



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAN KLOOROFORM
ISOLAT *Actinomycetes* DARI HUTAN PINUS MANGUNAN TERHADAP
BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus***

Hanna Huriyatus Syifa^{1*}, Evy Yulianti¹

¹Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Yogyakarta

*Corresponding author: hannahuriyatus.2021@student.uny.ac.id

Abstrak. Resistensi bakteri terhadap antibiotik mendorong perlunya eksplorasi sumber senyawa antibakteri baru, salah satunya dari kelompok *Actinomycetes* yang diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder bioaktif. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan pendekatan kuantitatif bertujuan menguji aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan kloroform dari isolat *Actinomycetes* terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Actinomycetes* diisolasi dari sampel tanah rizosfer yang diambil dari kawasan Hutan Pinus Mangunan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga faktor perlakuan, yaitu jenis pelarut, jenis bakteri uji, serta konsentrasi ekstrak *Actinomycetes* (25%, 50%, 75%, dan 100%). Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan pengukuran diameter zona hambat (mm) yang terbentuk di sekitar sumuran. Isolat *Actinomycetes* diidentifikasi hingga tingkat genus berdasarkan karakteristik fenotipik menggunakan metode *Simple Profile Matching* (SPM), lalu dianalisis menggunakan *Multivariate Statistical Package* (MVSP) dengan algoritma *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) dan disajikan dalam bentuk dendrogram. Hasil penelitian menunjukkan dua isolat yang teridentifikasi ke dalam genus *Streptomyces*. Ekstrak metanol maupun kloroform pada berbagai tingkat konsentrasi belum menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji, sehingga pengaruh perbedaan polaritas pelarut, variasi konsentrasi ekstrak, serta perbedaan respons antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif belum dapat dievaluasi secara optimal.

Kata Kunci: *Actinomycetes*, Aktivitas Antibakteri, Ekstrak Kloroform, Ekstrak Metanol, *Streptomyces*

***ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF METHANOL AND CHLOROFORM
EXTRACT OF Actinomycetes ISOLATES FROM MANGUNAN PINE FOREST
AGAINST BACTERIA Escherichia coli AND Staphylococcus aureus***

Abstract. Bacterial resistance to antibiotics has intensified the need to explore novel sources of antibacterial compounds, including *Actinomycetes*, which are known to produce diverse bioactive secondary metabolites. This experimental study with a quantitative approach aimed to evaluate the antibacterial activity of methanol and chloroform extracts from *Actinomycetes* isolates against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Rhizosphere soil samples were collected from the Mangunan Pine Forest, Bantul Regency, Special Region of Yogyakarta, Indonesia. The experiment was arranged in a Completely Randomized Design (CRD) with three treatment factors: solvent type, test bacterial species, and extract concentration (25%, 50%, 75%, and 100%). Antibacterial activity was determined by measuring inhibition zone diameters (mm) using the well diffusion method. *Actinomycetes* isolates were identified to the genus level based on phenotypic characteristics using *Simple Profile Matching* (SPM) and analyzed with the *Multivariate Statistical Package* (MVSP) employing the *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). Two isolates were identified as members of the genus *Streptomyces*. Under the conditions applied, neither methanol nor chloroform extracts showed

antibacterial activity against the tested bacteria, limiting the evaluation of solvent polarity, extract concentration, and differences in bacterial responses.

Keywords: *Actinomycetes, Antibacterial Activity, Chloroform Extract, Methanol Extract, Streptomyces*

PENDAHULUAN

Resistensi antimikroba (*antimicrobial resistance/AMR*) merupakan salah satu ancaman terbesar bagi kesehatan masyarakat global, dengan jutaan kematian berkaitan langsung dengan infeksi bakteri resistan terhadap antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat mempercepat munculnya strain bakteri resistan, sehingga menurunkan efektivitas terapi dan meningkatkan risiko penyebaran patogen (Aslam *et al.*, 2018; Naghavi *et al.*, 2024). Keterbatasan keberhasilan pengembangan antibiotik sintetis baru mendorong perlunya eksplorasi sumber alternatif, khususnya produk alami (*natural products/NPs*) mikroba yang dikenal memiliki keragaman struktur kimia dan aktivitas antibakteri yang tinggi (Hutchings *et al.*, 2019).

Actinomycetes merupakan kelompok bakteri Gram-positif yang berperan penting sebagai penghasil berbagai antibiotik utama, seperti tetrasiklin, streptomisin, neomisin, kloramfenikol, makrolida, eritromisin, rifampisin, vankomisin, gentamisin, kanamisin, dan daptomisin (Nazari *et al.*, 2022). Mikroorganisme ini banyak ditemukan di tanah, termasuk tanah rizosfer, dan dikenal mampu menghasilkan beragam metabolit sekunder bioaktif (Girão *et al.*, 2019). Hutan pinus merupakan lingkungan yang berpotensi tinggi untuk keberadaan Actinomycetes karena kondisi tanahnya relatif kering akibat tingginya laju evapotranspirasi (Qalbi *et al.*, 2018; Sukmawaty *et al.*, 2020). Salah satu kawasan yang belum banyak dieksplorasi adalah Hutan Pinus Mangunan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri Actinomycetes bervariasi terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, serta dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan metode ekstraksi. Perbedaan jenis pelarut dengan tingkat polaritas berbeda diketahui dapat memengaruhi jenis dan jumlah metabolit sekunder yang terekstraksi. Kajian komparatif terkait pengaruh polaritas pelarut terhadap aktivitas antibakteri isolat Actinomycetes masih terbatas dan menunjukkan hasil beragam (Arasu *et al.*, 2014; Balkar *et al.*, 2014). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan eksplorasi potensi Actinomycetes yang diisolasi dari tanah rizosfer pohon pinus di Hutan Pinus Mangunan sebagai sumber senyawa antibakteri, serta mengevaluasi pengaruh perbedaan polaritas pelarut (metanol dan kloroform) dalam menentukan aktivitas antibakteri ekstrak kasar Actinomycetes terhadap *Escherichia coli* dan

Staphylococcus aureus

METODE

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan pendekatan kuantitatif menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas tiga faktor perlakuan. Kombinasi ketiga faktor tersebut menghasilkan 16 kombinasi perlakuan dan setiap kombinasi diulang sebanyak tiga kali, sehingga diperoleh total 48 unit percobaan.

Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel tanah rizosfer pohon pinus dilaksanakan di kawasan Hutan Pinus Mangunan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan Agustus 2025. Penelitian ini selanjutnya dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan (FK-KMK), Universitas Gadjah Mada (UGM), pada bulan Agustus-November 2025.

Objek Penelitian

Penelitian menggunakan tiga faktor perlakuan, yaitu jenis pelarut (metanol dan kloroform), jenis bakteri uji (*E. coli* dan *S. aureus*), serta konsentrasi ekstrak Actinomycetes (25%, 50%, 75%, dan 100%). Respons antibakteri ditentukan berdasarkan pengukuran diameter zona hambat (dalam satuan milimeter) yang terbentuk di sekitar sumuran, sebagai indikator efektivitas antibakteri dari masing-masing ekstrak pada berbagai tingkat konsentrasi.

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan peralatan lapangan berupa sekop, termometer tanah, *soil tester*, dan saringan berukuran 40 mesh. Peralatan laboratorium yang digunakan meliputi autoklaf, oven, inkubator, lemari pendingin, *waterbath*, *Biological Safety Cabinet* (BSC) kelas II, sentrifus, *vortex mixer*, *hot plate stirrer*, *rotary evaporator*, pH meter, serta peralatan gelas standar laboratorium. Peralatan pendukung meliputi mikropipet, timbangan analitik, mikroskop cahaya, jarum inokulasi, Drygalski spatula, pembakar bunsen, dan perlengkapan kultur bakteri lainnya.

Bahan penelitian meliputi sampel tanah rizosfer pohon pinus; media mikrobiologi berupa *Starch Casein Agar* (HiMedia), *International Streptomyces Project No. 2* (HiMedia), *Tryptone Soya Agar/Broth* (Oxoid), *MacConkey Agar* (Oxoid), *Mueller-Hinton Agar* (Oxoid),

Urea Agar Base (HiMedia), *Skim Milk Agar* (HiMedia); serta berbagai bahan kimia dan reagen dengan tingkat kemurnian *bacteriological grade*. Pelarut yang digunakan adalah metanol (CH₃OH) dan kloroform (CHCl₃). Mikroorganisme uji yang digunakan, yaitu *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923. Bahan pendukung lain meliputi akuades, larutan NaCl fisiologis 0,85%, alkohol 70%, serta antibiotik dan antijamur (kloramfenikol dan amfoterisin B).

Peremajaan Isolat Bakteri Uji

Peremajaan isolat bakteri *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923 dilakukan dari kultur stok bakteri yang disimpan dalam gliserol pada suhu -80°C. Isolat bakteri *E. coli* ATCC 25922 kemudian diinokulasikan pada media *MacConkey Agar* (MCA), sedangkan isolat bakteri *S. aureus* ATCC 25923 diinokulasikan pada media agar darah (*blood agar*). Kultur yang telah diinokulasikan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni hasil peremajaan digunakan sebagai sumber inokulum untuk tahapan penelitian selanjutnya. Kultur tersebut dipelihara dengan cara disubkultur secara berkala pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) miring setiap dua minggu sekali.

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan menginokulasikan koloni yang tumbuh pada media TSA miring ke dalam 10 mL larutan NaCl fisiologis 0,85%. Suspensi ini kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* hingga diperoleh suspensi yang seragam. Suspensi bakteri dibuat hingga mencapai kekeruhan setara dengan standar 0,5 McFarland ($\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/mL) untuk memastikan konsistensi dalam tahap uji sensitivitas antibiotik (Zaki *et al.*, 2025).

Pengambilan dan Persiapan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah rizosfer dilakukan mengacu pada metode Gong *et al.* (2025) dengan beberapa modifikasi. Sampel diambil dari lima titik di kawasan Hutan Pinus Mangunan pada kedalaman 10-15 cm di sekitar perakaran pohon pinus. Tanah sebanyak 10 gram dari setiap titik dikumpulkan dalam plastik klip steril, kemudian dilakukan pengukuran suhu, kelembapan, dan pH. Sampel dipindahkan ke Laboratorium Mikrobiologi FK-KMK UGM dan disimpan pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ hingga diproses. Sebelum analisis, sampel tanah dihomogenkan, dihaluskan, dan diayak menggunakan saringan berukuran 40 mesh.

Isolasi dan Identifikasi Isolat Actinomycetes

Metode isolasi Actinomycetes pada penelitian ini mengacu pada prosedur yang dikembangkan oleh Salem *et al.* (2023) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 1 gram sampel tanah rizosfer disuspensikan dalam 9 mL larutan NaCl fisiologis 0,85% (NaCl 8,5 g/L) dan dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Sebanyak 100 μ l dari masing-masing pengenceran diinokulasikan pada media *Starch Casein Agar* (SCA) yang mengandung kloramfenikol (25 μ g/mL) dan amfoterisin B (10 μ g/mL), kemudian diinkubasi pada suhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 7 hari. Koloni yang diduga Actinomycetes dipurifikasi pada media *International Streptomyces Project No. 2* (ISP-2). Selanjutnya, identifikasi isolat dilakukan berdasarkan karakter morfologi koloni dan uji biokimia, meliputi uji katalase, urease, asimilasi karbon (glukosa, sukrosa, laktosa, dan manitol), serta kemampuan hidrolisis pati, kasein, dan gelatin.

Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes

Aktivitas antibakteri isolat Actinomycetes diuji menggunakan metode *cross-streak*. Isolat Actinomycetes digoreskan secara vertikal di tengah permukaan media ISP-2, kemudian cawan agar tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$ hingga koloni Actinomycetes tumbuh dan senyawa antibakteri yang mungkin diproduksi oleh isolat tersebut dapat berdifusi ke dalam media ISP-2. Setelah masa inkubasi awal, bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923 digoreskan secara tegak lurus terhadap goresan pertama, kemudian cawan agar tersebut diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi akhir, zona hambat yang terbentuk di area pertemuan goresan diamati dan diukur menggunakan jangka sorong (dalam satuan milimeter).

Produksi dan Ekstraksi Kasar Metabolit Actinomycetes

Produksi dan ekstraksi metabolit kasar dari Actinomycetes mengacu pada metode Haque *et al.* (2016) dan Ambarwati *et al.* (2020) dengan beberapa modifikasi. Isolat ditumbuhkan secara bertahap melalui inokulum awal dan lanjutan pada media *Starch Casein Broth* (SCB), kemudian digunakan sebagai inokulum produksi. Kultur produksi diinkubasi pada suhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 7-10 hari. Setelah inkubasi, kultur disentrifugasi untuk memisahkan biomassa dan supernatan. Supernatan diekstraksi menggunakan metanol dan kloroform dengan perbandingan 1:1 (v/v) melalui metode partisi cair-cair. Fraksi pelarut organik dikumpulkan

dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kasar.

Pengujian Antibakteri Ekstrak Kasar Actinomycetes

Ekstrak kasar metabolit dari Actinomycetes diencerkan bertingkat menggunakan DMSO 1% hingga diperoleh konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode difusi sumur agar pada media *Mueller-Hinton Agar* (MHA). Suspensi *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923 diinokulasikan secara merata pada permukaan media, kemudian dibuat sumuran yang berdiameter 6 mm. Setiap sumuran diisi 50 μ l ekstrak pada masing-masing konsentrasi. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan pelarut metanol dan kloroform digunakan sebagai kontrol negatif. Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona hambat yang diukur dalam satuan milimeter setelah dikurangi diameter sumuran.

Teknik Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif. Identifikasi isolat dilakukan berdasarkan kemiripan karakter fenotipik dengan Actinomycetes acuan menggunakan metode *Simple Profile Matching* (SPM) mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Goodfellow *et al.*, 2012). Karakter yang diamati meliputi morfologi koloni, hifa dan spora, pewarnaan Gram, serta karakter biokimia. Data dianalisis menggunakan *Microsoft Excel* dan *Multivariate Statistical Package* (MVSP) versi 3.2. dengan metode pengelompokan UPGMA, lalu hasilnya disajikan dalam bentuk dendrogram (Sibarani *et al.*, 2023).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Isolasi dan Identifikasi Isolat Actinomycetes

Isolasi Actinomycetes dari tanah rizosfer Hutan Pinus Mangunan yang diambil dari lima titik sampling pada kedalaman 10-15 cm menghasilkan dua koloni terduga Actinomycetes, masing-masing berasal dari titik sampling 2 dan 3. Sedangkan titik sampling lainnya tidak menunjukkan pertumbuhan koloni. Kondisi lingkungan tanah pada titik sampling 2 dan 3 memiliki pH mendekati netral (6,7-6,8), suhu 26,3-27°C, serta kelembapan sangat rendah, yang berada dalam kisaran optimal untuk pertumbuhan Actinomycetes, khususnya

genus *Streptomyces* (Sukmawaty *et al.*, 2020; Barka *et al.*, 2016). Temuan ini sejalan dengan laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa Actinomycetes umumnya dominan pada tanah kering hingga semi-kering dengan suhu mesofil-dan pH netral (Fitri *et al.*, 2021; Nazari *et al.*, 2022).

Tabel 1. Nilai Rerata Pengukuran Faktor Lingkungan Abiotik di Hutan Pinus Mangunan

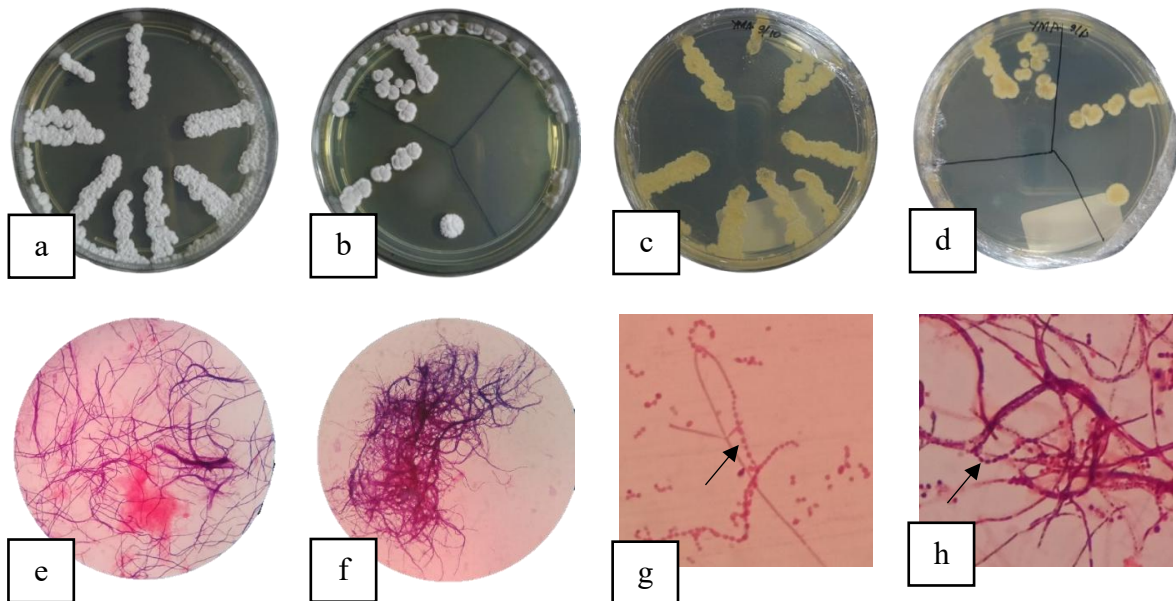
Titik Sampling	Nilai Rerata Pengukuran Faktor Lingkungan Abiotik		
	Kelembapan Tanah	pH Tanah	Suhu Tanah (°C)
Titik 1	2,8	6,4	26,3
Titik 2	1,3	6,8	26,3
Titik 3	1,5	6,7	27
Titik 4	1,5	6,2	27,3
Titik 5	1	6,4	25,8

Koloni terduga Actinomycetes menunjukkan ciri morfologi khas, yaitu membentuk koloni kering berwarna putih hingga keabu-abuan dengan miselium substrat kekuningan yang melekat kuat pada media, tidak menghasilkan pigmen larut, serta menghasilkan aroma khas tanah yang berkaitan dengan produksi geosmin. Geosmin merupakan metabolit seskuiterpenoid utama yang dihasilkan oleh *Streptomyces* selama fase sporulasi dan berperan dalam interaksi ekologis, termasuk membantu penyebaran spora melalui organisme tanah (Nivetha *et al.*, 2021; Becher *et al.*, 2020; Undabarrena *et al.*, 2021).

Secara makroskopis, kedua isolat memiliki bentuk koloni tidak beraturan dengan tepi bergelombang hingga berlekuk, elevasi menonjol, serta tekstur berkapur hingga berbubuk. Perbedaan tampak pada ketebalan miselium udara, di mana ACT3 menunjukkan miselium udara yang lebih tebal dan mudah terangkat dibandingkan ACT2. Hal tersebut mengindikasikan variasi tingkat diferensiasi dan kematangan miselium udara antar isolat. Karakterisasi mikroskopis melalui pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat ACT2 dan ACT3 bersifat Gram-positif, memiliki hifa berfilamen bercabang, serta membentuk rantai spora lurus hingga sedikit melengkung (*rectiflexibiles*) dengan spora berbentuk oval. Ciri-ciri ini merupakan karakter khas Actinomycetes, khususnya genus *Streptomyces*, yang dikenal memiliki dinding sel peptidoglikan tebal, hifa bercabang, serta variasi tipe rantai spora (Zahr *et al.*, 2022; Meenakshi *et al.*, 2024).

Selanjutnya, karakterisasi biokimia menunjukkan bahwa isolat ACT2 dan ACT3 bersifat positif terhadap uji katalase dan urease, mampu mengasimilasi glukosa, serta menunjukkan aktivitas hidrolisis pati dan kasein. Sebaliknya, kedua isolat hanya menunjukkan reaksi positif lemah pada uji asimilasi sukrosa, laktosa, dan manitol, serta pada uji hidrolisis gelatin.

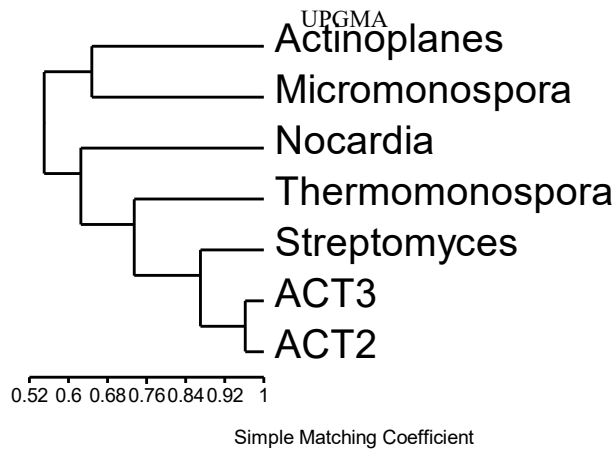
Gambar 1. Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Actinomycetes



Keterangan: a) Miselium udara ACT2; b) Miselium udara ACT3; c) Miselium substrat ACT2; d) Miselium substrat ACT3; e) Morfologi hifa ACT2; f) Morfologi hifa ACT3; g) Morfologi spora ACT2; h) Morfologi spora ACT3

Identifikasi fenotipik isolat ACT2 dan ACT3 dilakukan dengan membandingkan karakter morfologi, pewarnaan Gram, serta karakter biokimia terhadap beberapa genus Actinomycetes acuan, yaitu *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, dan *Thermomonospora*, menggunakan metode *Simple Profile Matching* (SPM) mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Goodfellow et al., 2012). Analisis kekerabatan dilakukan melalui *cluster analysis* menggunakan *Simple Matching Coefficient* (SMC) dan

algoritma *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) pada perangkat lunak MVSP versi 3.2.



Gambar 2. Hasil Dendrogram dengan *Multivariate Statistical Package* (MVSP) 3.2

Analisis hubungan kekerabatan isolat menggunakan metode UPGMA dengan *Simple Matching Coefficient* menghasilkan dendrogram yang menggambarkan tingkat kemiripan antar isolat Actinomycetes dengan beberapa genus pembanding. Nilai koefisien kemiripan pada dendrogram berada pada rentang 0,52–1,00, nilai yang semakin mendekati angka 1 menunjukkan tingkat kemiripan yang semakin tinggi. Berdasarkan dendrogram pada Gambar 2, isolat ACT2 dan ACT3 merupakan pasangan dengan tingkat kemiripan tertinggi, yaitu sebesar 0,963. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut memiliki kesamaan karakter fenotipik sebesar 96,3% dan berpotensi berasal dari spesies atau kelompok taksonomi yang sangat berdekatan.

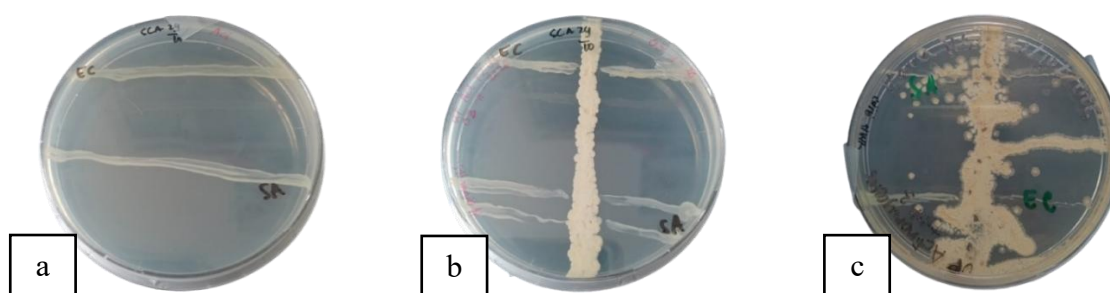
Klaster ACT2–ACT3 bergabung dengan *Streptomyces* pada nilai kemiripan sebesar 0,87 (87%), mengindikasikan bahwa kedua isolat memiliki hubungan fenotipik lebih dekat dengan genus *Streptomyces* dibandingkan dengan genus Actinomycetes lainnya. Klaster ini bergabung dengan *Thermomonospora* pada nilai kemiripan sebesar 0,735 (73,5%), kemudian bergabung dengan *Nocardia* pada nilai sebesar 0,625 (62,5%). Pada tahap akhir, seluruh klaster bergabung dengan klaster *Micromonospora–Actinoplanes* yang sebelumnya terbentuk pada nilai kemiripan sebesar 0,648 (64,8%). Pola pengelompokan ini sejalan dengan pendekatan taksonomi numerik menurut Williams *et al.* (1983), yang menetapkan bahwa kelompok fenotipik (*phenon*) terbentuk pada tingkat kemiripan sekitar $\geq 70\%$ berdasarkan koefisien kemiripan (*similarity coefficient*). Dengan demikian, nilai kemiripan $\geq 70\%$ pada dendrogram

ini menunjukkan bahwa isolat-isolat yang tergabung berada dalam satu kelompok fenotipik yang sama.

Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes

Uji pendahuluan aktivitas antibakteri isolat ACT2 dan ACT3 terhadap *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923 dilakukan menggunakan metode *cross-streak*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kedua isolat tidak membentuk zona hambat pada area pertemuan dengan bakteri uji.

Gambar 3. Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes



Keterangan: a) Kontrol negatif; b) Hasil uji pendahuluan ACT2; c) Hasil uji pendahuluan ACT3 terhadap bakteri *Escherichia coli* (EC) dan *Staphylococcus aureus* (SA)

Zona hambat yang tidak terbentuk merupakan indikasi rendahnya ekspresi metabolit sekunder pada kondisi uji yang digunakan atau karena senyawa antibakteri yang dihasilkan tidak dapat berdifusi secara optimal ke dalam media padat (T. J. Hossain, 2024). Oleh karena itu, isolat tetap dilanjutkan ke tahap skrining sekunder melalui pengujian ekstrak menggunakan metode difusi sumur agar, yang dilaporkan lebih sensitif dan kuantitatif dalam mendeteksi aktivitas antibakteri Actinomycetes (Salim *et al.*, 2017; Nike *et al.*, 2020; Sapkota *et al.*, 2020; Meenakshi *et al.*, 2024).

Produksi Metabolit Sekunder Isolat Actinomycetes

Produksi metabolit sekunder isolat Actinomycetes dilakukan melalui tahapan inokulum awal, inokulum lanjutan, dan kultur produksi untuk memperoleh biomassa miselial yang aktif sebelum proses ekstraksi. Kultur produksi isolat ACT2 dan ACT3 ditumbuhkan pada media SCB dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 7–10 hari, kondisi yang diketahui mendukung aktivasi jalur biosintesis metabolit sekunder pada Actinomycetes (Das *et al.*, 2023; Tangerina *et al.*, 2020).

Pertumbuhan kedua isolat menunjukkan pola berbeda. Kultur ACT2 menghasilkan

biomassa relatif rendah dengan miselium terdispersi dan pelet kecil serta perubahan warna media menjadi putih kekuningan. Sebaliknya, kultur ACT3 membentuk biomassa yang lebih melimpah dengan filamen terdispersi dan pelet yang jelas, disertai perubahan warna media menjadi kuning. Perbedaan morfologi kultur ini berkaitan dengan proses diferensiasi miselial dan ketersediaan oksigen serta nutrisi di dalam pelet, yang diketahui berperan penting dalam aktivasi *biosynthetic gene clusters* (BGCs) dan peningkatan produksi metabolit sekunder (Manteca & Yagüe, 2018; Ścigaczewska *et al.*, 2024).

Kedua kultur menghasilkan aroma khas tanah, tetapi intensitas aroma pada ACT3 lebih kuat. Karakteristik ini berkaitan dengan produksi senyawa volatil seperti geosmin, yang merupakan bagian metabolit sekunder *Streptomyces*. Produksi geosmin diketahui meningkat ketika sel mengalami kondisi fisiologis yang memicu aktivasi metabolit sekunder, seperti keterbatasan nutrisi atau stres lingkungan pada fase akhir pertumbuhan (Shudirman *et al.*, 2021). Kondisi tersebut sering terjadi ketika miselial mulai mengalami diferensiasi atau membentuk agregat di dalam kultur cair. Aroma khas tanah yang lebih kuat pada ACT3 mengindikasikan bahwa kultur ini kemungkinan mengalami diferensiasi miselial lebih matang dan aktivitas biosintesis metabolit sekundernya lebih tinggi dibandingkan ACT2.

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Kloroform Isolat Actinomycetes

Pengujian lanjutan terhadap aktivitas antibakteri menggunakan ekstrak metanol dan kloroform isolat Actinomycetes karena metode ekstraksi dinilai lebih sensitif dalam mendeteksi potensi antibakteri. Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi sumur agar (*agar well diffusion*) terhadap bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan kloroform dari isolat ACT2 dan ACT3 pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% tidak menghasilkan zona hambat terhadap kedua jenis bakteri uji tersebut.

Zona bening tidak terbentuk di sekitar sumuran pada seluruh konsentrasi tersebut mengindikasikan bahwa kedua ekstrak tidak menunjukkan aktivitas antibakteri pada kondisi pengujian yang digunakan. Sebaliknya, kontrol positif berupa kloramfenikol menghasilkan zona hambat jelas, yang menegaskan bahwa metode pengujian berjalan dengan baik. Kontrol negatif pelarut metanol dan kloroform juga tidak menunjukkan adanya zona hambat, sehingga dapat dipastikan bahwa pelarut tidak memberikan efek antibakteri terhadap bakteri uji.

Gambar 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Kloroform Isolat Actinomycetes



Keterangan: a) Hasil negatif pada ekstrak metanol Actinomycetes; b) Hasil negatif pada ekstrak kloroform Actinomycetes; c) Kontrol negatif; d) Kontrol positif

Aktivitas antibakteri yang tidak terjadi pada ekstrak metanol dan kloroform isolat ACT2 dan ACT3 dimungkinkan karena berkaitan dengan ketidaksesuaian pelarut ekstraksi terhadap sifat kimia metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut, sehingga proses ekstraksi senyawa antibakteri belum berlangsung secara optimal. Hal ini sejalan dengan pernyataan oleh Kaczorová *et al.* (2021), yang menyebutkan bahwa kemampuan pelarut dalam mengekstraksi metabolit sekunder sangat tergantung pada sifat kimia senyawa target, terutama polaritasnya. Oleh karena itu, tidak semua isolat Actinomycetes akan mengekstraksi metabolit bioaktif secara efektif menggunakan pelarut sama, serta pemilihan pelarut yang tepat sangat berpengaruh terhadap hasil ekstraksi dan aktivitas biologis yang terdeteksi.

Hasil penelitian ini didukung oleh temuan Nivetha *et al.* (2021), yang melaporkan bahwa hampir seluruh ekstrak pelarut, yaitu etil asetat, kloroform, dan metanol, kecuali ekstrak heksana dari isolat *Streptomyces californicus* MG-4, mampu menghambat seluruh bakteri uji. Sebaliknya, pada isolat *Streptomyces parvus* MG-3, hanya ekstrak etil asetat yang menunjukkan kemampuan menghambat seluruh bakteri uji. Ekstrak kloroform menunjukkan aktivitas terbatas hanya pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan ekstrak pelarut lainnya tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Bakteri uji dalam penelitian tersebut meliputi *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, dan *Proteus vulgaris*. Temuan ini mengindikasikan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh isolat ACT2 dan ACT3 kemungkinan lebih optimal terekstraksi menggunakan pelarut semi-polar seperti etil asetat, yang mampu melarutkan senyawa polar maupun nonpolar, memiliki toksisitas rendah, serta mudah diuapkan.

Efektivitas pelarut etil asetat dalam mengekstraksi metabolit sekunder yang bersifat antibakteri dari Actinomycetes juga dilaporkan Nisha *et al.* (2025), bahwa proses evaporasi ekstrak *Streptomyces* sp. CMSTAAHL-4 menggunakan pelarut etil asetat menghasilkan residu semipadat berwarna kuning tua, yang mengindikasikan keberadaan senyawa bioaktif dalam

jumlah relatif tinggi. Ekstrak tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *S. aureus*, dengan diameter zona hambat sebesar 25 mm. Sebaliknya, pada penelitian ini ekstrak metanol dan kloroform yang diperoleh memiliki konsistensi sangat cair dan tidak menunjukkan karakteristik kental atau pekat, serta tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Hal ini mengindikasikan kemungkinan rendahnya konsentrasi senyawa bioaktif atau ketidaksesuaian polaritas pelarut terhadap sifat kimia senyawa yang dihasilkan oleh isolat ACT2 dan ACT3.

Selain jenis pelarut, aktivitas antibakteri ekstrak Actinomycetes juga dipengaruhi oleh lokasi akumulasi metabolit sekunder, baik ekstraseluler maupun intraseluler (Rakhmawatie *et al.*, 2024). Penelitian Ambarwati *et al.* (2020), menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat supernatan (ekstraseluler) isolat *Streptomyces* sp. CRB46 memiliki potensi penghambatan lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat dari pelet sel (intraseluler), terutama terhadap bakteri Gram-positif. Hal ini menunjukkan bahwa pada isolat tertentu, metabolit antibakteri lebih banyak disekresikan ke supernatan.

Penelitian lain melaporkan bahwa tidak semua senyawa antibakteri yang dihasilkan langsung disekresikan ke supernatan, sehingga sebagian metabolit sekunder masih terakumulasi di dalam sel atau berasosiasi dengan struktur sel. Senyawa bioaktif yang berada di dalam sel juga dilaporkan cenderung lebih stabil dibandingkan senyawa yang telah dilepaskan ke media dan berpotensi mengalami degradasi. Oleh karena itu, pada isolat tertentu, proses ekstraksi intraseluler memungkinkan diperolehnya konsentrasi senyawa antibakteri yang lebih tinggi dan berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan yang lebih kuat terhadap bakteri uji (Daquioag & Penuliar, 2021; Rakhmawatie *et al.*, 2024). Berdasarkan hal tersebut, tidak adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol dan kloroform isolat ACT2 dan ACT3 dalam penelitian ini diduga berkaitan dengan lokasi akumulasi metabolit sekunder yang belum optimal terekstraksi melalui pendekatan ekstraseluler, serta kemungkinan bahwa senyawa antibakteri utama masih berada di dalam sel.

Beberapa penelitian juga melaporkan bahwa ekstrak Actinomycetes tidak selalu menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap semua bakteri uji, tergantung pada jenis metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing isolat (Ambarwati *et al.*, 2020; Nivetha *et al.*, 2021). Perbedaan struktur dinding sel, permeabilitas membran, serta mekanisme resistensi alami pada masing-masing bakteri uji turut memengaruhi sensitivitas terhadap senyawa antibakteri. Metabolit antibakteri yang dihasilkan oleh suatu isolat umumnya memiliki target dan spektrum kerja tertentu, sehingga efektivitasnya sangat bergantung pada kesesuaian antara senyawa bioaktif dan bakteri target (Baran *et al.*, 2023; Uddin *et al.*, 2021). Konsentrasi senyawa aktif

dalam ekstrak metanol dan kloroform yang diperoleh pada penelitian ini juga diduga belum mencapai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), sehingga aktivitas antibakteri tidak terdeteksi pada kondisi pengujian yang digunakan.

Ekstrak metanol yang diperoleh pada penelitian ini berwarna coklat dengan konsistensi sangat cair dan tidak membentuk pasta. Kondisi ini mengindikasikan bahwa senyawa yang terekstraksi bersifat cukup polar dan tidak banyak mengandung senyawa bermolekul besar yang umumnya menyebabkan ekstrak bertekstur kental (Agusman *et al.*, 2022; Wahyuningsih *et al.*, 2024). Warna coklat pada ekstrak metanol diduga berkaitan dengan keberadaan senyawa polar atau semi-polar yang memiliki gugus aromatik dan rentan terhadap oksidasi, seperti pigmen dan senyawa fenolik yang umum dihasilkan oleh Actinomycetes, sehingga berkontribusi terhadap intensitas warna ekstrak. Pada tingkat tertentu, perubahan warna tersebut juga dapat mengindikasikan terjadinya degradasi parsial senyawa aktif (Efrilia *et al.*, 2025).

Sementara itu, ekstrak kloroform yang diperoleh menunjukkan konsistensi sangat cair, tetap bening seperti warna kloroform sebelum dievaporasi, dan disertai dengan keberadaan fase menyerupai minyak. Kehadiran fase minyak setelah evaporasi kloroform dapat dikaitkan dengan sifat kimia senyawa yang terekstraksi. Selama proses evaporasi, komponen yang memiliki volatilitas tinggi akan menguap bersama pelarut, sedangkan komponen dengan volatilitas rendah, seperti lipid, terpenoid, atau metabolit sekunder hidrofobik lainnya, tidak mudah menguap dan akan tetap tertinggal sebagai residu berminyak atau fase non-volatil setelah pelarut menguap (Osik *et al.*, 2024; Q.-W. Zhang *et al.*, 2018).

SIMPULAN

Tanah rizosfer Hutan Pinus Mangunan menunjukkan kondisi lingkungan yang mendukung keberadaan Actinomycetes, meskipun jumlah isolat yang diperoleh dalam penelitian ini masih terbatas dan teridentifikasi sebagai genus *Streptomyces*. Perbedaan polaritas pelarut (metanol dan kloroform) serta variasi konsentrasi ekstrak belum menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923, sehingga perbedaan respons antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif belum dapat diamati. Hasil ini memberikan dasar bagi pengembangan penelitian lanjutan melalui optimalisasi metode isolasi dan ekstraksi guna meningkatkan potensi perolehan senyawa antibakteri dari Actinomycetes.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusman, I., Diharmi, A., & Sari, N. I. (2022). Identifikasi Senyawa Bioaktif pada Fraksi Ekstrak Rumpun Laut Merah (*Eucheuma cottonii*). *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 9(2), 60–64. <https://doi.org/10.29103/aa.v9i2.8121>.
- Ambarwati, A., Wahyuono, S., Moeljopawiro, S., & Yuwono, T. (2020). Antimicrobial Activity of Ethyl Acetate Extracts of *Streptomyces* sp. CRB46 and The Prediction of Their Bioactive Compounds Chemical Structure. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7), 3380–3390. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210763>.
- Arasu, M. V., Rejiniemon, T. S., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyani, V., Agastian, P., Huxley, V. A. J., Song, C. E., & Choi, K. C. (2014). In Vitro Antimicrobial Potential of Organic Solvent Extracts of Novel Actinomycetes Isolated from Forest Soil. *African Journal of Biotechnology*, 13(18), 1891–1897. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13555>.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- Balkar, N., Korcan, S. E., Malkoç, S., Güven, K., & Erdoğan, F. (2014). Screening for Antimicrobial Activities of Actinomycetes sp. Isolated from Afyonkarahisar, Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(2), 44–49. www.nobel.gen.tr.
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.
- Becher, P. G., Verschut, V., Bibb, M. J., Bush, M. J., Molnár, B. P., Barane, E., Al-Bassam, M. M., Chandra, G., Song, L., Challis, G. L., Buttner, M. J., & Flärdh, K. (2020). Developmentally Regulated Volatiles Geosmin and 2-Methylisoborneol Attract a Soil Arthropod to *Streptomyces* Bacteria Promoting Spore Dispersal. *Nature Microbiology*, 5(6), 821–829. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0697-x>.
- Daquioag, J. E. L., & Penuliar, G. M. (2021). Isolation of Actinomycetes with Cellulolytic and Antimicrobial Activities from Soils Collected from an Urban Green Space in the Philippines. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/6699430>.
- Das, V., Chatterjee, N. S., Pushpakaran, P. U., Lalitha, K. V., & Joseph, T. C. (2023). Exploration of Natural Product Repository by Combined Genomics and Metabolomics Profiling of Mangrove-Derived *Streptomyces murinus* THV12 Strain. *Fermentation*, 9(6), 576. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060576>.
- Efrilia, M., Christian, Y. E., Chandra, P. P. B., & Hermawati, E. (2025). Eksplorasi Kandungan Fenolik Total Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) sebagai Kandidat Produk Herbal. *Jurnal Ilmiah Manuntung: Sains Farmasi Dan Kesehatan*, 11(1), 65–72. <https://doi.org/10.51352/jim.v11i1.903>.
- Fitri, L., Bessania, M. A., Septi, N., & Suhartono, S. (2021). Isolation and Characterization of Soil Actinobacteria as Cellulolytic Enzyme Producer from Aceh Besar, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(11), 5169–5180. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221155>.
- Girão, M., Ribeiro, I., Ribeiro, T., Azevedo, I. C., Pereira, F., Urbatzka, R., Leão, P. N., &

- Carvalho, M. F. (2019). Actinobacteria Isolated From *Laminaria ochroleuca*: A Source of New Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 10, 683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00683>.
- Gong, X., Yu, Y., Lv, G., Hao, Y., Wang, L., Ma, J., Jiang, Y., Zou, J., Li, J., & Wang, Q. (2025). Construction and Effect Analysis of a Mixed Actinomycete Flora for Straw Returning to Albic Soil in Northeast China. *Microorganisms*, 13(2), 385. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020385>.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (2012). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria* (2nd ed., Vol. 5). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>.
- Haque, Md., Rahman, Md., Haque, Md., Sarker, A., & Islam, Md. (2016). Antimicrobial and Anticancer Activities of Ethyl Acetate Extract of Co-culture of *Streptomyces* sp. ANAM-5 and AIAH-10 Isolated from Mangrove Forest of Sundarbans, Bangladesh. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(2), 51–55. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60207>.
- Hossain, T. J. (2024). Methods for Screening and Evaluation of Antimicrobial Activity: A Review of Protocols, Advantages, and Limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, Present and Future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- Kaczorová, D., Karalija, E., Dahija, S., Bešta-Gajević, R., Parić, A., & Čavar Zeljković, S. (2021). Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two *Achillea* Species. *Molecules*, 26(6), 1601. <https://doi.org/10.3390/molecules26061601>.
- Manteca, Á., & Yagüe, P. (2018). *Streptomyces* Differentiation in Liquid Cultures as a Trigger of Secondary Metabolism. *Antibiotics*, 7(2), 41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020041>.
- Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M. H., & Shivaveerakumar, S. (2024). Actinomycetes: Isolation, Cultivation and its Active Biomolecules. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(1), 118–143. <https://doi.org/10.22207/JPAM.18.1.48>.
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance 1990-2021: A Systematic Analysis with Forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1).
- Nazari, M. T., Machado, B. S., Marchezi, G., Crestani, L., Ferrari, V., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2022). Use of Soil Actinomycetes for Pharmaceutical, Food, Agricultural, and Environmental Purposes. *3 Biotech*, 12(9), 232. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03307-y>.
- Nike, A. R., Folake, D., Deborah, G. I., & Alhassan, S. (2020). Potentials of Actinomycetes from Reserved Environments as Antibacterial Agents Against Drug-Resistant Clinical Bacterial Strains. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 30(2), 251–258. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v30i2.13>.
- Nisha, S. J., Uma, G., Sathishkumar, R., Prakash, V. S. G., Isaac, R., & Citarasu, T. (2025). Optimization and Characterization of Bioactive Secondary Metabolites from *Streptomyces* sp. CMSTAAHL-4 Isolated from Mangrove Sediment. *BMC Microbiology*, 25(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03763-5>.

- Nivetha, C., Deepika, T., Arjunan, A., Sivalingam, P., Revathi, N., & Muthuselvam, M. (2021). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Streptomyces* sp. Isolated from Muthupettai Mangrove Soil. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(50B), 210–234. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i50B33445>.
- Osik, N. A., Lukzen, N. N., Yanshole, V. V., & Tsentlovich, Y. P. (2024). Loss of Volatile Metabolites during Concentration of Metabolomic Extracts. *ACS Omega*, 9(22), 24015–24024. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02439>.
- Qalbi, A. H., Tarigan, S. D., Wahjunie, E. D., & Baskoro, D. P. T. (2018). Karakteristik Hidrologi Tanah di Bawah Tegakan Pinus (*Pinus merkusii*), Merawan (*Hopea odorata* Roxb), dan Mahoni Uganda (*Khaya anthoteca*). *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*, 20(1), 7–12. <https://doi.org/10.29244/jitl.20.1.7-12>.
- Rakhmawatie, M. D., Mustofa, M., Lisdiyanti, P., Wibawa, T., Ratnaningrum, K., Umam, M. M. C., Alfi, M. H., & Chariri, L. (2024). Antimicrobial Compounds from Intracellular and Extracellular Secondary Metabolites of Actinobacteria InaCC A759. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 29(4), 221–230. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.82376>.
- Salem, G. S., Baiu, S. H., & Ali, A. A. (2023). Isolation, Examination and Characterization of Actinomycetes as a Source of Antimicrobial Agents from Libyan Soil. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 14(06), 322–336. <https://doi.org/10.4236/abb.2023.146020>.
- Salim, F. M., Sharmili, S. A., Anbumalarnath, J., & Umamaheswari, K. (2017). Isolation, Molecular Characterization and Identification of Antibiotic Producing Actinomycetes from Soil Samples. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(9), 69–75. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70909>.
- Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., & Aryal, S. (2020). Isolation, Characterization, and Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/2716584>.
- Ścigaczewska, A., Boruta, T., Grzesiak, W., & Bizukojć, M. (2024). Analysis of Secondary Metabolites and Morphology in *Streptomyces rimosus* Microparticle-Enhanced Cultivation (MPEC) at Various Initial Organic Nitrogen Concentrations. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02514-x>.
- Shudirman, S., Abang Kassim, A., Shamsol Anuar, N. S., Utsumi, M., Shimizu, K., Muhammad Yuzir, M. A., Megat Mohd Noor, M. J., MD Akhir, F. N., Othman, N., Zakaria, Z., Sugiura, N., & Hara, H. (2021). Limitation of Nutrients Stimulates Musty Odor Production by *Streptomyces* sp. Isolated from a Tropical Environment. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 67(3), 92–99. <https://doi.org/10.2323/jgam.2020.08.001>.
- Sibarani, A. E. E. B., Rahmawati, R., & Saputra, F. (2023). Identification of Lactic Acid Bacteria from Pandan Civet Feces (*P. hermaphroditus*) in West Kalimantan Based on Phenotypic Similarity. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(4), 37–49. <https://doi.org/10.29303/jbt.v23i4.5314>.
- Sukmawaty, E., Sari, S. R., & Masri, M. (2020). Characterization of Soil Actinomycetes from Malino Pine Forest Rhizosphere of South Sulawesi. *Elkawanie*, 6(2), 315. <https://doi.org/10.22373/ekw.v6i2.5383>.
- Tangerina, M. M. P., Furtado, L. C., Leite, V. M. B., Bauermeister, A., Velasco-Alzate, K., Jimenez, P. C., Garrido, L. M., Padilla, G., Lopes, N. P., Costa-Lotufu, L. V., & Pena Ferreira, M. J. (2020). Metabolomic Study of Marine *Streptomyces* sp.: Secondary Metabolites and The Production of Potential Anticancer Compounds. *PLOS ONE*, 15(12), e0244385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244385>.
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin,

- Dhama, K., Ripon, Md. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, Md. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic Resistance in Microbes: History, Mechanisms, Therapeutic Strategies and Future Prospects. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.
- Undabarrena, A., Pereira, C. F., Kruasuwan, W., Parra, J., Sélem-Mojica, N., Vind, K., & Schniete, J. K. (2021). Integrating Perspectives in Actinomycete Research: An ActinoBase Review of 2020-21. *Microbiology (Reading, England)*, *167*(9), 1–17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001084>.
- Wahyuningsih, S., Yunita, I., Sundari, U. Y., Nurmalsari, E., Suryandani, H., Pagalla, D. B., Kalalinggi, S. Y., Alpian, A., Ramlah, R., & Nasrullah, M. (2024). *Ekstraksi Bahan Alam* (U. Y. Sundari, Ed.; 2024th ed.). CV. Gita Lentera Redaksi. <https://www.researchgate.net/publication/381613640>.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., & Sackin, M. J. (1983). Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Microbiology*, *129*(6), 1743–1813. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-6-1743>.
- Zahr, R., Zahr, S., El Hajj, R., & Khalil, M. (2022). Actinomycetes, Promising Therapeutic Agents: Characteristics and Active Metabolites. *Journal of Biology and Today's World*, *11*(6), 1–8.
- Zaki, S. H., Selim, D. A., Abo Aasy, N. K., & Helmi, S. (2025). Evaluation of The Antibacterial Potential in Shoot and Root Extracts of *Eryngium campestre* with Emphasis on *Egyptian ecotype*. *Scientific Reports*, *15*(1), 25789. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-05193-9>.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medicine*, *13*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.