

Artikel Penelitian

Aktivitas Daya Hambat Isolat *Actinomycetes* dengan Lama Fermentasi yang Berbeda terhadap Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*

Annisa Nur Insani¹, Meiskha Bahar², Nunuk Nugrohowati³, Retno Yulianti⁴

Abstrak

Actinomycetes merupakan bakteri Gram positif berbentuk filamen yang tersebar luas di tanah dan mampu menghasilkan metabolit sekunder yang berguna sebagai antibiotik. Produksi metabolit sekunder *Actinomycetes* dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan setiap isolat, termasuk lama fermentasi. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri patogen oportunistik penyebab infeksi saluran pernapasan bawah. **Tujuan:** mengetahui aktivitas daya hambat isolat *Actinomycetes* dengan perbedaan lama fermentasi terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae*. **Metode:** Bakteri *Actinomycetes* diisolasi dari tanah di Kebun Raya Bogor dan ditumbuhkan pada media *Starch Casein Agar* (SCA) kemudian difermentasi pada media cair yang terdiri dari manitol 2%, pepton 2%, glukosa 1% dengan waktu inkubasi 6, 7, dan 8 hari. Aktivitas antibakteri terhadap *K. pneumoniae* diamati pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan metode difusi sumuran. **Hasil:** Aktivitas isolat *Actinomycetes* dengan lama fermentasi 6, 7, dan 8 hari mampu menghambat pertumbuhan *K. pneumoniae* dengan rata-rata zona hambat 4,46 mm; 4,94 mm; dan 5,04 mm secara berurutan. Mekanisme daya hambat *Actinomycetes* dimulai dari penghambatan sintesis dinding sel hingga sintesis asam nukleat dan protein bakteri. Uji *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada zona hambat yang dihasilkan oleh setiap kelompok fermentasi. **Kesimpulan:** Isolat *Actinomycetes* memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae* dengan aktivitas tertinggi dicapai oleh isolat *Actinomycetes* dengan lama fermentasi 8 hari.

Kata kunci: *Actinomycetes*, antibakteri, fermentasi, *Klebsiella pneumoniae*

Abstract

Actinomycetes are filamentous, Gram-positive bacteria widely distributed in soil and can produce secondary metabolites useful as antibiotics. The synthesis of secondary metabolites of *Actinomycetes* is influenced by the growth conditions of each isolate, including the fermentation period. *Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic bacterial pathogen causing lower respiratory tract infection. **Objectives:** To determine the inhibition activity of *Actinomycetes* with different fermentation periods against the growth of *K. pneumoniae*. **Methods:** *Actinomycetes* were isolated from soil in Kebun Raya Bogor and grown on *Starch Casein Agar* (SCA) medium before being fermented in liquid media consisting of 2% of mannitol, 2% of peptone, and 1% of glucose with an incubation time of 6, 7, and 8 days. An antibacterial activity test was conducted on *Mueller Hinton Agar* (MHA) medium using the well diffusion method. **Results:** The activity of *Actinomycetes* isolates with fermentation duration of 6, 7 and 8 were able to inhibit the growth of *K. pneumoniae* with an average inhibition zone of 4,46 mm; 4,94 mm; and 5,04 mm, respectively. *Actinomycetes'* inhibitory mechanism ranges from inhibition of cell wall synthesis to nucleic acid and protein synthesis. *One Way ANOVA* test showed significant differences between the inhibition zone produced by each fermentation group. **Conclusion:** *Actinomycetes* isolates have antibacterial activity against the growth of *K. pneumoniae* with the highest activity achieved by *Actinomycetes* with a fermentation time of 8 days.

Keywords: *Actinomycetes*, antibacterial, fermentation, *Klebsiella pneumoniae*

Affiliasi penulis: ¹Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta, Indonesia. ²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta, Indonesia. ³Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta, Indonesia. ⁴Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta, Indonesia.

Korespondensi: Annisa Nur Insani, Email: annisaninsani@upnvj.ac.id;

PENDAHULUAN

Infeksi saluran pernapasan bawah merupakan penyakit yang menduduki peringkat ke-4 sebagai penyebab kematian dan kecacatan bagi seluruh kelompok usia dan peringkat ke-2 bagi kelompok usia 0-9 tahun secara global.¹ Penyakit infeksi saluran pernapasan bawah meliputi pneumonia, bronkhitis, dan bronkiolitis dengan pneumonia sebagai bentuk yang paling sering terjadi.² Salah satu penyebab pneumonia yaitu bakteri *Klebsiella pneumoniae*.³

Klebsiella pneumoniae (*K.pneumoniae*) merupakan bakteri patogen oportunistik yang berperan dalam satu per tiga dari seluruh infeksi bakteri Gram negative.⁴ Saat ini, telah ditemukan peningkatan jumlah infeksi dan temuan kasus resistensi *K. pneumoniae*.⁵ Resistensi meliputi berbagai golongan antibiotik seperti β -laktam, aminoglikosid, dan florokuinolon.⁶ *Global Report on Surveillance* mencatat bahwa mayoritas negara melaporkan 30% resistensi terhadap sefalosporin generasi ke-3, dengan beberapa negara mencapai angka resistensi 60%.⁷

Actinomyces merupakan bakteri Gram positif berbentuk filamen yang tersebar luas di alam, terutama di tanah.⁸ *Actinomyces* telah terbukti menghasilkan metabolit sekunder yang berguna sebagai antibiotik.⁹ Sekitar dua pertiga antibiotik yang diketahui saat ini merupakan hasil produksi dari *Actinomyces*, dengan mayoritas dihasilkan oleh genus *Streptomyces*.¹⁰

Actinomyces yang diisolasi dari tanah di Kebun Raya Bogor telah terbukti menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli*.¹¹ Penelitian lain di tempat yang sama juga menemukan bahwa isolat *Actinomyces* dapat menghambat produksi biofilm

dari *E.coli*.¹² Sebuah penelitian menunjukkan bahwa 5 dari 13 isolat *Actinomyces* yang diambil dari berbagai lokasi di Nepal memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap *K. pneumoniae*.¹³

Produksi metabolit sekunder yang dihasilkan *Actinomyces* dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan setiap isolat. Salah satu metode untuk mengoptimalkan produksi metabolit sekunder yaitu metode fermentasi.¹⁴ Lama fermentasi merupakan parameter yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri. Menurut penelitian yang menggunakan isolat *Actinomyces* dari Gunung Merapi, ditemukan perbedaan aktivitas antibakteri *Actinomyces* dengan lama fermentasi 6, 7 dan 8 hari terhadap pertumbuhan *E. coli* multiresisten.¹⁵

Kebun Raya Bogor adalah pusat konservasi berbagai jenis tanaman yang memiliki iklim yang menunjang pertumbuhan berbagai mikroba tanah termasuk *Actinomyces*.¹⁶ Beberapa penelitian mengenai aktivitas antibakteri dari isolat *Actinomyces* yang diambil dari Kebun Raya Bogor telah dilakukan, namun belum ada penelitian terkait yang meneliti pengaruh lama fermentasi pada aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas daya hambat *Actinomyces* berdasarkan lama fermentasi yang berbeda terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae*.

METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental murni (*true experimental*) dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta. Sampel penelitian merupakan *Actinomyces* yang berhasil diisolasi tanah di Kebun Raya Bogor. Sampel penelitian dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu fermentasi 6, 7 dan 8 hari serta kontrol positif dan negatif. Setiap kelompok perlakuan melalui 5 kali pengulangan.

Penelitian dilakukan setelah mendapat Pembebasan Persetujuan Etik Nomor 1//2022/KEPK dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta.

Alat

Inkubator (*Memmert*), autoklaf (*All American*), tabung reaksi (*Pyrex*), tabung erlenmeyer (*Pyrex*), *object glass* (*Sail Brand*), *beaker glass* (*Pyrex*), mikroskop (*Olympus*), cawan petri (*Pyrex*), spuit (*Onemed*), *centrifuge* (*Hettich*), gelas ukur (*Pyrex*), jangka sorong digital (*Rohs*), timbangan analitik (*Ohaus*), *shaker* (*Stuart*), pipet, ose steril, pembakar bunsen, bak pewarnaan, pinset, spatula, botol kaca, korek api, pengaduk kaca, plat silinder 6 mm, drigalski.

Bahan

Isolat *Actinomycetes* dari Kebun Raya Bogor, sampel *K. pneumoniae* dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Starch Casein Agar* (SCA), media fermentasi, nystatin, antibiotik kolistin sebagai kontrol positif, akuades sebagai kontrol negatif, lugol, safranin, kristal karbol ungu, alkohol 96%, NaCl 0,9%.

Isolasi *Actinomycetes*

Sampel tanah diambil dari Kebun Raya Bogor kemudian diencerkan dengan mencampurkan 1 gr tanah dan 7 ml aquades ke dalam tabung untuk selanjutnya diletakkan pada *centrifuge*. Sebanyak 1 ml dari yang telah *dicentrifuge* selanjutnya diencerkan secara bertingkat yaitu 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} dan diinokulasikan menggunakan metode *streak plate* pada media SCA yang telah ditambahkan obat nystatin lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 hari.

Pembuatan Media

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 38 gr dilarutkan dalam 1 liter aquades dan dipanaskan sampai mendidih sembari diaduk kemudian ditutup dengan kapas. Media melalui proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan durasi sekitar 20 menit. Media fermentasi yang digunakan yaitu media cair dengan komposisi 14 gram manitol, 14 gram pepton, 7 gram glukosa. Semua bahan dicampurkan dengan aquades sebanyak 700 ml dan dituangkan ke tabung erlenmeyer, dipanaskan lalu diaduk hingga homogen.

Identifikasi *Actinomycetes*

Pada identifikasi makroskopik, pertumbuhan *Actinomycetes* diamati pada media SCA setelah diinkubasi selama 14 hari. Identifikasi mikroskopik dilakukan melalui pewarnaan Gram. Bentuk, susunan, warna, dan sifat dari *Actinomycetes* diamati menggunakan mikroskop.

Fermentasi *Actinomycetes*

Isolat *Actinomycetes* yang telah diinkubasi dikultur kembali dalam media cair yang telah dibuat untuk kemudian dilakukan fermentasi selama 6, 7, dan 8 hari. Satu ose biakan *Actinomycetes* diambil lalu diinokulasikan ke media cair dan diinkubasi selama waktu fermentasi yang telah ditentukan. *Actinomycetes* dalam media fermentasi diletakkan pada *shaker* selama 5 menit dengan kecepatan 150 rpm sebelum dimasukkan ke inkubator dan sebelum dituangkan pada sumuran.

Pembuatan suspensi bakteri

Satu ose biakan *K. pneumoniae* dari media dituangkan ke tabung yang berisi 10 ml NaCl 0,9% sampai kekeruhannya sesuai standar 0,5 McFarland atau setara dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml. Suspensi *K. pneumoniae* ditanam dengan mengambil 3 tetes pipet suspensi lalu dicampurkan dengan media MHA.

Uji Aktivitas Antibakteri

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan yaitu metode difusi sumuran. Media MHA ditanami *K. pneumoniae* kemudian dilubangi dengan plat silinder berdiameter 6 mm. Lubang sumuran diberi hasil fermentasi *Actinomycetes* menggunakan mikropipet. Selanjutnya, biakan melalui proses inkubasi pada suhu 37°C dengan durasi 24 jam. Zona bening yang terbentuk diamati dan diukur dengan jangka sorong digital.

Analisis Data

Analisis dilakukan menggunakan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA), diteruskan dengan uji *Post Hoc Tamhane's* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

HASIL

Identifikasi

Actinomyces yang berhasil diisolasi dari tanah dan ditumbuhkan pada media SCA diidentifikasi secara makroskopik dan mikroskopik. Secara makroskopik, isolat *Actinomyces* yang tumbuh pada media tampak menunjukkan koloni putih berbentuk seperti bedak dengan permukaan rata (gambar 1). Identifikasi mikroskopik dilakukan menggunakan pewarnaan Gram, dimana isolat menunjukkan batang halus membentuk filamen berwarna ungu (gambar 2).



Gambar 1. Identifikasi makroskopik *Actinomyces* pada media *Starch Casein Agar* (SCA)



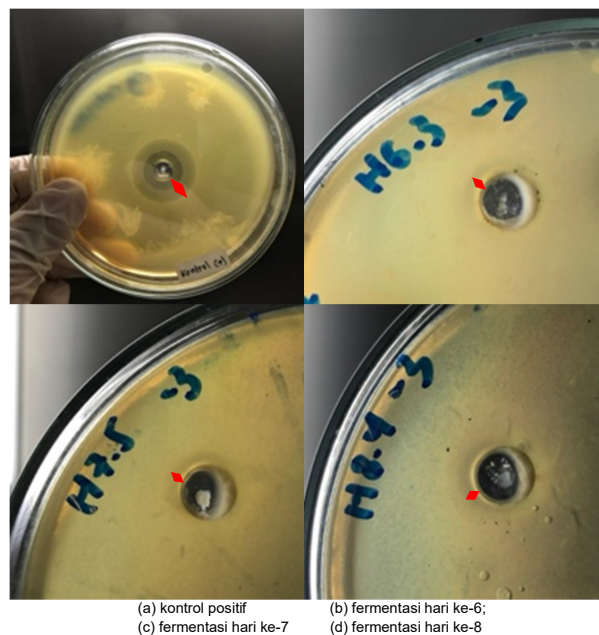
Gambar 2. Identifikasi mikroskopik *Actinomyces* pada pewarnaan Gram

Zona Hambat Bakteri

Tabel 1. Zona hambat isolat *Actinomyces* terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae* (milimeter)

Uji	Lama fermentasi			Kontrol	Kontrol
	6 hari	7 hari	8 hari	(+)	(-)
1	3,4	5,1	5,3	20,9	0
2	3,1	4,6	5,1	19,0	0
3	3,2	5,5	4,8	19,9	0
4	7,3	4,6	5,3	20,4	0
5	5,3	4,9	4,7	19,5	0
Total	22,3	24,7	25,2	99,7	0
Rerata	4,46	4,94	5,04	19,94	0

Berdasarkan hasil pengukuran diatas, isolat *Actinomyces* yang telah difermentasi dapat menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* dengan zona hambat terbesar dihasilkan oleh kontrol positif yaitu antibiotik kolistin yang memiliki rerata 19,94 mm. Pada percobaan menggunakan aquades sebagai kontrol negatif, tidak ditemukan zona hambat yang dihasilkan di daerah sekitar sumuran. *Actinomyces* yang telah melalui proses fermentasi selama 6, 7 dan 8 hari menunjukkan variasi ukuran zona hambat. Rerata zona hambat terbesar dihasilkan oleh *Actinomyces* dengan lama fermentasi 8 hari yaitu sebesar 5,04 mm. Kelompok lama fermentasi 6 dan 7 hari menghasilkan zona hambat sebesar 4,46 mm dan 4,94 mm berturut-turut.



Gambar 3. Zona hambat yang dihasilkan oleh *Actinomyces*

Analisis data

Berdasarkan analisis data yang dilakukan, nilai signifikansi ANOVA yang didapat yaitu 0,000 ($p < 0,05$), menandakan bahwa setidaknya terdapat dua kelompok perlakuan dengan rerata zona hambat yang berbeda bermakna. Pada uji *post-hoc Tamhane's* didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang menggambarkan adanya perbedaan bermakna antara kontrol positif dengan kelompok fermentasi 6, 7 dan 8 hari serta kontrol negatif. Kelompok kontrol negatif juga menghasilkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), menandakan adanya perbedaan bermakna dengan kelompok perlakuan 7 dan 8 hari. Hasil signifikansi $p > 0,05$ yang didapat antara kelompok perlakuan 6, 7 dan 8 hari menandakan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok.

PEMBAHASAN

Actinomyces telah dikenal akan kemampuannya dalam menghasilkan zat antibiotik yang tiada habisnya.¹⁷ *Actinomyces* dapat beradaptasi di berbagai lingkungan seperti tanah, udara, air tawar hingga air laut dengan jumlah paling banyak ditemukan di tanah. Populasi *Actinomyces* pada suatu lingkungan dipengaruhi oleh kondisi iklim habitat tersebut seperti suhu dan pH. *Actinomyces* diketahui tumbuh di suhu optimal 25-30°C dan pada pH netral sekitar 6 hingga 9.¹⁰ Pada penelitian ini, *Actinomyces* yang digunakan untuk uji antibakteri diambil dari tanah Kebun Raya Bogor dengan variasi karakteristik yang meliputi suhu sekitar 24-26°C dan pH 5,5-6. Kondisi ini mendukung pertumbuhan optimal dari bakteri *Actinomyces* pada tanah di Kebun Raya Bogor.

Hasil uji antibakteri isolat *Actinomyces* pada penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok lama fermentasi 6, 7, dan 8 hari mampu menghambat pertumbuhan *K. pneumoniae* dengan rerata zona hambat 4,46 mm, 4,94 mm, dan 5,04 mm secara berurutan. Data ini menandakan adanya variasi dalam ukuran zona hambat yang dihasilkan dan tampak adanya peningkatan nilai rerata zona hambat yang berbanding lurus dengan lamanya waktu fermentasi. Kekuatan daya hambat mikroorganisme dapat dikategorikan berdasarkan ukuran diameter dari zona sirkular yang tidak ditumbuhi oleh bakteri disekitar

sumuran. Daya hambat dapat dikatakan lemah apabila diameternya < 5 mm, sedang apabila diameternya 5-10 mm, kuat apabila diameternya 10-20 mm, dan sangat kuat apabila diameter > 20 mm.¹⁸ Zona hambat yang dihasilkan oleh kelompok perlakuan memiliki kekuatan daya hambat lemah dan sedang.

Aktivitas antibakteri *Actinomyces* terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae* telah dibuktikan pada beberapa penelitian terdahulu. Penelitian Apsari *et al.* (2019) mendapatkan bahwa dari 21 isolat *Actinomyces* yang diisolasi dari tanah di Nusa Tenggara Timur, terdapat 18 isolat yang berhasil menghambat pertumbuhan *K. pneumoniae*. Ekstrak dan supernatan dari tiga isolat *Actinomyces* dengan zona inhibisi terbaik juga menghambat *K. pneumoniae*.¹⁹ Penelitian oleh Budhathoki dan Shrestha (2020) mengisolasi 15 sampel tanah dari 12 lokasi berbeda di Nepal untuk menguji aktivitas antibakteri 7 bakteri uji dimana *K. pneumoniae* menjadi bakteri uji kedua paling rentan setelah *Staphylococcus aureus*, dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat pada 10 dari 22 isolat pada skrining primer dan sekunder.²⁰

Aktivitas antibakteri dari isolat *Actinomyces* diketahui disebabkan oleh kemampuannya dalam memproduksi metabolit sekunder dan dapat dicapai melalui beberapa mekanisme berbeda, mulai dari penghambatan sintesis dinding sel hingga sintesis protein serta asam nukleat bakteri.^{21,22} Metabolit sekunder sendiri adalah senyawa organik yang diproduksi oleh organisme namun tidak dikaitkan dengan siklus hidup maupun pertumbuhannya.²³ Mikroorganisme memproduksi metabolit primer dan sekunder pada fase pertumbuhan yang berbeda. Metabolit primer dihasilkan pada fase pertumbuhan logaritmik sedangkan metabolit sekunder dihasilkan pada fase stasioner dimana terdapat deplesi nutrisi yang dibutuhkan.²⁴

Proses biosintesis metabolit sekunder dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan dan optimalisasi kebutuhan nutrisi masing-masing organisme.²⁵ Beberapa parameter yang berperan meliputi temperatur, pH, waktu inkubasi, serta sumber nitrogen dan karbon.²⁶ Perubahan komposisi pada media pertumbuhan juga dapat berdampak pada kuantitas maupun kualitas dari profil metabolisme dan produk yang dihasilkan dari organisme tersebut.²⁷

Metode fermentasi adalah salah satu cara yang memungkinkan adanya modifikasi terhadap parameter tersebut untuk mengoptimalkan produksi metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai zat antibakteri.¹⁴

Penelitian ini mengamati lama proses fermentasi dan dampaknya terhadap efek antibakteri dari *Actinomycetes*. Peningkatan rerata diameter zona hambat yang berbanding lurus dengan waktu fermentasi 6,7 dan 8 hari pada penelitian ini sesuai dengan penelitian oleh Jadon dimana didapatkan isolat *Actinomycetes* menunjukkan produksi metabolit sekunder mulai hari ke-3 dan ke-4. Aktivitas antimikroba terhadap dermatofit diketahui mencapai maksimal setelah 6 hari dan tetap konstan hingga mencapai penurunan pada hari ke-9.²⁸ Hal ini juga menjelaskan bahwa semakin lamanya waktu fermentasi tidak selalu menghasilkan metabolit sekunder yang lebih banyak. Durasi inkubasi yang terlalu panjang memungkinkan metabolit mengalami perubahan menjadi senyawa lain oleh bakteri. Di sisi lain, sintesis metabolit sekunder juga mungkin belum terjadi apabila durasi inkubasinya terlalu pendek.²⁹

Media fermentasi pada penelitian ini yaitu media cair dengan komposisi manitol 2%, pepton 2%, serta glukosa 1%. Media fermentasi ini sebelumnya telah dikaji dalam penelitian oleh Kumar dimana diantara 11 media pertumbuhan yang digunakan dalam proses fermentasi, tiga diantaranya menunjukkan aktivitas antibakteri dengan salah satunya yaitu media MPG (manitol 2%, pepton 2%, glukosa 1%).³⁰ Metode fermentasi yang sama telah diteliti oleh Wulandari dimana *Actinomycetes* yang berasal dari pasir Gunung Merapi dilakukan fermentasi selama 6,7 dan 8 hari lalu diujikan terhadap *Escherichia coli* multiresisten dengan hasil aktivitas antibakteri tertinggi setiap harinya yaitu zona hambat iradikal sebesar 17,25 mm pada hari ke-6, zona hambat radikal sebesar 7 mm pada hari ke-7 dan 10 mm pada hari ke-8.¹⁵

SIMPULAN

Actinomycetes yang diisolasi dari tanah Kebun Raya Bogor memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*. Isolat *Actinomycetes* dengan lama fermentasi 8 hari paling

efektif dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* diantara kelompok lama fermentasi lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu sehingga penelitian ini dapat selesai sesuai harapan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, *et al*. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204-22.
2. Demissie BW, Amele EA, Yitayew YA, Yalew ZM. Acute lower respiratory tract infections and associated factors among under-five children visiting Wolaita Sodo University Teaching and Referral Hospital, Wolaita Sodo, Ethiopia. *BMC Pediatr*. 2021;21(1):413.
3. Bauman RW. *Microbiology with diseases by body system*. Fifth Edition. United State: Pearson; 2018.
4. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):252–75.
5. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(2):123–44.
6. Ferreira RL, Da Silva BCM, Rezende GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, *et al*. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Front Microbiol*. 2019;9:3198.
7. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. 2014 [diunduh 2022]. Tersedia dari: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>

8. El Karkouri A, Assou SA, El Hassouni M. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme moroccan biotope. *Pan Afr Med J*. 2019; 33:329.
9. De Simeis D, Serra S. Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds—an overview on antibiotics production. *Antibiotics (Basil)*. 2021;10(5):483.
10. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, *et al*. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015; 80(1):1-43.
11. Ariandi MZT, Bahar M, Yusmaini H, Zulfa F, Fauziah C, Pramesyanti A. Effectiveness of metabolite substance filtrates of Actinomycetes isolates from Kebun Raya Bogor against the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*: In vitro study. *J Biol Trop*. 2021;21(1):281
12. Bahar M, Yusmaini H, Fauziah C, Zulfa F. Potential of Actinomycetes to inhibit the biofilm formation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Indones J Biotechnol Biodivers*. 2020;4(1).
13. Sapkota A, Thapa A, Budhathoki A, Sainju M, Shrestha P, Aryal S. Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing Actinomycetes from soil samples. *Int J Microbiol*. 2020;2716584.
14. Rajnisz A, Guspiel A, Postek M, Ziemska J, Laskowska A, Rabczenko D, *et al*. Characterization and optimization of biosynthesis of bioactive secondary metabolites produced by streptomyces sp. 8812. *Polish J Microbiol*. 2016; 65(1):51–61.
15. Wulandari W, Rahayu T. Aktivitas antibakteri isolat Actinomycetes dari sampel pasir Gunung Merapi dengan lama fermentasi yang berbeda terhadap bakteri *Escherichia coli* multiresisten antibiotik. *Bioeksperimen J Penelit Biol*. 2015;1(2).
16. Bahar M, Zulfa F. Potention of antibacterial isolat Actinomycetes to proteolytic and amilolytic activity *Escherichia Coli* ATTC 25922. *J Teknol Lab*. 2018;7(1):25.
17. Mast Y, Stegmann E. Actinomycetes: The antibiotics producers. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):105.
18. Davis WW, Stout TR. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Appl Microbiol*. 1971;22(4):659-65.
19. Apsari PP, Budiarti S, Wahyudi AT. Actinomycetes of rhizosphere soil producing antibacterial compounds against urinary tract infection bacteria. *Biodiversitas*. 2019; 20 (5): 1259-65.
20. Budhathoki S, Shrestha A. Screening of Actinomycetes from soil for antibacterial activity. *Nepal J Biotechnol*. 2020;8(3).
21. Sulistyanto WN, Trimulyono G. Isolation and antibacterial activities of Actinomycetes from Rhizosphere plant cane (*Saccharum officinarum*) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Bioedukasi*. 2019;17(1):17–24.
22. Charousová I, Medo J, Hleba L, Císarová M, Javoreková S. Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Brazilian J Pharm Sci*. 2019;55.
23. Selim MSM, Abdelhamid SA, Mohamed SS. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021;19(1).
24. Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Ojha S, Tiwari BK. Exploitation of ultrasound technique for enhancement of microbial metabolites production. *Molecules*. 2020;25(22):5473.
25. Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish J Microbiol*. 2018;67(3):259–72.
26. Al-Ansari M, Kalaiyarasi M, Almalki MA, Vijayaraghavan P. Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from *Streptomyces* sp. AS11 isolated from the marine environment. *J King Saud Univ - Sci*. 2020;32(3).

27. Yun TY, Feng RJ, Zhou DB, Pan YY, Chen YF, Wang F, *et al.* Optimization of fermentation conditions through response surface methodology for enhanced antibacterial metabolite production by *Streptomyces* sp. 1-14 from cassava rhizosphere. *PLoS One*. 2018;13(11).
28. Jadon P, Dwivedi A, Singh C, Kumar A. Optimization of various physiochemical parameters to enhance production of secondary metabolite from soil actinomycetes against dermatophytes. *Environ Conserv J*. 2019; 20 (1&2).
29. Horak I, Engelbrecht G, van Rensburg PJJ, Claassens S. Microbial metabolomics: Essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *J Appl Microbiol*. 2019; 127 (2): 326–43.
30. Kumar KS, Anuradha S, Sarma GR, Venkateshwarlu Y, Kishan V. Screening, isolation, taxonomy and fermentation of an antibiotic producer *Streptomyces xinghaiensis* from soil capable of acting against linezolid resistant strains. *Indian J Exp Biol*. 2012;50(10): 718-28.