies. Semua pencilan kemudiannya diuji untuk aktiviti antimikrob. Tiga *Streptomyces* endofit iaitu SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 telah berjaya dipencilkan daripada tumbuhan ubatan yang berbeza. Ketiga-tiga pencilan tersebut dikelaskan dalam kumpulan siri kelabu berdasarkan warna miselium aerial. Siri kelabu ini juga membentuk kelompok filogenetik yang sama berdasarkan data jujukan gen 16S rRNA. Berdasarkan analisis filogenetik jujukan gen 16S rRNA, semua pencilan dikelaskan sebagai *Streptomyces eurythermus* ATCC 14975<sup>T</sup> (persamaan jujukan gen 98.5%). Pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 juga menunjukkan corak aktiviti biologi yang serupa yang berupaya merencat sehingga 100% organisma patogen yang sama. Keputusan ini mengesahkan bahawa terdapat korelasi yang baik antara kepelbagaian fenotip antimikrob dan gen 16S rRNA. Kesimpulannya, metabolit aktif yang berpotensi daripada *Streptomyces* endofit boleh dijangka daripada data taksonomi yang baik.

Kata kunci: Endofit; kajian filogenetik; *Streptomyces*; tumbuhan ubatan; 16S rRNA

### ABSTRACT

The high biodiversity of plant species in Malaysian forests provides a suitable environment for the isolation of endophytic *Streptomyces*. Novel strains of *Streptomyces* are potential sources for producing bioactive pharmaceutical compounds that can be developed as new drug candidates. This study aims to isolate the endophytic *Streptomyces* from different medicinal plants in the Bangi Reserve Forest before identification, characterisation, and phylogenetic analysis of the isolates. The endophytic actinomycetes were isolated using surface-sterilization method and further identified through morphological observation. The isolated endophytic *Streptomyces* were classified based on the colour of aerial mycelium. 16S rRNA gene sequence analysis was done to define the phylogenetic relationships among closely related species and strains belonging to a species. All isolates were then tested for their antimicrobial activities. Three endophytic *Streptomyces*, SUK 8, SUK 10 and SUK 15 were successfully isolated from different medicinal plants. These three isolates were classified into a grey series group based on the colour of aerial mycelium. The grey series also formed the same phylogenetic clade based on the 16S rRNA sequence data. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences showed all three isolates were classified as *Streptomyces eurythermus* ATCC 14975<sup>T</sup> (gene sequence similarity 98.5%). Isolates of SUK 8, SUK 10 and SUK 15 also showed similar patterns of biological activities with inhibition of up to 100% of the same pathogenic organisms.

These findings proved a good correlation between the diversity of the antimicrobial phenotype and the 16S rRNA gene. In conclusion, the potential of active metabolites from endophytic *Streptomyces* can be expected from a good source of taxonomy data.

Keywords: Endophytes; medicinal plants; phylogenetic study; *Streptomyces*; 16S rRNA

## PENDAHULUAN

Mikroorganisma endofit hidup di dalam tisu dalam tumbuhan dan berhubungan secara simbiotik atau mutualistik dengan tumbuhan perumah mereka tanpa menyebabkan gejala jangkitan. Endofit boleh dijumpai dalam hampir semua spesies tumbuhan. Terdapat laporan bahawa endofit menyumbang kepada perkembangan evolusi perumah dengan menghasilkan pelbagai metabolit sekunder yang memberikan ketahanan terhadap penyakit bagi kelangsungan hidup (Strobel et al. 2004). Aktinomiset merupakan endofit bakteria yang paling kerap ditemui dan dikaji sebagai sumber baharu dalam penghasilan sebatian bioaktif. Aktinomiset adalah bakteria Gram positif yang tinggi kandungan G+C dalam DNA yang menghasilkan pelbagai metabolit sekunder termasuk antibiotik, antitumor dan hormon pengawalatur pertumbuhan tumbuhan yang sangat penting untuk industri farmaseutikal dan pertanian (Fiedler et al. 2008).

Dalam kalangan Aktinomiset, *Streptomyces* masih dianggap sebagai sumber terpenting dalam penghasilan metabolit sekunder bioaktif (Donald et al. 2022). *Streptomyces* mempunyai beberapa kluster gen biosintetik (BGC) pada setiap genom yang merupakan punca kepada pelbagai sebatian bioaktif untuk kegunaan perubatan atau pertanian (Nicault et al. 2021; Ward & Allenby 2018). Spesies *Streptomyces* menyumbang kepada penghasilan pelbagai produk semula jadi (Azerang & Sardari 2017; Genilloud 2017; Lapaz et al. 2019; Xia et al. 2020) kerana menghasilkan metabolisma sekunder yang baik dan kompleks (Chang et al. 2021). *Streptomyces* menghasilkan kira-kira 100,000 sebatian antibiotik, yang mewakili 70-80% daripada semua produk bioaktif semula jadi yang mempunyai aplikasi farmakologi atau agrokimia (Abdel-Razek et al. 2020; Bubici 2018; Harir et al. 2018).

Kepelbagaian persekitaran ekologi mempengaruhi kepelbagaian biologi dan taburan spesies *Streptomyces* dalam tumbuhan perumah (Hou et al. 2009; Sheil 1999). Penyelidikan terdahulu telah mengkaji kepelbagaian biologi dan potensi antimikrob daripada pelbagai tumbuhan ubatan dari pelbagai negara (Qin et al. 2009; Verma et al. 2009). Dalam kajian ini, kami memencil, mengenal pasti dan mencirikan tiga pencilan *Streptomyces* endofit dan potensi biosintetik yang berkaitan dengan tumbuhan ubatan tertentu dari Hutan Simpan Bangi, Selangor, Malaysia.

## BAHAN DAN KAEDAH

### PENSAMPELAN TUMBUHAN

Bahagian batang ranting tumbuhan yang diperoleh daripada Hutan Simpan Bangi, Selangor ialah *Scindapsus hederaceus* Miq. (Akar ular, akar lebang), *Shorea ovalis* Blume (Meranti kepong) dan *Cinnamomum mollissimum* Hook.f. (Medang lawang).

### PEMENCILAN *Streptomyces* sp.

Bahagian batang ranting tumbuhan yang telah dikerat, dicuci dengan air untuk mengeluarkan zarah tanah dan kemudian dikeringkan dengan menggunakan tisu dan dibiarkan seketika sehingga kering. Seterusnya, bahagian batang tersebut dirawat dengan 70% alkohol selama 1 minit, diikuti oleh 50% Clorox® dan 95% alkohol masing-masing selama 3 minit dan 30 saat. Akhir sekali, bilasan dilakukan menggunakan air suling disteril sebanyak tiga kali dan dikeringkan di dalam piring Petri seketika (Ghadin et al. 2008). Dengan menggunakan pisau yang steril, lapisan luar batang tumbuhan dibuang. Hanya bahagian dalam yang berwarna putih diambil dan dikerat kepada saiz 1×1 cm. Keratan tersebut dikultur ke atas medium agar air (WA) yang ditambah asid nalidiksik (20 µg/mL) dan sikloheksamida (40 µg/mL). Kultur dieram pada suhu 27 °C dalam keadaan gelap selama empat minggu untuk memencilkan *Streptomyces* (Zin et al. 2007). Kultur *Streptomyces* yang hidup dipilih berdasarkan morfologi dan diasingkan ke dalam media ISP 2. Plug miselium dan spora *Streptomyces* disimpan dalam 15% gliserol pada suhu -80 °C untuk simpanan jangka masa panjang.

### PEMERHATIAN MORFOLOGI

Morfologi *Streptomyces* seperti miselium aerial, warna jisim aerial, miselium substrat dan pigmen larut diperhatikan pada hari ke-14 pertumbuhan (Sarmin et al. 2013).

### PENGEKSTRAKAN DAN PENJUJUKAN DNA

Genom DNA diekstrak dan jujukan gen 16S rRNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer universal bakteria gen 16S rRNA (Coombs & Franco 2003). Jujukan DNA yang diperoleh kemudiannya dibandingkan dengan

jujukan yang terdapat dalam pangkalan data GenBank menggunakan program BLASTN melalui laman sesawang <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Altschul et al. 1997) dan pangkalan data EzTaxon-e (Kim et al. 2012). Pengiraan persamaan jujukan berpasangan dijalankan dengan menggunakan *global alignment algorithm* di EzTaxon. Hasil penjujukan DNA turut dilaraskan beberapa kali dengan jujukan gen 16S rRNA yang berkait rapat dengan spesies di dalam genus *Streptomyces* yang terdapat dalam GenBank/EMBL dengan menggunakan program CLUSTAL W (Thompson, Higgins & Gibson 1994).

#### ANALISIS FILOGENETIK

Analisis filogenetik bagi pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 dilakukan dengan menggunakan jujukan separa gen 16S rRNA. Jujukan disejajarkan dan hasilnya disunting 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 hubung kait jiran (NJ) dan parsimoni maksimum (MP). Kaedah NJ adalah suatu kaedah untuk membina semula pokok filogenetik daripada data jarak evolusi dan mengira panjang ranting pada pokok tersebut. Dalam setiap langkah, dua nod yang paling hampir pada pokok tersebut dipilih dan dikenali sebagai jiran di dalam pokok tersebut. Jiran dalam pokok ini adalah sepasang unit taksonomi operasi (OTU) yang disambung dengan satu nod. Langkah ini dilakukan secara berulang sehingga semua nod mempunyai pasangan (Saitou & Nei 1987). Kaedah MP pula adalah kaedah yang sering digunakan untuk membina semula filogeni. Kaedah ini memilih topologi pokok yang betul dengan kadar evolusi yang minimum (Fitch 1971).

Bagi kaedah NJ, jarak pasangan demi pasangan dikira dengan menggunakan model dua parameter Kimura (Tamura et al. 2007). Bagi MP, jarak pasangan demi pasangan dikira dengan menggunakan pertukaran-jiran dekat (aras carian = dua, penambahan rawak = 100). Topologi bagi pokok tersebut dinilai dengan menggunakan analisis butstrap pada kaedah NJ (Felsenstein 1985) dengan 1000 pseudoreplikasi. *Kitasatospora setae* KM-6054<sup>T</sup> (nombor akses GenBank AP0109868) digunakan sebagai kumpulan luar.

#### UJIAN PENYARINGAN ANTIMIKROB

Mikroorganisma yang digunakan dalam ujian penyaringan ialah bakteria *Bacillus cereus* (ATCC 6464), *B. cereus*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *B. subtilis* strain klinikal, *Escherichia coli* (NCTC 12079), *E. coli* (NCTC 10964), *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* (NTCT 5188),

*Salmonella typhimurium* (NTCT 74), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591), MRSA Sa7 dan kulat *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Rhizoctonia solani* dan *Trichoderma viride*. Bagi ujian penyaringan ke atas bakteria, pencilan *Streptomyces* sp. diinokulasi secara berjalur di atas agar ISP 2 dan dieram pada suhu 28 °C selama 14 hari. Bakteria ujian diinokulasi secara seranjang dengan pencilan aktinomiset dan dieram pada suhu 37 °C semalaman (Arasu et al. 2009). Bagi ujian terhadap kulat patogen, setiap pencilan *Streptomyces* sp. bersaiz 1×1 cm dikulturkan di atas agar ISP 2 selama 14 hari. Kemudian, plak agar yang mengandungi kulat ujian diletakkan 1 cm daripada pencilan *Streptomyces* sp. tersebut. Pertumbuhan mikrob ujian diperiksa selepas 24, 48 dan 72 jam dan direkodkan berbanding dengan plat kawalan yang hanya mempunyai mikroorganisma ujian. Mikroorganisma ujian yang tidak hidup selepas 72 jam dipindahkan ke atas agar dekstrosa kentang (PDA) bagi kulat dan agar nutrien (NA) bagi bakteria untuk menentukan sama ada ia telah direncat atau dibunuh (Zin et al. 2007).

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

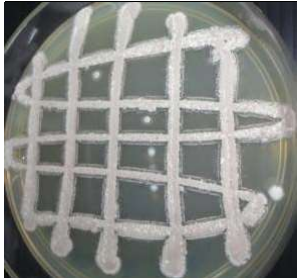
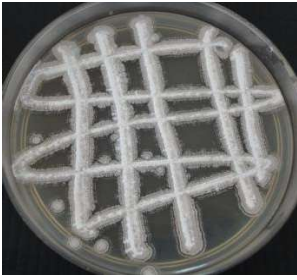

Sebanyak tiga endofit *Streptomyces* sp. berjaya dipencilkan daripada sampel tumbuhan yang diperoleh dari Hutan Simpan Bangi, Selangor dan dinamakan sebagai SUK 08, SUK 10 dan SUK 15. Kesemua endofit disahkan sebagai *Streptomyces* sp. berdasarkan ciri hifa, pembentukan spora dan yang paling utama daripada analisis penjujukan separa gen 16S rRNA dengan GenBank (Jadual 1). Endofit tersebut telah disimpan di UKM dan diberikan nombor deposit strain UKM (SUK).

Pencilan aktinomiset endofit dicirikan berdasarkan ciri morfologinya di atas pelbagai media ISP mengikut piawai yang telah digariskan oleh Shirling dan Gottlieb (1966). Ciri morfologi ini dicatatkan apabila kesemua pencilan telah mencapai tahap matang iaitu pada hari ke 14. Penentuan warna miselia dan pigmen adalah melalui perbandingan kultur dengan cip warna yang paling bersesuaian pada carta warna ISCC-NBS (Kelly 1964).

Media pertumbuhan yang berbeza digunakan untuk memilih media terbaik yang sesuai untuk menyokong proses sporulasi pencilan yang dapat diperhatikan daripada kadar pertumbuhan pencilan di atas beberapa media tersebut. Didapati bahawa kadar pertumbuhan semua pencilan adalah paling baik di atas media ISP 3 (Jadual 2). Hasil pemerhatian warna miselia arial di atas media ISP 3 juga mendapati bahawa pencilan boleh digolongkan kepada kumpulan kelabu (Jadual 2).

Analisis jujukan separa gen 16S rRNA dilakukan terhadap pencilan *Streptomyces* endofit bagi mengenal pasti hubungan kesemua pencilan yang diperoleh dengan ahli

JADUAL 1. Sumber tumbuhan yang digunakan untuk pemencilan aktinomiset endofit, nombor deposit UKM dan nombor deposit jujukan di GenBank

Pencilan	Sumber tumbuhan	No. Deposit UKM	No. Deposit GenBank	Morfologi aktinomiset endofit di atas agar ISP 2
1	<i>Scindapsus hederaceus</i> Miq.	SUK 08	HM449820	
2	<i>Shorea ovalis</i> (Korth.) Blume ssp. <i>sericea</i> (Dyer) P.S. Ashton	SUK 10	HM449822	
3	<i>Cinnamomum mollissimum</i> Hook.f.	SUK 15	GU247514	

JADUAL 2. Pencirian pencilan aktinomiset endofit berdasarkan pemerhatian morfologi dan kadar pertumbuhan

Pencilan	Media	Miselia arial	Miselia substrat	Pigmen larut	Kadar pertumbuhan
SUK 8	ISP 2	Kelabu keputihan	Kuning	Coklat cair	+++
	ISP 3	Kelabu keputihan	Kuning kecoklatan	Tiada	+++
	ISP 4	Kelabu	Tidak berwarna	Tiada	+
	ISP 5	Kelabu keputihan	Coklat cair	Tiada	+++
SUK 10	ISP 2	Kelabu keputihan	Kuning kecoklatan	Coklat cair	+++
	ISP 3	Kelabu keputihan	Kuning kecoklatan	Tiada	+++
	ISP 4	Kelabu	Tidak berwarna	Tiada	+
	ISP 5	Kelabu keputihan	Coklat cair	Merah cair	+++
SUK 15	ISP 2	Kelabu keputihan	Coklat	Coklat cair	+++
	ISP 3	Kelabu keputihan	Kuning terang	Tiada	+++
	ISP 4	Kelabu	Tidak berwarna	Tiada	+++
	ISP 5	Kelabu	Coklat cair	Tiada	+

yang berkaitan di dalam aktinomiset selain mengesahkan hasil daripada pemerhatian morfologi. Analisis penjujukan separa gen 16S rRNA terhadap semua pencilan aktinomiset endofit yang dipencilkan menunjukkan bahawa pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 didapati paling hampir dengan *Streptomyces eurythermus* ATCC 14975<sup>T</sup> (persamaan jujukan gen 16S rRNA sebanyak 98.5%) (Jadual 3). Peratus persamaan yang tinggi ini turut disokong dengan hasil pembinaan pokok filogenetik. Hujung cabang bagi pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 disokong dengan nilai butstrap sebanyak 100 yang menunjukkan bahawa ketiga-tiga pencilan ini mempunyai kesamaan yang tinggi dari segi jujukan gen 16S rRNA (Rajah 1). Nilai butstrap daripada 1,000 pseudoreplikasi ditunjukkan pada setiap hujung ranting pokok. Skala bar mewakili 0.01 perubahan per nukleotida.

Analisis filogenetik NJ menunjukkan bahawa sebanyak tiga ahli di dalam kumpulan siri warna kelabu iaitu pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 yang tergolong di dalam klad filogenetik yang sama telah dipencilkan daripada tumbuhan yang berbeza di lokasi pensampelan yang sama iaitu Hutan Simpan Bangi, Selangor (Rajah 1). Ini menunjukkan bahawa kumpulan berdasarkan warna miselia adalah indeks yang bernilai pada kepelbagaian taksonomi bagi *Streptomyces* di dalam habitat semula jadi (Atalan et al. 2000). Data penjujukan DNA juga boleh digunakan untuk mengukur unit kepelbagaian prokariot yang mempunyai nilai penting pada spesies tersebut (Stackebrandt et al. 2002). Sebagai contoh, di dalam klad gen 16S rRNA *Streptomyces violaceusniger* adalah sumber bagi metabolit yang mempunyai aktiviti antibakteria dan antikulat (Goodfellow et al. 2007). Pengelasan kumpulan ini dapat dilihat sebagai satu klad jujukan yang berkongsi persamaan pada jujukan gen yang berkaitan antara satu sama lain yang digunakan untuk menggambarkan populasi ekologi (Gevers et al. 2005).

Pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 juga menunjukkan persamaan yang tinggi dari segi jujukan gen 16S rRNA. Ketiga-tiga pencilan ini mungkin adalah spesies yang sama namun penemuan ini juga menunjukkan bahawa pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 mungkin berendemik pada Hutan Simpan Bangi. Menurut Staley dan Gosink (1999), bukti yang paling tepat untuk menunjukkan suatu organisma adalah endemik pada aras spesies dalam lokasi geografinya adalah daripada analisis jujukan prokariot. Ia mungkin disebabkan oleh kawasan geografi Hutan Simpan Bangi yang menyebabkan proses homogenisasi genetik berlaku pada suatu tempoh masa (Majewski & Cohan 1999). Hutan tersebut juga menyediakan keadaan yang bersesuaian yang membenarkan ketiga-tiga pencilan tersebut terus berhubungan antara mikrob-tumbuhan. Spora endofit ini pula bersedia untuk memasuki tumbuhan berdekatan untuk menjadi perumahnya yang baharu.

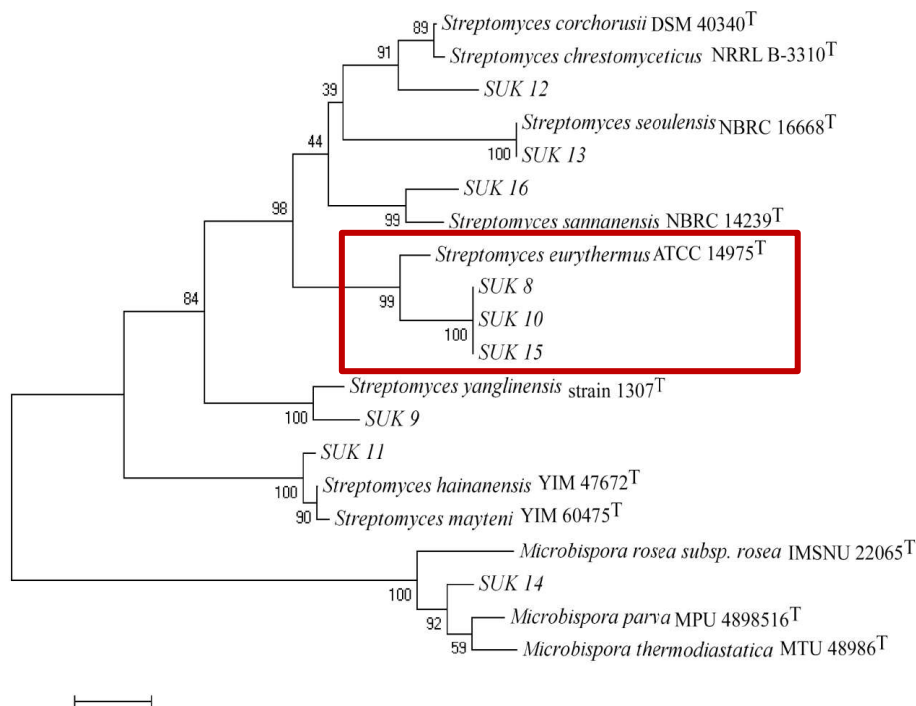
Kesudahannya, ini akan membenarkan hubungan antara mikrob-tumbuhan secara berterusan (Castillo et al. 2007). Antony-Babu dan Goodfellow (2008) juga mengesahkan bahawa prosedur genetik molekul dan fenotip digunakan untuk mengesahkan hubungan taksonomi antara enam strain alkalifik *Streptomyces griseus* yang dipencilkan daripada lokasi pensampelan yang sama dan menemui bahawa strain tersebut berkongsi kesamaan gen 16S rRNA yang tinggi. Satheer dan Jebakumar (2011) juga menemui bahawa analisis gen 16S rRNA streptomiset yang dipencilkan daripada sedimen paya bakau membentuk satu populasi kumpulan pada *clade* filogenetik yang sama yang menunjukkan kepelbagaian *Streptomyces* pada sedimen paya bakau.

Walaupun bernilai, analisis jujukan separa tidak menjadi keutamaan di dalam penentuan taksonomi kecuali ia menunjukkan darjah kesamaan yang sama dengan jujukan penuh (Stackebrandt & Goebel 1994). Urutan cabang pada pokok filogenetik adalah bergantung bukan sahaja kepada perbezaan komposisi bes, ukuran waktu evolusi, kadar evolusi yang tidak sama di dalam kawasan yang berbeza pada gen rRNA dan pemilihan jujukan yang dianalisis tetapi ia juga bergantung kepada bilangan organisma dan pemilihan organisma rujukan.

Penyaringan awal bioaktiviti aktinomiset endofit telah dilakukan terhadap semua pencilan yang dikultur. Jadual 3 menunjukkan hasil bioasai aktinomiset endofit ke atas pelbagai organisma ujian. Peratus perencatan 100% merujuk kepada perencatan sepenuhnya terhadap organisma ujian (tiada pertumbuhan). Hasil ujian mendapati bahawa pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 menunjukkan aktiviti antimikrob terhadap mikroorganisma ujian yang sama. Menariknya, pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 yang berada dalam klad filogenetik yang sama mempunyai aktiviti antimikrob terhadap mikroorganisma yang sama. Pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 mempunyai aktiviti antibakteria terhadap *S. enteritidis* (NCTC 5188), *S. typhimurium* (NCTC 74), *E. coli*, *E. coli* (NCTC 12079) dan *E. coli* (NCTC 10964) (Jadual 4). Di samping itu, aktiviti antikulat bagi pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 ini amat memberangsangkan dan ia berupaya merencat 100% *A. niger* dan sehingga membunuh 100% *F. solani* dan *T. viride*. Peratus perencatan bagi kulat patogen tumbuhan *G. candidum* oleh SUK 08 dan SUK 10 ialah 91.7% manakala SUK 15 ialah 66.7%. Pencilan SUK 08, SUK 10 dan SUK 15 masing-masing berupaya membunuh 100%, merencat 94.1% dan merencat 100% *R. solani*. Selain itu, SUK 08 dan SUK 10 berupaya merencat *A. fumigatus* melebihi 80%. Hasil daripada analisis pokok filogenetik ini mencadangkan bahawa klad gen biosintetik yang sama mungkin bertanggungjawab untuk mensintesis produk metabolit sekunder yang sama (Goodfellow et al. 2007).

JADUAL 3. Keputusan carian BLAST jujukan gen 16s rRNA SUK 8, SUK 10 dan SUK 15

SUK	No. akses	Huraian	Skor max	Jumlah skor	Liputan	Nilai E	Identiti max
8	NR_0411158.1	<i>Streptomyces capillispiralis</i> strain NBRC 14222 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184577.1  <i>Streptomyces capillispiralis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain NBRC 14222	2501	2501	100%	0.0	98%
	NR_0411135.1	<i>Streptomyces anandii</i> strain NBRC 13438 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184402.1  <i>Streptomyces anandii</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13438	2501	2501	100%	0.0	98%
	NR_0411179.1	<i>Streptomyces gancidicus</i> strain NBRC 15412 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184660.1  <i>Streptomyces gancidicus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15412	2497	2497	100%	0.0	98%
	NR_043835.1	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> strain NRRL B-3288 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ442541.1  <i>Streptomyces pseudogriseolus</i> strain NRRL B-3288T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	100%	0.0	98%
	NR_025869.1	<i>Streptomyces erythermus</i> strain ATCC 14975 16S ribosomal RNA, complete sequence >dbj D63870.1  <i>Streptomyces erythermus</i> 16S ribosomal RNA, complete sequence	2179	2179	99%	0.0	98%
10	NR_0411158.1	<i>Streptomyces capillispiralis</i> strain NBRC 14222 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184577.1  <i>Streptomyces capillispiralis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14222	2468	2468	100%	0.0	98%
	NR_0411135.1	<i>Streptomyces anandii</i> strain NBRC 13438 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184402.1  <i>Streptomyces anandii</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13438	2468	2468	100%	0.0	98%
	NR_0411179.1	<i>Streptomyces gancidicus</i> strain NBRC 15412 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184660.1  <i>Streptomyces gancidicus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15412	2464	2464	100%	0.0	98%
	NR_043835.1	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> strain NRRL B-3288 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ442541.1  <i>Streptomyces pseudogriseolus</i> strain NRRL B-3288T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2462	2462	100%	0.0	98%
	NR_025869.1	<i>Streptomyces erythermus</i> strain ATCC 14975 16S ribosomal RNA, complete sequence >dbj D63870.1  <i>Streptomyces erythermus</i> 16S ribosomal RNA, complete sequence	2179	2179	99%	0.0	98%
15	FJ406114.1	<i>Streptomyces coeruleus</i> strain AS 4.1597 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	98%
	NR_043506.1	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i> strain NRRL B-5417 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb DQ026668.1  <i>Streptomyces coeruleofuscus</i> strain NRRL B-5417 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	98%
	NR_0411101.1	<i>Streptomyces fumanus</i> strain NBRC 13042 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184273.1  <i>Streptomyces fumanus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13042	1181	1181	100%	0.0	98%
	NR_025869.1	<i>Streptomyces erythermus</i> strain ATCC 14975 16S ribosomal RNA, complete sequence >dbj D63870.1  <i>Streptomyces erythermus</i> 16S ribosomal RNA, complete sequence	1179	1179	99%	0.0	98%
	NR_0411174.1	<i>Streptomyces cinereospinus</i> strain NBRC 15397 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184648.1  <i>Streptomyces cinereospinus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15397	1175	1175	100%	0.0	98%



RAJAH 1. Pokok filogenetik NJ daripada jujukan separa 16S rRNA bagi pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 dan beberapa spesies aktinomiset yang diketahui

JADUAL 4. Ujian saringan aktiviti biologi aktinomiset endofit terhadap mikroorganisma ujian

Organisma ujian	Peratus perencatan (%)		
	SUK 8	SUK 10	SUK 15
<i>Salmonella enteritidis</i> NCTC 5188	20	47.6	59.6
<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC 74	33.3	36.2	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40.4	52.7	58.3
<i>Enterococcus faecalis</i>	22	58.5	40.7
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	54	76.2	62
<i>Bacillus cereus</i>	51.8	64.8	71.7
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 6464	60	76.4	54.2
<i>Escherichia coli</i>	38.5	54.4	58
<i>Escherichia coli</i> NCTC 12079	46.7	63.5	58.2
<i>Escherichia coli</i> NCTC 10964	50	60	59.5
MRSA Sa7	40.4	54	42.2
MRSA ATCC 33591	47.9	54	40
<i>Aspergillus fumigatus</i>	84.6	84.6	69.2
<i>Geotrichum candidum</i>	91.7	91.7	66.7
<i>Aspergillus niger</i>	100	100	100
<i>Fusarium solani</i>	100	100	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	100	94.1	100
<i>Trichoderma viride</i>	100	100	100

Terdapat bukti bahawa hanya *Streptomyces* daripada garisan filetik yang tertentu boleh menghasilkan metabolit aktif yang khusus, seperti penghasilan *clavulanic acid* yang merupakan perencat poten  $\beta$ -lactamase daripada subklad *Streptomyces clavuligerus* (Payne, Ward & Goodfellow 2001). Kepelbagaian populasi *Streptomyces* yang wujud pada kawasan hutan paya bakau juga menunjukkan hubungan yang baik antara ciri fenotip, kepelbagaian genetik pada jujukan gen 16S rRNA dan aktiviti antimikrobnya (Satheer & Jebakumar 2011).

Hasil kajian bagi pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 yang menemukan kesamaan antara siri kumpulan warna, hubungan filogenetik data jujukan gen 16S rRNA dan aktiviti antimikrobnya boleh dipilih sebagai pencilan yang rasional untuk program saringan bagi mengesan kehadiran suatu metabolit sekunder (Atalan et al. 2000). Ini kerana terdapat bukti bahawa penentuan taksonomi boleh digunakan sebagai refleksi kepada kepelbagaian sebatian kimia bagi *Streptomyces* seperti yang ditemui pada klad gen 16S rRNA *Streptomyces violaceoruber* yang menghasilkan *actinorhodin* (Ward & Goodfellow 2004); *clavulanic acid* daripada *S. clavuligerus* (Ward & Goodfellow 2004); elaiofilin, geldanamycin dan nigericin daripada ahli klad gen 16S rRNA *S. violaceusniger* (Goodfellow et al. 2007); salinosporamide A dan sporelone A daripada *Salinispora tropica* (Jensen et al. 2007) dan kigamicin daripada *Amycolatopsis regifaucium* (Tan et al. 2007). Bagaimanapun, pemencilan sebatian tulen daripada klad gen 16S rRNA pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 diperlukan bagi menyokong penemuan ini.

#### KESIMPULAN

Pencilan SUK 8, SUK 10 dan SUK 15 yang merupakan ahli di dalam siri kumpulan warna kelabu yang dipencilkan daripada kawasan pensampelan yang sama (Hutan Simpan Bangi) membentuk klad filogenetik yang sama. Ketiga-tiga pencilan ini juga menunjukkan corak aktiviti antimikrob yang hampir serupa. Di dalam kajian ini, populasi *Streptomyces* yang pelbagai wujud di Hutan Simpan Bangi menunjukkan korelasi yang baik antara sifat fenotip aktiviti antimikrob dan kepelbagaian genetik jujukan gen 16S rRNA. Ini menunjukkan bahawa potensi metabolit aktif daripada *Streptomyces* boleh dijangkakan daripada analisis taksonomi.

Pencilan *Streptomyces* terhadap mikroorganisma patogen mencadangkan bahawa endofit yang dipencilkan daripada Hutan Simpan Bangi boleh menjadi sumber yang menarik untuk pembangunan ubatan baharu. Walau bagaimanapun, analisis jujukan penuh 16S rRNA bagi setiap pencilan dan analisis jujukan multilokus (MLST) diperlukan untuk merungkai hubungan yang lebih mendalam antara organisma aktinomiset ini.

#### RUJUKAN

- Abdel-Razek, A.S., El-Naggar, M.E., Allam, A., Morsy, O.M. & Othman, S.I. 2020. Microbial natural products in drug discovery. *Processes* 8: 470.
- Antony-Babu, S. & Goodfellow, M. 2008. Biosystematics of alkaliphilic streptomycetes isolated from seven locations across a beach and dune sand system. *Antonie van Leeuwenhoek* 94(4): 581-591.
- Atalan, E., Manfio, G.P., Ward, A.C., Kroppenstedt, R.M. & Goodfellow, M. 2000. Biosystematic studies on novel streptomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 77(4): 337-353.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3444.
- Arasu, M.V., Duraipandian, 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.
- Azerang, P. & Sardari, S. 2017. Bioactive compound produced from Actinomycetes-*Streptomyces*. *Chemistry* 151: 1507-1523.
- Bubici, G. 2018. *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species. *CAB Rev.* 13: 50.
- 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. *Environmental Microbiology* 69(9): 5603-5608.
- Chang, T.L., Huang, T.W., Wang, Y.X., Liu, C.P., Kirby, R., Chu, C.M. & Huang, C.H. 2021. An actinobacterial isolate, *Streptomyces* sp. YX44, produces broad-spectrum antibiotics that strongly inhibit *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* 9: 630.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. & Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259-2261.
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R.A. & Taufa, T. 2022. *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. *Microbiology Research* 13(3): 418-465.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.



- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Riedlinger, J., Bull, A.T., Knutsen, G., Goodfellow, M., Jones, A., Maldonado, L., Pathom-aree, W., Beil, W., Schneider, K., Keller, S. & Sussmuth, R.D. 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: 158-163.
- Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Genilloud, O. 2017. Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports* 34: 1203-1232.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P. & Thompson, F.L. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3(9): 733-739.
- 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.
- Goodfellow, M., Kumar, Y., Labeda, D.P. & Sembiring, L. 2007. The *Streptomyces violaceusniger* clade: A home for streptomycetes with rugose ornamented spores. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 173-199.
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z. & Pogni, R. 2018. *Streptomyces* secondary metabolites. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria* 6: 99-122.
- Hou, B.C., Wang, E.T., Li, Y., Jia, R.Z., Chen, W.F., Man, C.X., Sui, X.H. & Chen, W.X. 2009. Rhizobial resource associated with epidemic legumes in Tibet. *Microbial Ecology* 57: 69-81.
- Jensen, P.R., Williams, P.G., Oh, D.C., Zeigler, L. & Fenical, W. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4): 1146-1152.
- Kelly, K.L. 1964. Inter-society colour council-national bureau of standards color-name charts illustrated with centroid colors. Washington: U.S. Govt. Print. Off.
- Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H, Yi, H., Won, S. & Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 716-721.
- Lapaz, M.I., Cisneros, E.J., Pianzola, M.J. & Francis, I.M. 2019. Exploring the exceptional properties of *Streptomyces*: A hands-on discovery of natural products. *The American Biology Teacher* 81: 658-664.
- Majewski, J. & Cohan, F.M. 1999. DNA sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*. *Genetics* 153(4): 1525-1533.
- Nicault, M., Zaiter, A., Dumarcay, S., Chaimbault, P., Gelhaye, E., Leblond, P. & Bontemps, C. 2021. Elicitation of antimicrobial active compounds by streptomycetes-fungus co-cultures. *Microorganisms* 9: 178.
- Sarmin, N.I.M., Tan, G.Y.A., Franco, C.M.M., Edrada-Ebel, R., Latip, J. & Zin, N.M. 2013. *Streptomyces kebangsaanensis* sp. nov. an endophytic actinomycete isolated from a Malaysian ethnomedicinal plant, that produces phenazine-1-carboxylic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 3733-3738.
- Payne, G., Ward, A.C. & Goodfellow, M. 2001. The *Streptomyces clavuligerus* clade: A home for clavulanic acid producing streptomycetes. *The 12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA)*, 5-9 August, Vancouver, British Columbia, Canada.
- Qin, S., Li, J., Chen, H.H., Zhao, G.Z. & Zhu, W.Y. 2009. Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied Environmental Microbiology* 75: 6176-6186.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Satheeraja, S.V. & Jebakumar, S.R.D. 2011. Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from mangrove sediment. *Journal of Basic Microbiology* 51(1): 71-79.
- Sheil, D. 1999. Tropical forest diversity, environmental change and species augmentation: After the intermediate disturbance hypothesis. *Journal of Vegetation Science* 10: 851-860.
- Shirling, E.B. & Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16: 313-340.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. & Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(Pt 3): 1043-1047.
- Staley, J.T. & Gosink, J.J. 1999. Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53: 189-215.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257-268.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tan, G.Y.A., Robinson, S., Lacey, E., Brown, R., Kim, W. & Goodfellow, M. 2007. *Amycolatopsis regifaucium* sp. nov., a novel actinomycete that produces kigamicins. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(11): 2562-2567.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Verma, V.C., Gond, S.K., Kumar, A., Mishra, A., Kharwar, R.N. & Gange, A.C. 2009. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microb. Ecol.* 57: 749-756.
- Ward, A.C. & Allenby, N.E.E. 2018. Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: The *Streptomyces* paradigm. *FEMS Microbiology Letters* 365: fny240.
- Ward, A.C. & Goodfellow, M. 2004. Phylogeny and functionality: Taxonomy as a roadmap to genes. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*, edited by Bull, A.T. Washington: ASM Press. pp. 288-313.
- Xia, H., Li, X., Li, Z., Zhan, X., Mao, X. & Li, Y. 2020. The application of regulatory cascades in *Streptomyces*: Yield enhancement and metabolite mining. *Frontiers in Microbiology* 11: 406.
- Zin, N.M., Nurul, I.M.S., Norazli, G., Dayang, F.B., Nik, M.S. & Strobel, G. 2007. Bioactive endophytic streptomyces from the Malay Peninsula. *FEMS Microbiology Letters* 274(1): 83-88.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: noraziah.zin@ukm.edu.my