

Kertas Asli/Original Articles

Pengaruh Sumber Nitrogen Terhadap Pertumbuhan Endofit *Streptomyces* SUK 02 dan Aktiviti Antifungus

(Influence of Nitrogen Source for *Streptomyces* SUK 02 Growth and its Antifungal Activity)

NORAZIAH MOHAMAD ZIN & MARLINI OTHMAN

ABSTRACT

Bakteria endofit adalah berpotensi untuk menghasilkan antibiotik dan metabolit sekunder yang lain. Penghasilan metabolit sekunder dapat ditingkatkan melalui pengoptimuman kandungan nutrien seperti sumber nitrogen. Dalam kajian ini kandungan sumber nitrogen iaitu ammonium sulfat, ammonium dihidrogen fosfat, kalium nitrat dan natrium nitrat telah diubahsuai di dalam kaldu International Streptomyces Project 4 (ISP4) untuk pertumbuhan Streptomyces SUK 02. Pengekstrakan dilakukan dengan menggunakan etil asetat dan aktiviti antifungus ditentukan dengan menggunakan teknik serapan agar. Fungus ujian yang digunakan adalah Aspergillus fumigatus dan Fusarium solani. Hasil kajian menunjukkan peratusan berat (w/v) ekstrak kasar maksima didapati daripada kaldu yang mengandungi natrium nitrat (3.30%), diikuti oleh ammonium dihidrogen fosfat (2.24%), ammonium sulfat (1.46%) dan kalium nitrat (1.20%). Aktiviti antifungus dikesan daripada ekstrak bersumberkan nitrogen ammonium sulfat. Peratus perencatan ekstrak tersebut terhadap Aspergillus fumigatus dan Fusarium solani adalah 33.0-35.0% dan 17.4-30.0%, masing-masing. Manakala nilai MIC terhadap Aspergillus fumigatus adalah 1.5 mg/ml. Sebagai kesimpulan, natrium nitrat merupakan sumber nitrogen yang sesuai bagi pertumbuhan optimum Streptomyces SUK 02 manakala kehadiran ammonium sulfat boleh meningkatkan aktiviti antifungus.

Kata kunci: Streptomyces, endofit, nitrogen, antifungus

ABSTRACT

Endophytic bacteria has the potential to produce antibiotics and other secondary metabolites. The production of secondary metabolites can be enhanced through the optimization of its nutrient content such as the nitrogen source. In this study, the content of nitrogen sources such as ammonium sulphate, ammonium dihydrogen phosphate, potassium nitrate and sodium nitrate have been modified and incorporated in the International Streptomyces Project Medium 4 broth media to optimize the growth of Streptomyces SUK 02. The extraction was carried out using ethyl acetate and the antifungal activity was assayed using agar diffusion method. The test fungus used was Aspergillus fumigatus and Fusarium solani. The results showed that the maximum weight percentage (w/v) of crude extract was obtained when sodium nitrate was used (3.30%), followed by ammonium dihydrogen phosphate (2.24%), ammonium sulfate (1.46%) and potassium nitrate (1.20%). Antifungal activity was obtained from the extracts that contained ammonium sulfat. The percentage of inhibition of this extract against Aspergillus fumigatus and Fusarium solani was 33.0-35.0% and 17.4-30.0%, respectively. Nevertheless, the MIC value against Aspergillus fumigatus was 1.5 mg/ml. In conclusion, sodium nitrate was a suitable nitrogen source for optimum growth of Streptomyces SUK 02 whereas the presence of ammonium sulfat was good to increase the antifungal activity.

Keywords: Streptomyces, endophytes, nitrogen, antifungus

PENDAHULUAN

Endofit merujuk kepada lokasi organisma, di mana “endo~” bermaksud di dalam manakala “~phyte” bermaksud tumbuhan. Oleh itu, endofit adalah organisma yang hidup di dalam tumbuhan namun tidak memberikan kesan negatif terhadap perumah (Ryan et al. 2008). Endofit bakteria mempunyai banyak kesan positif pada hos contohnya, di dalam pengikatan nitrogen, aktiviti antibakteria dan antifungus dan juga merangsang pertumbuhan pada tumbuhan (Berg et al. 2005; Brooks et al. 1994; Rijavec

et al. 2007; Tan et al. 2006). Penyelidikan mengenai endofitik bakteria boleh membawa kepada pengenalpastian antibiotik novel untuk tujuan terapeutik pada manusia, tumbuhan dan haiwan (Ryan et al. 2008; Strobel et al. 2004).

Kajian terhadap antibiotik yang dihasilkan oleh endofitik *Streptomyces* berterusan dengan penemuan beberapa antibiotik baru seperti munumbicins E-4 dan E-5 (Castillo et al. 2006) yang diperolehi daripada *Streptomyces* sp. NRRL 30562 pencilan daripada tumbuhan *K.nigriscans* dan juga coronamycins (Ezra et al. 2004) daripada

Streptomyces sp. MSU-2110 yang dipencilkan daripada tumbuhan *Monstera* sp. Kajian oleh Yan et al. (2010) pula menunjukkan terdapatnya penghasilan antimycin A₁₈ daripada *Streptomyces albidoflavus* pencilan daripada pokok *Bruguiera gymnorrhiza*. Hingga kini, masih terdapat banyak lagi bakteria endofit yang masih dalam kajian dan perlu diterokai dalam pencarian antibiotik yang baru.

Kajian di Malaysia juga telah dilakukan di mana tiga endofit Streptomycete telah berjaya dipencilkan daripada tumbuhan *Thottea grandiflora*, *Ployalthia* sp., dan *Mapania* sp. yang menunjukkan aktiviti antifungal terhadap satu atau lebih fungus patogenik (Zin et al. 2007). Selain itu, kajian oleh Ghadin et al. (2008) menunjukkan endofit *Streptomyces* SUK 06 mengandungi aktiviti antibakteria yang baik terhadap bakteria ujian seperti *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dan *Bacillus cereus*.

Sumber nutrien seperti karbon, nitrogen dan mineral, faktor persekitaran seperti masa, suhu, dan pH didapati mempengaruhi penghasilan antibiotik oleh aktinomiset. (Himabindu & Jetty 2006; Sanchez & Demain 2002). Strain *Streptomyces* yang berbeza memerlukan sumber nitrogen yang berbeza dalam pertumbuhan dan penghasilan metabolit sekundernya. Memandangkan kepentingan *Streptomyces* dalam kajian sebagai sumber metabolit sekunder, maka kajian ini telah memfokuskan kepada pengaruh daripada pengubahsuaian kaldu pertumbuhan terhadap aktiviti antimikrob pencilan Streptomycetes SUK 02.

BAHAN DAN KAEDAH

MIKRO ORGANISMA

Endofit *Streptomyces* SUK 02 digunakan telah dipencilkan daripada pokok *Mapania* sp. Dua bakteria gram positif dan dua fungus ujian: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Aspergillus fumigatus* dan *Fusarium solani*.

MEDIA

Kaldu *International Streptomyces Project* Medium 4 (ISP4) terdiri daripada (g/400 ml): larutan kanji 8.0; K₂HPO₄ 0.8, MgSO₄.7H₂O 0.8, NaCl 0.8, (NH₄)₂SO₄ 1.6, CaCO₃ 1.6 dan larutan unsur surih sebanyak 1ml (g/100 ml) (FeSO₄.7H₂O 0.1, MnCl₂.4H₂O 0.1, ZnSO₄.7H₂O 0.1). Setiap sumber nitrogen diubahsuai supaya mengandungi kepekatan unsur nitrogen 84 mg/ml masing-masing dan dimasukkan ke dalam ISP4 setiap satunya iaitu KNO₃ 2.4, (NH₄)₂HPO₄ 2.8, NaNO₃ 2.2.

KAEDAH PENGKULTURAN

Pengkulturan mikroorganisma dilakukan dengan menggunakan kaedah *streak plate*.Pengkulturan *Streptomyces* SUK 02 dengan menggunakan agar ISP2,

bakteria ujian dikultur menggunakan agar *Mueller Hinton*, manakala fungus ujian dikultur dengan menggunakan agar dektros kentang.

KAEDAH FERMENTASI DAN PENGEKSTRAKAN

Beberapa kiub agar ISP 2 yang mengandungi kultur *Streptomyces* SUK 02 dimasukkan ke dalam 400 ml kaldu ISP 4 yang telah diubah suai sumber nitrogennya dan diletakkan pada *rotary shaker* pada pusingan 140 rpm. Pengkulturan di dalam kaldu dilakukan pada suhu 27°C selama 14 hari. Kemudian kultur dituras untuk memisahkan bahagian miselia dengan supernatan. Supernatan kemudian dicampurkan dengan etil asetat pada nisbah 1 L filtrat dengan 300 mL etil asetat. Campuran digoncang sehingga sebati di dalam corong pemisahan dan kemudian dibiarkan dalam keadaan statik supaya berlaku pemisahan antara fasa pelarut organik (etil asetat) dengan fasa akueus. Fasa pelarut organik dikumpulkan dan proses pengekstrakan menggunakan supernatan yang telah digunakan, diulangi sebanyak 2 kali menggunakan 300 mL etil asetat untuk setiap kali pengekstrakan. Bahagian fasa organik yang telah dikumpulkan seterusnya dikeringkan dengan menggunakan *rotary evaporator* (BUCHI vacuum controller V-800) pada tekanan 240 mbar dan suhu rendaman air 40°C untuk mendapatkan ekstrak kasar.

UJIAN PENYARINGAN ANTIFUNGUS

Sebanyak 50 µl ekstrak dititiskan pada bahagian tengah agar dektros kentang. Fungus ujian yang telah dipotong membentuk kiub 5 mm × 5 mm diletakkan pada jarak 1.5 cm daripada ekstrak. Nilai perencatan diukur dengan membandingkan diameter fungus pada plat kawalan dan plat ujian (Zin et al. 2007). Peratusan dikira dengan menggunakan rumus seperti berikut;

Rumus pengiraan Peratusan Aktiviti Antifungus

$$\text{Peratusan zon perencatan} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Petunjuk:

A - Diameter fungus pada plat kawalan negatif

B - Diameter fungus plat ujian

UJIAN KEPEKATAN PERENCATAN MINIMUM (MIC)

Ujian ini menentukan kebolehan ekstrak untuk merencat pertumbuhan mikro-organisma pada kepekatan yang minimum. Tiub yang mengandungi kepekatan ekstrak kasar dalam julat 4 mg/ml-0.0039 mg/ml diinokulasikan dengan suspensi bakteria pada kepekatan 10⁵ CFU/ml dan dieram pada suhu 37°C selama 24 jam. Bagi ujian MIC fungus pula, media RPMI digunakan sebagai media pengkulturan (CLSI 2002). Nilai MIC ditentukan daripada tiub pertama yang tidak menunjukkan pertumbuhan mikro-organisma (jernih).

HASIL KAJIAN

BERAT EKSTRAK KASAR

Jadual 1 menunjukkan penghasilan ekstrak kasar bagi *Streptomyces* SUK 02. Penghasilan ekstrak kasar adalah paling tinggi bagi kaldu ISP 4 dengan menggunakan natrium nitrat sebagai sumber nitrogen iaitu dengan 3.30% w/v. Ini diikuti dengan penghasilan ekstrak kasar dengan menggunakan sumber nitrogen ammonium fosfat, ammonium sulfat dan akhir sekali kalium nitrat.

JADUAL 1. Peratusan berat ekstrak kasar yang diperolehi daripada pengubahsuaian sumber nitrogen bagi kaldu ISP 4

Sumber nitrogen	Peratusan berat bersih (%w/v)
Ammonium sulfat	1.46
Kalium nitrat	1.20
Amonium dihidrogen fosfat	2.24
Natrium nitrat	3.30

UJIAN PENYARINGAN AKTIVITI ANTIFUNGUS

Jadual 2 menunjukkan peratus perencatan fungus ujian, *Aspergillus fumigatus* terhadap empat jenis ekstrak yang dihasilkan daripada kaldu yang mengandungi sumber nitrogen yang berbeza. Berdasarkan jadual, didapati, peratus perencatan paling tinggi adalah pada ekstrak daripada kaldu yang mengandungi ammonium sulfat (33 – 35%) dan diikuti dengan ekstrak daripada kaldu ammonium dihidrogen fosfat (26.7 – 35%). Manakala, peratus perencatan yang paling rendah adalah pada ekstrak daripada kaldu yang mengandungi kalium nitrat dan natrium nitrat.

JADUAL 2. Peratus perencatan fungus ujian *Aspergillus fumigatus* oleh ekstrak kasar *Streptomyces* SUK 02 dengan pengubahsuaian sumber nitrogen

Sumber nitrogen	Diameter (mm)	Peratus perencatan (mm)± sisihan piawai
Kawalan negatif	35	0.00 ± 0
Ammonium sulfat	23	34.2 ± 0.58
Kalium nitrat	28	20.0 ± 1.15
Amonium dihidrogen fosfat	24	31.4 ± 0.58
Natrium nitrat	31	11.4 ± 1.15

Seterusnya, Jadual 3 menunjukkan peratus perencatan bagi keempat-empat jenis ekstrak daripada kaldu yang telah diubah suai sumber nitrogennya terhadap fungus ujian, *Fusarium solani*. Hasil kajian mendapati peratus perencatan bagi *Fusarium solani* adalah paling tinggi bagi ekstrak daripada kaldu yang mengandungi ammonium sulfat (17.4 – 30.0%) diikuti dengan ekstrak daripada kaldu yang mengandungi ammonium dihidrogen fosfat (17.4 – 21.2%). Peratus perencatan terhadap fungus ujian

adalah paling rendah bagi ekstrak daripada kaldu yang mengandungi natrium nitrat (8.7 – 12.1%).

JADUAL 3. Peratus perencatan fungus *Fusarium solani* oleh ekstrak kasar *Streptomyces* SUK 02 dengan pengubahsuaian sumber nitrogen

Sumber nitrogen	Diameter (mm)	Peratus perencatan (mm)± sisihan piawai
Kawalan negatif	28.0	0.00 ± 0
Ammonium sulfat	21.0	25.0 ± 1.15
Kalium nitrat	24.5	12.5 ± 0.58
Ammonium dihidrogen fosfat	22.5	19.6 ± 1.15
Natrium nitrat	25.0	10.7 ± 0.58

Daripada hasil kajian, perencatan fungus ujian tidak dipengaruhi oleh peratusan penghasilan ekstrak kasar. Peratusan perencatan fungus ujian adalah paling tinggi bagi ekstrak yang mengandungi ammonium sulfat walaupun penghasilan ekstrak kasar yang agak rendah berbanding ekstrak kasar yang lain. Ekstrak kasar daripada sumber nitrogen natrium nitrat dan kalium nitrat tidak menunjukkan aktiviti perencatan yang baik bagi kedua-dua fungus ujian walaupun penghasilan ekstrak kasar optimum dicatatkan oleh kedua-dua ekstrak. Nilai MIC bagi ekstrak kasar ammonium sulfat terhadap fungus ujian *Aspergillus fumigatus* adalah 1.5 mg/ml manakala bagi natrium nitrat pula 2.0 mg/ml.

PERBINCANGAN

BERAT EKSTRAK KASAR

Hasil kajian menunjukkan berat ekstrak kasar paling tinggi diperolehi daripada pengestrakan kaldu yang mengandungi sumber natrium nitrat sebagai sumber nitrogen tunggal. Hasil kajian ini adalah sama dengan kajian yang telah dilakukan oleh Ripa et al. (2009), di mana di dalam kajian beliau, pertumbuhan dan penghasilan ekstrak kasar yang optimum dicapai apabila natrium nitrat digunakan sebagai sumber nitrogen tunggal di dalam media kaldu.

Justeru, daripada hasil kajian ini, *Streptomyces* SUK 02 mencapai pertumbuhan yang optimum dan seterusnya menghasilkan ekstrak kasar yang maksimum dengan kehadiran natrium nitrat berbanding sumber nitrogen yang lain. Menurut Dekleva et al. (1985), nitrat adalah sumber nitrogen yang digunakan secara meluas oleh kebanyakan spesies *Streptomyces* dengan beberapa pengecualian seperti *S. clavuligerus*. Di samping itu, natrium nitrat merupakan sumber nitrogen yang mempunyai pH beralkali. Oleh itu, penambahan sumber nitrogen ini, sedikit sebanyak meningkatkan pH di dalam media kaldu *Streptomyces* SUK 02. Terdapat kajian menunjukkan bahawa *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8 mencapai pertumbuhan maksimum pada pH 9 (Thumar et al. 2010). Pertumbuhan

bakteria aktinomiset adalah lebih baik dalam keadaan berkali terutamanya *Streptomyces* sp. (Vijay et al. 2009). Ini adalah berbeza dengan sumber nitrogen daripada ammonium yang bersifat asidik, yang mungkin tidak sesuai bagi pertumbuhan *Streptomyces* SUK 02.

Streptomyces daripada strain yang berbeza mempunyai metabolisme yang berbeza dalam utilisasi sumber nitrogen. Ini mungkin disebabkan oleh kehadiran enzim tertentu dalam metabolisme nitrogen di dalam sel tersebut. Contoh enzim tersebut adalah seperti *glutamate dehydrogenase* (GDH) dan *glutamine synthetase* (GS) yang penting dalam metabolisme nitrogen daripada sumber ammonium (Reitzer 1996; Schreier 1993). Walau bagaimanapun, enzim-enzim ini tidak wujud di dalam semua spesies *Streptomyces*. Tambahan lagi, metabolisme nitrogen yang utama di dalam *Streptomyces* masih belum lagi dicirikan sepenuhnya dan kawal aturnya masih belum lagi dikenalpasti (Shapiro et al. 1985).

UJIAN PENYARINGAN AKTIVITI ANTIFUNGUS

Ujian penyaringan antifungus dijalankan dengan kepekatan ekstrak ditetapkan pada kepekatan 4 mg/ml. Daripada hasil kajian, didapati bahawa kesan perencatan adalah berbeza bagi kesemua fungus ujian. Kesan perencatan maksimum terhadap pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* dan *Fusarium solani* adalah pada ekstrak daripada kaldu ISP 4 yang menggunakan sumber nitrogen daripada ammonium sulfat. Ion ammonium yang terdapat di dalam ammonium sulfat dan ammonium dihidrogen fosfat boleh memberikan kesan perencatan yang tinggi terhadap pertumbuhan fungus ujian (Marwick et al. 1999). Hal ini menyebabkan peratus perencatan yang optimum dicatatkan bagi ekstrak kasar dengan pengubahsuaian sumber nitrogen daripada ammonium. Sumber nitrogen ini berbeza dengan sumber nitrogen nitrat yang hanya membantu dalam pertumbuhan *Streptomyces* namun tidak membantu dalam aktiviti antimikrobnya (Thakur et al. 2009).

Daripada hasil kajian ini, peratus perencatan yang paling minimum sekali adalah ekstrak natrium nitrat berbanding ekstrak daripada sumber nitrogen yang lain seperti ammonium sulfat dan ammonium dihidrogen fosfat. Terdapat beberapa faktor yang boleh menyumbang kepada fenomena ini. Pertama, ini mungkin adalah disebabkan oleh metabolit yang hadir di dalam ekstrak ini lebih berkesan dalam merencat fungus atau mikroorganisma yang lain, ataupun metabolit yang terhasil adalah dalam kuantiti yang sedikit untuk merencat pertumbuhan fungus dan bakteria ujian (Zhou et al. 2010).

Manakala bagi ekstrak kasar daripada sumber nitrogen kaldu ammonium sulfat dan ammonium dihidrogen fosfat pula mengandungi agen antifungus yang boleh merencat pertumbuhan fungus ujian secara maksimum. Selain itu, faktor-faktor luaran seperti pH juga boleh mempengaruhi penghasilan metabolit ini. Kajian oleh Mustafa (2009) mendapati bahawa pertumbuhan dan penghasilan metabolit dipengaruhi oleh pH media.

Daripada ujian antimikrob ini, secara ringkasnya, didapati bahawa hasil daripada pengubahsuaian sumber nitrogen ekstrak kasar daripada *Streptomyces* SUK 02 mengandungi agen antifungus yang lebih tinggi berbanding agen antibakteria.

UJIAN KEPEKATAN PERENCATAN MINIMUM (MIC)

Ujian kepekatan perencatan minimum (MIC) dijalankan terhadap ekstrak daripada pengubahsuaian sumber nitrogen ammonium sulfat dan natrium nitrat. Nilai MIC bagi ekstrak yang lain tidak dapat dijalankan kerana jumlah ekstrak kasar yang terhad. Daripada ujian MIC, didapati bahawa nilai MIC bagi ekstrak ammonium sulfat adalah lebih rendah (1.5 mg/ml) daripada ekstrak natrium nitrat. Ini menunjukkan bahawa ekstrak daripada ammonium sulfat ini lebih berkesan dalam memberikan kesan perencatan terhadap fungus ujian.

KESIMPULAN

Sebagai kesimpulan, ammonium sulfat merupakan sumber nitrogen yang sesuai bagi penghasilan metabolit sekunder yang berupaya dalam merencat pertumbuhan fungus ujian *Aspergillus fumigatus* dan *Fusarium solani*. Sumber nitrogen natrium nitrat pula merupakan sumber nitrogen yang sesuai bagi pertumbuhan *Streptomyces* SUK 02.

PENGHARGAAN

Kajian di telah dijalankan menggunakan peruntukan gran UKM-GUP-TKP-08-22-074.

RUJUKAN

- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M. & Sikora, R.A. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology and Ecology* 51: 215-229.
- Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Appel, D.N. & Filer, T.H. 1994. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biological Control* 4: 381.
- Castillo, U., Strobel, G.A. & Mullenberg, K. 2006. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters* 255: 296-300.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard*. Edisi ketiga. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, Pennsylvania.
- Dekleva, M.L., Titus, A.J. & Strohl, W.R. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 287-294.

- Ezra, D., Castillo, U. & Strobel, G.A. 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillated *Streptomyces* sp. MSU-2110 endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* 150: 785-793.
- Firdaus, M.R. 2010. Pengoptimuman kaldu pertumbuhan *Streptomyces* SUK 02 untuk penghasilan ekstrak kasar dan aktiviti antimikrob yang maksimum. Tesis Sarjanamuda, Jabatan Sains Bioperubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Ghadin, N., N.M. Zin, V. Sabaratnam, N. Badya, D.F. Basri, H.H. Lian dan N.M. Sidik. 2008. Isolation and characterization of a novel endophytic streptomyces SUK 06 with antimicrobial activity from Malaysian plant. *Asian Journal of Plant Sciences* 7: 189-194.
- Himabindu, M. & Jetty, A. 2006. Optimization of nutritional requirements for gentamicin production by *Micromonospora echinospora*. *Indian Journal of Experimental Biology* 44: 842-848.
- Igarashia, Y., Trujillo, M.E., Marti'nez-Molinab, E. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 3702-3705.
- Marwick, J.D., Wright, P.C. & Burgess, J.B. 1999. Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Journal of Marine Biotechnology* 1: 495-500.
- Mustafa, O. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology* 8(13): 3007-3017.
- Reitzer, L.J. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, L-alanine and D-alanine. Dlm., *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular Biology*. Jil. 1. Ed. ke-2. edited by. Neidhardt, F.C., 391-407. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Rijavec, T., Lapanje, A., Dermastia, M. & Rupnik, M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 802-808.
- Ripa, F.A., Nikkon, F., Zaman, S. & Khondkar, P. 2009. Optimal conditions for antimicrobial metabolites production from a new *Streptomyces* sp. RUPA-08PR isolated from Bangladeshi soil. *Microbiology* 37(3): 211-214.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.
- Sanchez, S. & Demain, A.L. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 895-906.
- Schreier, H.J. 1993. Biosynthesis of glutamine and glutamate and the assimilation of ammonia. Dlm. *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*. edited by. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. & Losick, R., 135-211. American Society for Microbiology.
- Shapiro, S., Vining, L.C., Laycock, M., McIness, A.G. dan Walter, J.A. 1985. Pathway of ammonium assimilation in *Streptomyces venezuelae* examined by amino acid analyses and ¹⁵N nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 629-634.
- Singh, L.S., Mazumder, S. & Bora, T.C. 2009. Optimization of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal of Medical Mycology* 19(4): 225-233.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257-268.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151: 1691-1695.
- Tan, H.M., Cao, L.X., He, Z.F., Su, G.J. 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1275-1280.
- Thakur, D., Bora, T.C., Bordoloi, G.N. & Mazumdar, S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal de Mycologie Médicale* 19: 161-167.
- Thumar, J., Dhulia, K. & Sigh, S. 2010. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 2081-2087.
- Vijay, C.V., Surendra K.G., Anuj, K., Ashish, M., Ravindra, N.K. dan Alan, C.G. 2009. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss. : Isolation, diversity, and anti-microbial activity. *The journal Microbial Ecology* 57: 749-756.
- Yan, L.L., Han, N.N., Zhang, Y.Q., Yu, L.Y., Chen, J., Wei, Y.Z., Li, Q.P., Tao, L., Zheng, G.H., Yang, S.E., Jiang, C.X., Zhang, X.D., Huang, Q., Habdin, X., Hu, Q.B., Li, Z., Liu, S.W., Zhang, Z.Z., He, Q.Y., Si, S.Y. dan Sun, C.H. 2010. Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant. *Journal of Antibiotic* 63: 259-261.
- Zhou, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindstrom, K., Zhang, L., Zhang, X. dan Strobel, G.A. 2010. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. *Current Microbiology* 62(1): 182-190.
- Zin, N.M., Sarmin, N.I.M., Ghadin, N., Basri, D.F., Sidik, N.M., Hess, W.M. dan Strobel, G.A. 2007. Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. *FEMS Microbiol Lett.* 274: 83-88.

Noraziah Mohamad Zin
Marlini Othman
Jabatan Sains Bioperubatan
Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur

Corresponding author: Noraziah Mohamad Zin
Email address: nora@medic.ukm.my
Tel: 603 92897373; Fax: 603 26929032

Received: June 2011
Accepted for publication: January 2012