

PERBANDINGAN FERMENTASI ANTIBIOTIK OLEH *STREPTOMYCES SP. S-34* DAN DUA REKOMBINASINYA PADA BEBERAPA MEDIUM

Oleh :

*Edy Djauhari Purwakusumah **^{*)}

ABSTRAK

Sampai saat ini penelitian mengenai antibiotik masih tetap menarik karena selain pemakaiannya yang cukup luas dalam dunia pengobatan juga karena adanya kemungkinan suatu mikroorganisme menjadi resisten/kebal terhadap suatu jenis antibiotik.

Berbagai usaha terus dilakukan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas antibiotik meliputi optimasi komposisi kandungan medium, kondisi fermentasi, dan pencarian mikroorganisme penghasil yang baru. Salah satu cara untuk mendapatkan mikroorganisme baru adalah fusi protoplas yang diperkenalkan oleh Hopwood pada tahun 1977.

Perbandingan proses fermentasi antibiotik *Streptomyces sp. S-34* dengan dua rekombinannya hasil fusi dengan *Pseudomonas fluorescens* yang disebut *HFSP-1* dan *HFSP-2* yang dilakukan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa proses biosintesis antibiotik oleh ketiga mikroorganisme tersebut secara umum adalah sama. Kandungan medium berupa nitrogen dan berbagai kadar glukosa berpengaruh untuk mempercepat pembentukan dan jumlah antibiotik yang dihasilkan.

PENDAHULUAN

Di negara yang beriklim tropis seperti Indonesia, penyakit yang disebabkan oleh infeksi mikroorganisme merupakan kasus yang banyak sekali terjadi. Oleh sebab itu penggunaan obat semacam antibiotik menduduki persentase yang tinggi dalam pemakaian obat-obatan. Selain digunakan untuk pengobatan, antibiotik juga digunakan untuk peternakan, pertanian dan hal-hal lain terutama yang berhubungan dengan Ilmu Biologi. Melihat kenyataan ini dan mengingat adanya kemungkinan mikroorganisme lama-kelamaan akan resisten/kebal terhadap antibiotik tertentu, maka penelitian untuk peningkatan dan pengembangan antibiotik sampai saat ini masih tetap menarik.

^{*)} staf Pengajar Jurusan Kimia IPB

Dari sekitar 3.000 jenis antibiotik yang dikenal, kurang lebih 70% dihasilkan oleh actinomycetes, terutama oleh genus *Streptomyces*, 20% dihasilkan oleh jamur dan 10% dihasilkan oleh bakteri (1). Selain dipengaruhi oleh faktor genetik dari mikroorganisme, produksi antibiotik juga dipengaruhi oleh kondisi fermentasi seperti : pH awal medium, temperatur fermentasi, aerasi, pemilihan biakan, dan yang terpenting adalah komposisi nutrisi dalam medium untuk pertumbuhan sel dan untuk produksi antibiotik.

Berbagai usaha untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas antibiotik terus dilakukan, mulai dari optimasi komposisi nutrisi dalam medium dan kondisi fermentasi mikroorganisme penghasil antibiotik tertentu sampai pada mencari mikroorganisme baru penghasil antibiotik.

Pencarian mikroorganisme baru penghasil antibiotik meliputi isolasi mikroorganisme baik dari udara maupun tanah dan manipulasi/mutasi genetik mikroorganisme penghasil antibiotik yang sudah ada. Cara mutasi faktor genetik meliputi mutasi oleh zat-zat mutagen tertentu dan mutasi oleh radiasi sinar tertentu seperti sinar ultra violet (UV), sinar-X, partikel- α , sinar- β , neutron berkecepatan tinggi dan lain-lain (Hash, 1975). Termasuk kedalam cara mutasi ini adalah fusi protoplas yang baru dikembangkan pada tahun 1977 oleh Hopwood (Hopwood, 1977).

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan proses dan hasil fermentasi oleh *Streptomyces sp. S-34* sebagai mikroorganisme parental dengan fermentasi oleh dua jenis mikroorganisme rekombinannya, *HFSP-1* dan *HFSP-2*, pada berbagai jenis dan komposisi medium fermentasi.

Dengan penelitian ini diharapkan potensi dan tingkat kemampuan produksi antibiotik masing-masing mikroorganisme asal dan hasil fusi protoplas dapat dibandingkan, sehingga keuntungan dan kelebihan metoda fusi protoplas dapat ditunjukkan. Selain itu penelitian ini diharapkan dapat menunjang pengembangan pengetahuan mengenai produksi antibiotik dari mikroorganisme dan dapat menambah perbendaharaan antibiotik yang bermanfaat.

TINJAUAN PUSTAKA

Penelitian yang dilakukan oleh Herry Rechnaidy (1987) telah menghasilkan dua jenis mikroorganisme penghasil antibiotik baru yang disebut dengan *HFSP-1* dan *HFSP-2*. Kedua mikroorganisme ini dihasilkan dengan cara fusi protoplas menggunakan penginduksi PEG (Poli Etilena Glikol).

Sebagai rekombinan dari *Streptomyces sp. S-34* dan *Pseudomonas fluorescens*, *HFSP-1* dan *HFSP-2*, mempunyai bentuk morfologis dan sifat fisiologis yang boleh dikatakan sebagai gabungan dari bentuk dan sifat mikroorganisme parentalnya. Sifat fisiologis kedua jenis mikroorganisme hasil fusi ini lebih mirip dengan *Streptomyces* terutama untuk uji gelatin, uji amilum, dan uji lipid (Rechnaidi, 1987).

Dibandingkan dengan induknya yang sama-sama menghasilkan antibiotik, yakni *Streptomyces sp. S-34*, *HFSP-1* dan *HFSP-2* ini mempunyai keunggulan dalam

kecepatan tumbuhnya. Hal ini merupakan suatu sifat yang diturunkan dari *Pseudomonas fluorescens*.

Antibiotik yang saat ini penggunaannya sudah meluas tidak saja dalam dunia pengobatan, tetapi juga untuk peternakan dan pengawetan makanan, merupakan hasil metabolisme sekunder pada beberapa makhluk hidup tertentu. Sebagai metabolit sekunder, pada dasarnya produksi antibiotik diatur oleh kontrol regulasi keseluruhan yang berperan pada laju pertumbuhan dan efek regulasi khusus pada setiap jalur metabolisme. Hal ini berarti bahwa produksi antibiotik ditentukan oleh faktor genetik dan faktor lain dari mikroorganisme.

Selain aktivitas (faktor genetik) mikroorganisme yang digunakan, kecepatan proses fermentasi sangat bergantung pada jenis dan konsentrasi substrat/medium serta kondisi fermentasi. Komposisi medium merupakan hal yang sangat penting karena akan mempengaruhi hasil metabolisme mikroorganisme. Media merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan, sumber energi, pembentukan zat tertentu, dan pembentukan sel. Senyawa yang harus ada dalam medium adalah sumber karbon dan sumber nitrogen. Selain karbon dan nitrogen medium ini juga harus mengandung garam anorganik, air, vitamin, dan oksigen terlarut. Kondisi fermentasi meliputi aerasi dan agitasi, temperatur, dan pH. Aerasi dan agitasi sangat berguna untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut dan mencegah terjadinya akumulasi asam laktat pada medium fermentasi. Temperatur optimal bervariasi dan bergantung pada strain mikroorganisme yang digunakan. Walaupun produksi suatu antibiotik mempunyai suatu kisaran pH optimum, sebenarnya tidak ada pengaruh langsung terhadap mekanisme reaksi biosintesis antibiotik. pH berpengaruh pada titik isolistrik protein pembentuk sel dan pada keaktifan enzim-enzim mikroba yang terlibat.

BAHAN DAN METODE

Tempat Penelitian : Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung.

Bahan-bahan :

Medium cair kentang glukosa, terdiri dari 200 gram kentang segar, 20 gram glukosa, dan 1000 ml air.

Medium Mc Daniel, terdiri dari 25 gram glukosa, ekstrak susu, 40 gram tepung kacang kedelai, ekstrak ragi 5 gram, 2,5 gram NaCl dan 1000 ml air.

Medium Sintetik Lumb, dengan komposisi sebagai berikut :

Glukosa, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na-sitrat, glisin, NaCl, CaCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , FeSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , Mo (Na-molibdat).

Medium Nutrien Broth, terdiri dari 1 gram Beef ekstrak, 2 gram ekstrak ragi, 5 gram pepton, 5 gram NaCl dan 1000 ml air.

Medium tauge agar, terdiri dari 100 gram tauge, 60 gram dekstrosa, 17 gram agar, dan 1000 ml air.

Metode :

Ketiga jenis mikroorganisme, yaitu *Streptomyces sp. S-34*, *HFSP-1* dan *HFSP-2*, mula-mula dibiakkan pada agar miring PDA dengan menggunakan alat Ose secara aseptis. Biakan ini digunakan sebagai sediaan.

Inokulasi dilakukan pada berbagai medium yang dipakai untuk fermentasi dengan cara memasukkan \pm 5 ml medium cair yang steril ke dalam sediaan biakan tersebut, kemudian dikocok hingga diperoleh suspensi yang homogen. Suspensi ini dimasukkan ke dalam 50 ml medium dalam labu erlenmeyer 250 ml. Kocok di atas alat pengocok selama satu atau dua malam.

Fermentasi dilakukan dengan cara yang sama, hanya dilakukan dalam labu 500 ml dengan 200 ml medium dan biakan diambil dari medium inokulasi. Pengocokan dilakukan terus menerus selama 10 X 24 jam dengan kecepatan 90 rpm.

Pengamatan kurva tumbuh dan jumlah sel dinyatakan dengan kerapatan optik yang diukur dengan Spectronic-20 pada panjang gelombang 610 nm. Pengukuran dilakukan setiap 4 jam sekali pada 32 jam pertama dan kemudian 24 jam sekali sampai hari ke-10.

Potensi antibiotik dan pH medium diamati setiap 24 jam sekali selama 10 hari. Potensi antibiotik ditentukan dengan metoda difusi agar menggunakan kertas cakram dan diujikan pada *Bacillus cereus*.

Sama halnya dengan penentuan potensi antibiotik dan pH medium, penentuan kadar gula pereduksi ini juga dilakukan setiap 24 jam selama 10 hari pada sentrat medium. Dalam penelitian ini, kadar gula pereduksi ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson.

HASIL DAN BAHASAN

Pengaruh Unsur Pokok dalam Medium

Dalam penelitian ini dilakukan fermentasi antibiotik pada 4 jenis medium dengan kandungan unsur pokok yang berbeda. Keempat jenis medium tersebut adalah : (1) kentang glukosa, suatu medium kompleks yang penuh dengan karbohidrat; (2) medium Mc Daniels yang merupakan medium kompleks yang sangat baik untuk fermentasi streptomisin oleh *Streptomyces griseus*. Medium ini padat dengan kandungan protein nabati; (3) medium Lumb yaitu suatu medium sintetis untuk fermentasi streptomisin; dan (4) Nutrient Broth, suatu medium kompleks dengan kandungan protein hewani yang besar, tetapi tanpa kandungan gula. Medium ini baik untuk pertumbuhan *Pseudeomonas Fluorescens*, induk yang lain dari hasil fusi protoplas.

Dari data pengamatan terhadap potensi antibiotik selama proses fermentasi 10 hari, seperti tercantum pada Tabel 1, ternyata antibiotik hanya terbentuk pada medium yang mengandung gula saja dan potensi yang terbesar diperoleh dari fermentasi pada medium dengan kandungan karbohidrat yang tinggi, yakni kentang glukosa. Hal ini wajar terjadi, karena hampir seluruh antibiotik yang dihasilkan oleh genus *streptomyces* bahkan oleh kelas *Actinomycetes* disintesis dari senyawa gula.

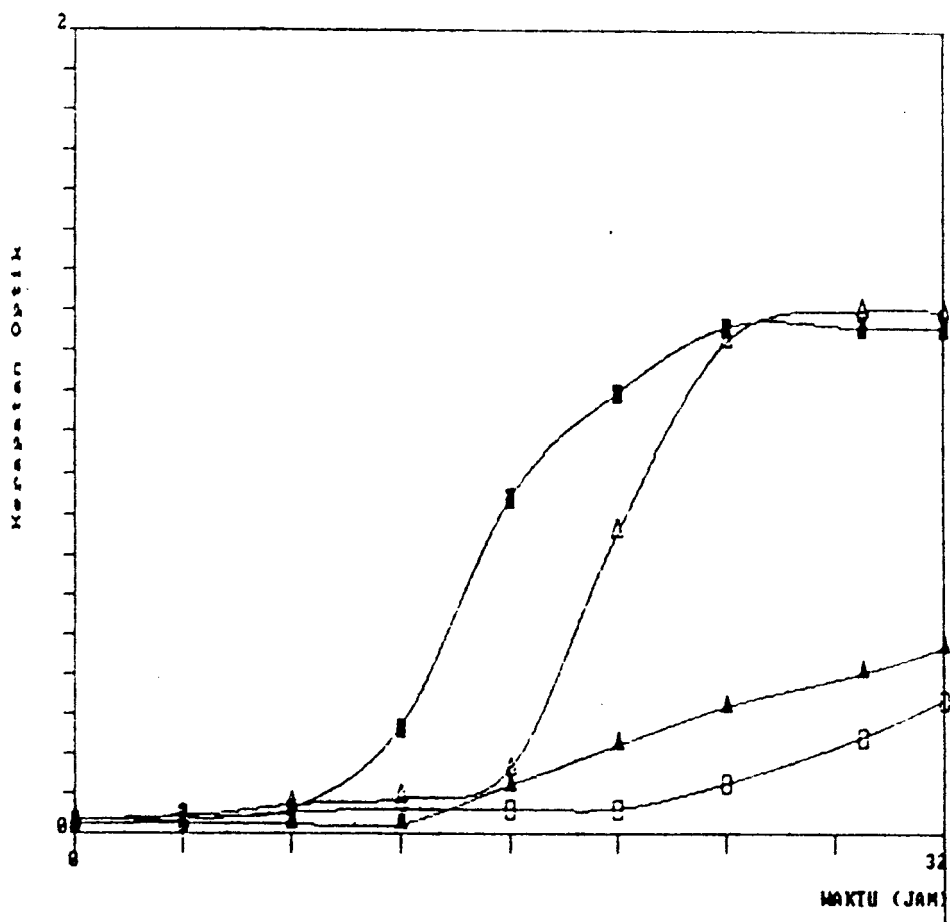
Terlihat pula bahwa kandungan nitrogen akan mempengaruhi terbentuknya antibiotik. Dari sini dapat diketahui bahwa mikroorganisme hasil fusi tidak dapat memproduksi antibiotik pada medium yang banyak mengandung nitrogen. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh pengaruh pada saat regenerasi protoplas, sehingga menjadi sel yang utuh kembali untuk HFSP-1 dan HFSP-2 ini digunakan medium PDA. Oleh karena itu kemungkinan faktor-faktor genetik yang tidak sesuai dengan kondisi pada saat regenerasi tidak dapat terus tumbuh dan berkembang.

Tabel 1. Potensi Antibiotik Hasil Fermentasi pada Berbagai Jenis Medium

	Kentang Glukosa	Mc Daniels	Lumb	Nutrient Broth
S-34	+	r(3)	-	-
HFSP-1	+	-	r(4,5)	-
HFSP-2	+	-	r(4,8)	-

Keterangan : + = ada antibiotik
 - = tidak ada antibiotik
 r(x,y) = antibiotik renik pada hari x sampai hari ke-y

Tidak hanya itu, kandungan nitrogen ternyata juga berpengaruh terhadap kecepatan tumbuh (Gambar 1) dan pada pH medium. Kecepatan tumbuh berhubungan dengan kecepatan terbentuknya antibiotik, karena seperti kita ketahui bahwa antibiotik biasanya terbentuk pada masa idiofasa (fasa produksi) yaitu pada saat pertumbuhan menjadi relatif lebih lambat. Jadi semakin cepat mencapai idiofasa, maka semakin cepat pula antibiotik terbentuk.

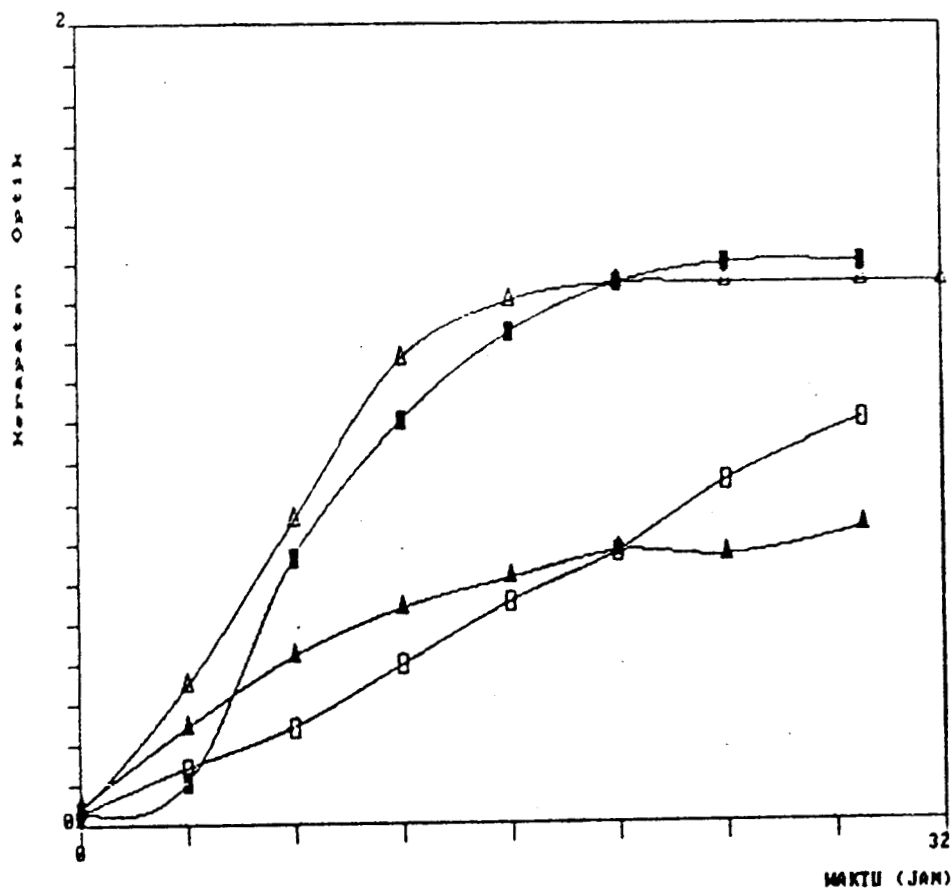


Keterangan :

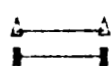
Δ — Δ = Kentang Glukosa.
 ■ — ■ = Nutrien Broth

▲ — ▲ = Mc Daniels
 □ — □ = Lumb

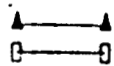
Gambar 1 (a). Kurva Tumbuh *Streptomyces* sp. S-34 pada Berbagai Jenis Medium Fermentasi



Keterangan :

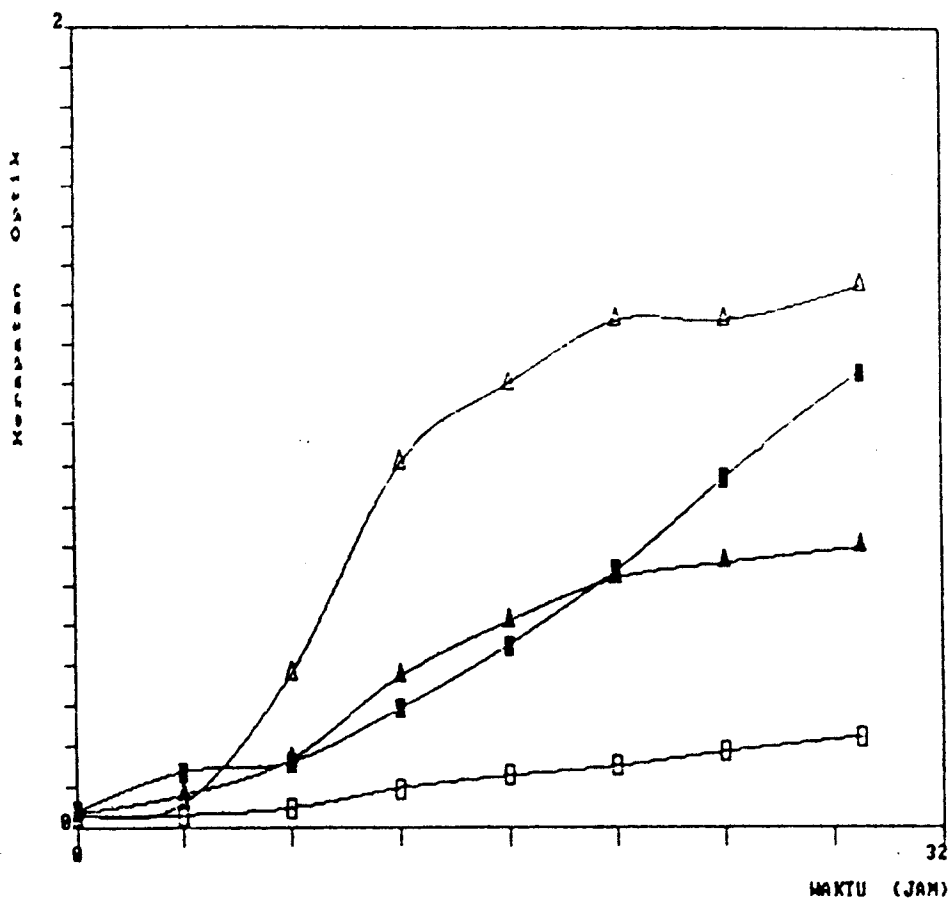


= Kentang Glukosa
= Nutrien Broth



= Mc Daniels
= Lumb

Gambar 1 (b). Kurva Tumbuh *HFSP-1* pada Berbagai Jenis Medium Fermentasi.



Keterangan :

△—△ = Kentang Glukosa
 ■—■ = Nutrien Broth

▲—▲ = Mc Daniels
 □—□ = Lumb

Gambar 1 (c). Kurva Tumbuh HFSP-2 pada Berbagai Jenis Medium Fermentasi

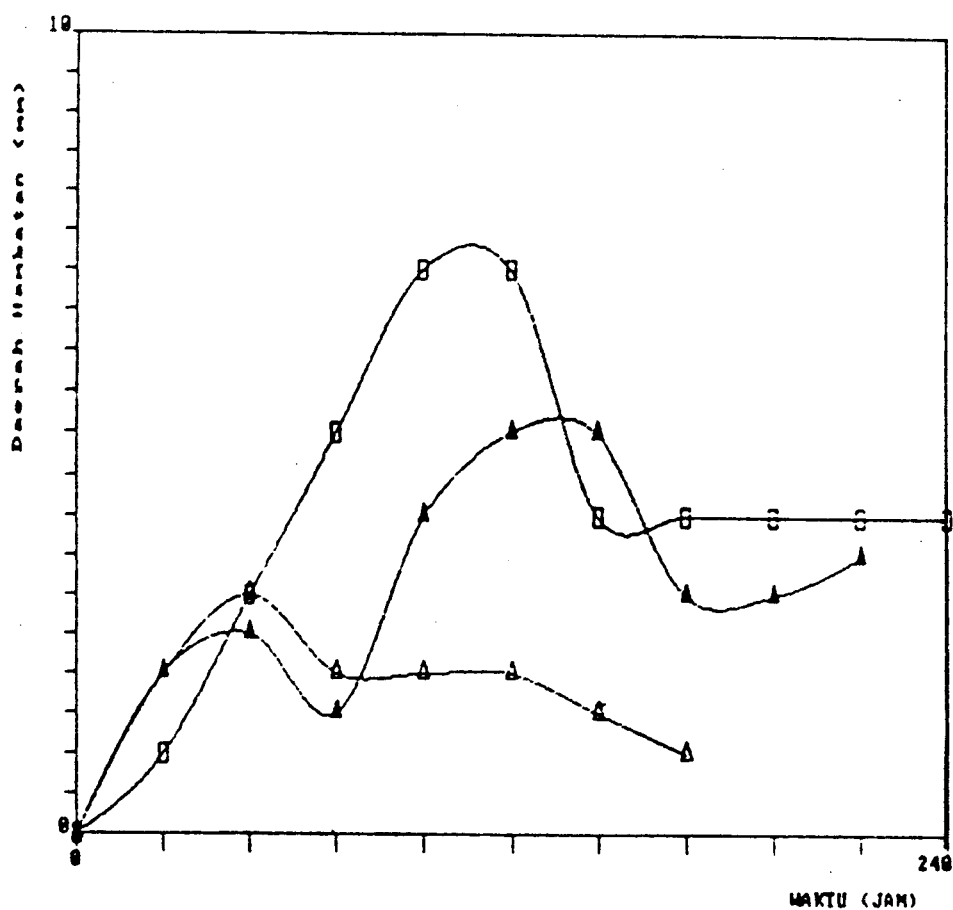
Faktor yang mungkin menyebabkan kurang baiknya pertumbuhan pada medium kompleks Mc Daniels adalah ketidakmampuan mikroorganisme itu untuk menguraikan sumber protein dari tumbuhan, dalam hal ini kacang kedelai.

pH medium akan berpengaruh pada proses pembentukan dan kestabilan antibiotik yang dihasilkan. walaupun belum jelas mekanismenya, pada umumnya antibiotik akan terbentuk pada harga pH antara 7 dan 8. Sedangkan pada pH yang lebih tinggi dari harga tersebut, potensi antibiotik yang ada menjadi lebih rendah. Hal ini disebabkan oleh karena sebagian antibiotik yang sudah terbentuk terurai kembali, karena terhidrolisis dalam suasana basa. Untuk mengatasi hal ini, biasanya pada medium ditambahkan CaCO_3 , yaitu salah satu zat yang dapat mempertahankan kestabilan pH pada daerah netral sampai sedikit basa.

Pengaruh Kadar Glukosa

Kadar glukosa dalam medium jelas berpengaruh untuk pembentukan antibiotik terutama untuk mikroorganisme yang peka terhadap kekurangan dan kelebihan kandungan glukosa. Untuk *Streptomyces sp.* S-34 (Gambar 2) yang relatif lebih mampu menghidrolisis polisakarida, kadar glukosa yang kecil sampai optimum hanya berpengaruh pada jumlah atau potensi antibiotik yang dihasilkan, tetapi tidak berpengaruh pada kecepatan pembentukannya.

Sedangkan pada *HFSP-1*, antibiotik tidak terbentuk pada medium tanpa glukosa dan hanya sedikit terbentuk pada medium dengan glukosa yang minimum. Hal ini besar kemungkinan karena *HFSP-1* kurang mampu menghidrolisis polisakarida yang ada dalam medium, sehingga medium kekurangan "senyawa antara" atau prekursor untuk biosintesis antibiotik. Demikian pula halnya yang terjadi pada *HFSP-2* pada medium tanpa glukosa dan kadar glukosa minimum.



Keterangan :

- △—△ = tanpa glukosa
- ▲—▲ = 1 %
- = 2 %

Gambar 2. Potensi Antibiotik hasil Fermentasi pada Medium Kentang dengan Berbagai Kadar Glukosa oleh *Streptomyces* sp. S-34

Pada medium dengan kadar glukosa yang tinggi, yakni 4%, *Streptomyces sp.* S-34 dan HFSP-1 sama sekali tidak menghasilkan antibiotik, tetapi HFSP-2 dapat memproduksinya pada hari ke-6, walaupun hanya sedikit. Fenomena ini terjadi mungkin disebabkan oleh terlalu rendahnya pH medium pada fermentasi oleh *Streptomyces sp.* S-34 dan HFSP-1. Harga pH medium yang demikian rendah tersebut karena pola metabolisme yang terjadi lebih "aktif" terhadap karbohidrat atau gula. Ini berbeda dengan pola metabolisme pada HFSP-2 yang kurang "aktif" terhadap karbohidrat,

Mengenai perbedaan pola metabolisme tersebut juga dapat kita interpretasikan dari data pH selama proses fermentasi dalam medium sintetik Lumb yang tercantum pada tabel 2. Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa *Streptomyces sp.* S-34 sangat aktif terhadap karbohidrat, dalam hal ini glukosa. Mula-mula mikroorganisme ini memanfaatkan sumber gula dan kemudian kation-kation yang ada dalam medium, sehingga pH larutan menjadi semakin kecil karena dalam medium banyak tertinggal sisa-sisa garam sulfat. Dari harga pH yang naik sedikit saja, dapat disimpulkan bahwa *Streptomyces sp.* S-34 kurang dapat memanfaatkan sumber nitrogen yang berupa glisin.

HFSP-1, walaupun tidak seaktif *Streptomyces sp.* S-34 juga memanfaatkan glukosa terlebih dahulu, baru kemudian tanpa memanfaatkan kation yang ada langsung menguraikan protein yang ada dalam medium, sehingga pH medium menjadi naik kembali dengan cepat.

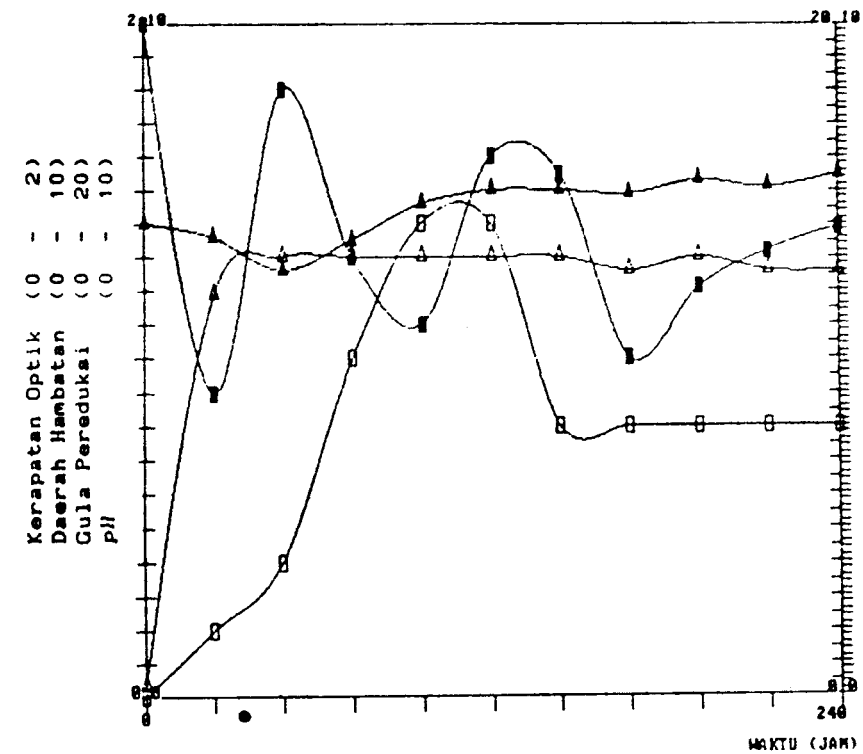
Tabel 2. pH Medium Lumb Selama Proses Fermentasi.

Hari	S-34	HFSP-1	HFSP-2
1	7,0	4,4	6,3
2	3,4	5,8	6,3
3	3,7	8,0	6,4
4	3,8	8,45	6,45
5	3,7	8,7	6,15
6	3,9	9,0	7,85
7	3,95	9,05	8,65
8	4,05	9,15	8,7
9	4,05	9,10	8,75
10	4,05	9,15	8,7

Pada HFSP-2 terjadi hal yang berbeda. HFSP-2 ternyata tidak begitu memanfaatkan glukosa, tetapi langsung memanfaatkan protein. Pada kultur ini pH medium tidak ekstrim naik dan turun, sehingga lebih memungkinkan untuk sintesis antibiotik.

Jalannya Proses Fermentasi

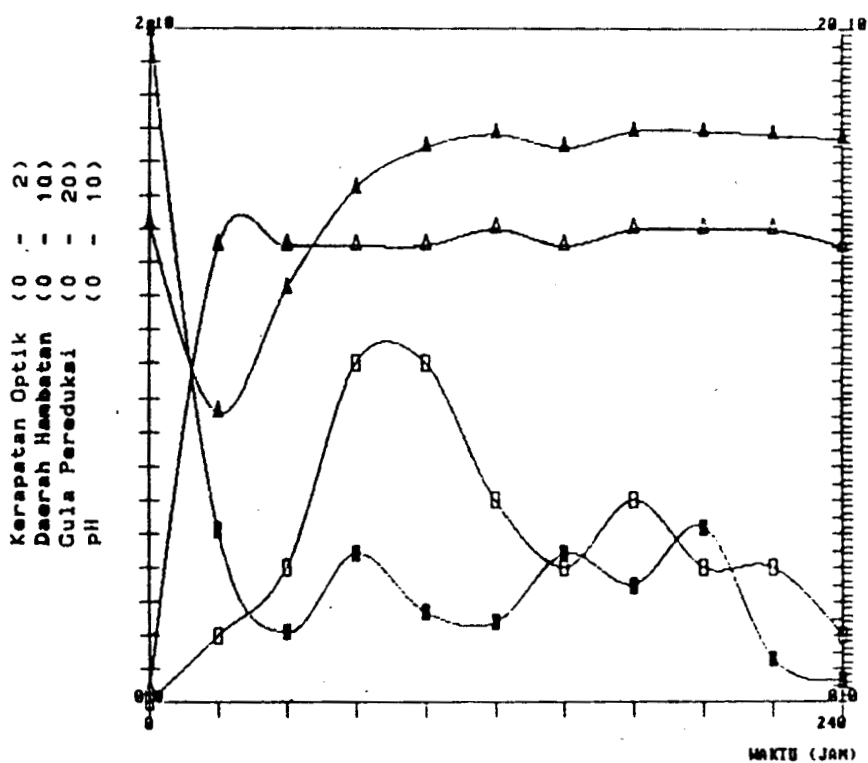
Untuk mengetahui jalannya proses fermentasi, maka dilakukan pengamatan terhadap kadar gula pereduksi, pH dan kerapatan optik selama proses fermentasi pada medium kentang glukosa 2%. Ternyata ketiga mikroorganisme menunjukkan proses yang hampir sama dalam fermentasinya. Secara garis besar proses fermentasi berjalan sebagai berikut (Gambar 3).



Keterangan :

- △ = pertumbuhan sel (kerapatan optik)
- = Kadar Gula pereduksi (gr/L)
- = pH medium
- ◇ = Potensi Antibiotik/Daerah Hambatan (mm/10 µl sentrat)

Gambar 3(a). Jalannya Proses Fermentasi Oleh *Streptomyces* sp. S-34 pada Medium Kentang Glukosa 2%.

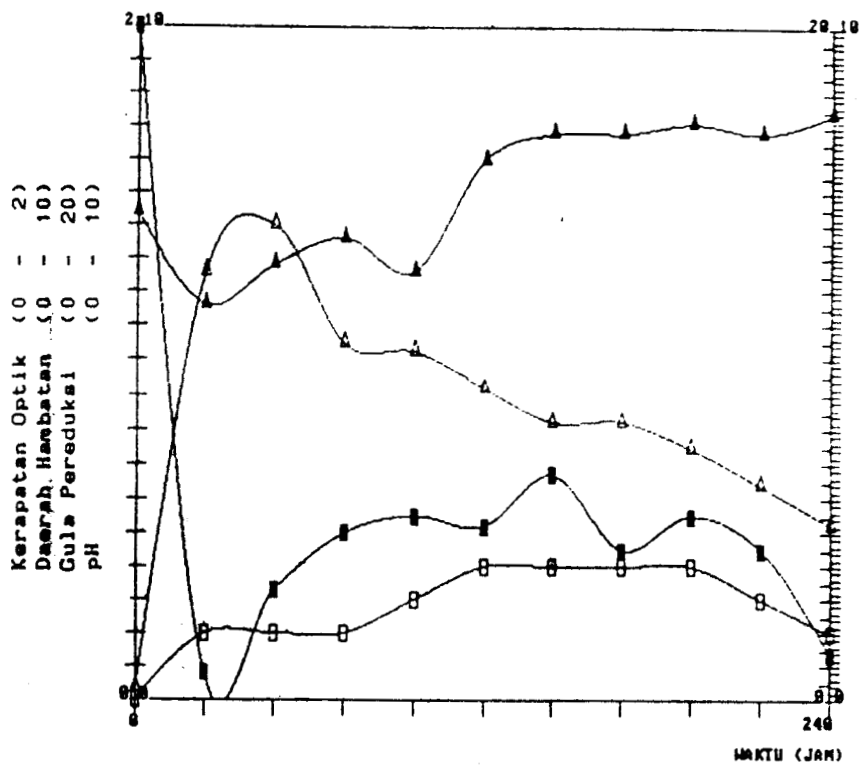


Keterangan :



- = pertumbuhan sel (kerapatan optik)
- = Kadar Gula pereduksi (gr/L)
- = pH medium
- = Potensi Antibiotik/Daerah Hambatan (mm/10 μ L sentrat)

Gambar 3 (b). Jalannya Proses Fermentasi Oleh *HFSP-1* pada Medium Kentang Glukosa 2%.



Keterangan :

△ = pertumbuhan sel (kerapatan optik)
 ■ = Kadar Gula pereduksi (gr/L)
 ○ = pH medium
 ◇ = Potensi Antibiotik/Daerah Hambatan (mm/10 μ L sentrat)

Gambar 3 (c). Jalannya Proses Fermentasi Oleh HFSP-2. pada Medium Kentang Glukosa 2%.

Mula-mula jumlah sel meningkat terus seiring dengan menurunnya kadar gula pereduksi, pH medium turun dan antibiotik mulai terbentuk. Menurunnya kadar gula pereduksi berbeda-beda bergantung pada jenis mikroorganismenya. *HFSP-1* dan *HFSP-2* memakai glukosa dengan jumlah yang hampir sama untuk pertumbuhannya. Sedangkan pada *Streptomyces sp. S-34* kadar gula pereduksi masih cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena *Streptomyces sp. S-34* sudah mampu menghidrolisis karbohidrat dari medium. Selanjutnya jumlah sel mencapai maksimum, antibiotik juga terbentuk, sehingga mencapai harga maksimum, pH larutan mulai meningkat, dan kadar gula pereduksi berfluktuasi karena selain dipakai untuk sintesis antibiotik dan sumber energi juga ada pemasukan gula pereduksi sebagai hasil hidrolisis karbohidrat.

Tahap akhir adalah saat jumlah sel mulai menurun karena kandungan nutrisi medium sudah habis, potensi antibiotik sedikit berkurang karena terhidrolisis pada pH tinggi, pH larutan semakin meningkat karena adanya tambahan nitrogen terlarut dari sel yang mati dan kadar gula pereduksi meningkat lagi karena hasil hidrolisis karbohidrat baik oleh mikroorganisme secara enzimatik maupun yang terhidrolisis karena suasana larutan basa tidak banyak terpakai lagi. Penurunan jumlah sel pada *HFSP-2* yang sangat cepat menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut "kurang menyukai" karbohidrat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil-hasil yang didapat dalam penelitian ini, maka dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Proses fermentasi antibiotik oleh ketiga jenis mikroorganisme yang diteliti berlangsung dengan baik pada medium dengan kandungan karbohidrat yang besar dan kurang baik pada medium dengan kandungan nitrogen yang besar.
2. Glukosa merupakan senyawa antara atau prekursor untuk biosintesis antibiotik oleh ketiga jenis mikroorganisme tersebut dan kadar glukosa berpengaruh terhadap jumlah antibiotik yang dihasilkan.
3. Secara umum proses biosintesis antibiotik oleh ketiga jenis mikroorganisme tersebut adalah sama tanpa memperhatikan kondisi optimum untuk fasa pertumbuhan dan fasa produksi oleh masing-masing mikroorganisme, ternyata *Streptomyces sp. S-34* mampu menghasilkan antibiotik dengan potensi yang lebih besar dari kedua rekombinannya.

Saran

Untuk dapat mengetahui mikroorganisme mana yang paling baik dalam hal menghasilkan antibiotik, maka perlu dilakukan penetapan potensi antibiotiknya secara kuantitatif yang tentunya meliputi jumlah antibiotik yang dihasilkan per jumlah sel mikroorganisme penghasil per jumlah senyawa antara yang tersedia dalam medium. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai struktur molekul antibiotik, cara pemisahan dan pemurniannya, sehingga dapat ditentukan potensi antibiotik itu dalam keadaan murni.

Selain itu juga perlu dilakukan optimasi untuk fermentasi antibiotik yang meliputi komposisi medium dan kondisi fermentasinya, sehingga diperoleh antibiotik dengan jumlah yang maksimum untuk masing-masing jenis mikroorganisme tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Florey, H.W., Chain, E., Heatley, N. G., Jennings, M.A., and Sanders, A.G.. 1949. "Antibiotics". Volume I and Volume II. Oxford Iniversity Press. London.
- Hash, John H. Editor. 1975. "Methods in Enzymology, Vol. XLIII, Antibiotics". Academic Press. New York San Fransisco - London.
- Hockenhuil, D.J.D. Editor. 1960. "Progress in Industial Microbiology". Volume II. Interscience Publishers Inc. New York.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., and Wright, H. 1977. "Genetic Recombination through Protoplast Fusion in *Streptomyces*". *Nature*. 268. 171-174.
- Martin, J.F. and Demain, A.L. 1980. Control of Antibiotics Biosynthesis". *Microbiol. Rev.* 44. 230 - 251.
- Rechnaidi, Herry. 1987. "Regenerasi Hasil Fusi Protoplas *Streptomyces sp.* dengan *Pseudomonas fluorescens* pada Medium PDA. Skripsi. Jurusan Kimia Institut Teknologi Bandung.
- Suryatma, Pujawati. 1986. "Penentuan Kondisi Optimum Produksi Antibiotika oleh *Streptomyces sp.*, *Streptomyces* S.2-6. dan *Streptomyces* S.9-4". Tesis Sarjana Biologi. Jurusan Biologi. Institut Teknologi Bandung.