

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFITIK ACTINOMYCETES DARI TANAMAN PADI LOKAL LOMBOK

### (ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES BACTERY FROM LOMBOK LOCAL RICE)

**Erna Listiana<sup>1)</sup>, Dwi Ratna Anugrahwati<sup>1)</sup>, Irwan Muthahanas<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>. Dosen Program Studi Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Mataram

<sup>2)</sup>. Dosen Program Studi Hama Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Mataram

#### ABSTRAK

Empat isolat endofitik actinomicetes diperoleh dari jaringan sehat tanaman padi lokal Lombok. Isolasi menggunakan dua jenis media yaitu Water Yeast Extract Agar dan Yeast Extract Cassamino Acid Agar. Karakteristik masing-masing isolat berbeda yaitu pada substrat micelia, aerial micelia, spora dan pigmen yang dikeluarkan. Salah satu isolat yaitu EL41 memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan jamur fitopatogenik *Fusarium* sp. and *Rhizoctonia solani*.

Kata kunci : bakteri, actinomicetes, padi

#### ABSTRACT

*Four strains of endophytic actinomycetes were isolated from stem and leaves tissues of healthy Lombok local rice. The isolation used 2 types of poor-nutrient media, that is Water Yeast Extract Agar and Yeast Extract Cassamino Acid Agar. Each strain has different characteristics on substrate mycelia, aerial mycelia, spore and reverse pigment. One strain, EL41 has strong ability to inhibit the growth of phytopathogenic fungi *Fusarium* sp. and *Rhizoctonia solani*.*

Keywords : *bacterium, actinomycetes, rice*

#### PENDAHULUAN

Peningkatan produksi padi masih merupakan prioritas pembangunan di bidang pertanian guna memenuhi kebutuhan dan stabilitas pangan secara nasional, bahkan beberapa tahun terakhir, dilakukan impor beras untuk memenuhi kebutuhan beras dalam negeri. Kelangkaan beras seperti ini diakibatkan antara lain karena menyempitnya areal persawahan, kendala bersifat biotik seperti serangan hama penyakit, maupun bersifat abiotik seperti cekaman lingkungan.

Usaha mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan meningkatkan produksi padi dalam negeri yang dapat dilakukan melalui usaha intensifikasi, ekstensifikasi dan diversifikasi. Salah satu bentuk intensifikasi pertanian adalah kecukupan pupuk dan pestisida yang akan membantu tanaman tumbuh berkembang dengan subur dan mencegah kerusakan akibat serangan hama penyakit. Namun akhir-akhir ini, kelangkaan dan mahalnya harga pupuk sebagai dampak kenaikan harga bahan bakar minyak turut menurunkan produktivitas lahan yang berakibat pada menurunnya produksi beras.

Nusa Tenggara Barat terdiri dari pulau Lombok dan pulau Sumbawa dengan mata pencaharian utama penduduk adalah bertani. Pulau Lombok menunjukkan relief yang kasar, karena dibentuk oleh pegunungan utara yang mencapai ketinggian 3775 m dari permukaan laut (dpl), perbukitan di bagian selatan dengan ketinggian sekitar 380 m dpl, dan daerah datar yang terletak diantaranya. Curah hujan bulan Desember – Januari 150-400 mm/bulan sedangkan bulan Agustus – September 0 – 50 mm/bulan (BAPPEDA Nusa Tenggara Barat, 1997). Kondisi yang beragam tersebut lambat laun memaksa terjadinya variasi makhluk hidup sebagai sumber keragaman dalam jenis.

Keanekaragaman hayati yang tercipta termasuk jenis tanaman dan mikroorganisme di sekitarnya.

Sumarjan (2004) telah melakukan eksplorasi dan koleksi terhadap plasma nutfah padi di wilayah pulau Lombok. Dari usaha tersebut didapatkan 29 jenis padi yang telah secara turun temurun ditanam oleh penduduk setempat. Keragaman pada jenis tanaman padi tersebut

disebabkan karena sejarah pembudidayaan yang lama pada kondisi lingkungan dan iklim setempat.

Keragaman pada jenis tanaman padi tersebut juga bukan tidak mungkin diikuti oleh keragaman pada komunitas bakteri yang hidup berasosiasi dengan tanaman padi. Seperti yang ditemukan oleh Sudantha (2005) yaitu ada 5 jenis mikroorganisme endofit dalam batang tanaman vanili yang tumbuh tersebar di wilayah kabupaten Lombok Timur dan Lombok Barat.

Menurut Hallmann (2001), bakteri endofit adalah bakteri yang menempati jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tanaman. Sebaliknya, bakteri endofit tersebut ada yang mampu memproduksi senyawa-senyawa bermanfaat seperti senyawa antimikrobia, enzim pendegradasi dinding sel maupun zat pengatur tumbuh auxin, sitokinin dan etilin (Persello-Cartieaux, *et al.*, 2003).

Senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikrobia tersebut bermanfaat bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Zat pengatur tumbuh yang dihasilkan dapat menambah panjang akar, jumlah cabang akar dan rambut akar, berat kering akar maupun panjang batang pada berbagai jenis tanaman. Pertumbuhan akar yang cepat akan segera memantapkan pertumbuhan tanaman muda untuk menyerap air dan nutrisi dari lingkungannya. Hal ini bermanfaat terutama bagi tanaman yang tumbuh di daerah kering dimana air menjadi pembatas utama pertumbuhan. Antimikrobia dan enzim pendegradasi dinding sel yang dihasilkan, dapat membantu mengatasi serangan patogen penyebab penyakit pada tanaman (Hallmann, 2001; Lezin *et al.*, 2001; Patten and Glick, 2002).

Diantara bakteri endofit yang sudah dikenal mampu memproduksi berbagai senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat adalah dari golongan bakteri actinomycetes. Actinomycetes telah dikenal sebagai mikrobia produsen berbagai jenis antibiotik baik antijamur maupun antibakteri. Sekitar 70% dari antibiotik yang ada saat ini diisolasi dari actinomycetes, dimana sebagian besar berasal dari genus *Streptomyces*. Berbagai jenis antibiotik yang dihasilkan bakteri ini telah banyak dimanfaatkan baik dalam bidang kedokteran maupun pertanian (Berdy, 1989; Behal, 2000; Lezin *et al.*, 2001). Selain antibiotik, actinomycetes juga mampu mensekresi berbagai senyawa lain yang berguna dalam bidang pertanian seperti zat pengatur tumbuh (Lezin *et al.*, 2001; Donadio *et al.*, 2002), enzim pendegradasi dinding sel seperti chitinase and  $\beta$ -glucanase (El-Tarabily *et al.*, 2000; Fogliano, 2002) serta siderophore (El-Tarabily, 2003).

Tanaman lokal memiliki ciri khas tersendiri untuk setiap daerah, tanaman ini telah beradaptasi dengan lingkungan tumbuhnya termasuk mikroorganisme yang banyak terdapat di sekitar

lingkungan tumbuhnya. Diyakini plasma nutfah padi yang telah dikumpulkan oleh Sumarjan (2004) juga memiliki kemampuan untuk bersimbiose mutualisme dengan berbagai jenis bakteri lokal setempat termasuk dari golongan actinomycetes. Menurut Cook (1993) mikrobia yang bersimbiose dengan tanaman seringkali spesifik untuk lokasi dan jenis tanaman tertentu. Lebih lanjut, Cottyn *et al.* (2000) telah berhasil mengisolasi berbagai jenis bakteri endofit dari benih padi yang dikoleksi dari berbagai lokasi di Filipina.

Berdasarkan informasi tersebut, penting dilakukan eksplorasi dan identifikasi bakteri endofitik actinomycetes pada berbagai jenis benih padi lokal pulau Lombok yang telah dikoleksi oleh Sumarjan (2004). Isolasi dan identifikasi actinomycete endofit ini penting dilakukan untuk menemukan strain-strain endofitik actinomycetes yang spesifik untuk tanaman padi lokal yang disertai kemampuan memproduksi hormon tumbuh ataupun senyawa antibiotik. Selanjutnya strain-strain endofitik actinomycetes tersebut diharapkan akan berguna dalam usaha membantu pertumbuhan tanaman dan ketahanannya terhadap penyakit yang pada akhirnya akan mengurangi biaya yang dikeluarkan petani untuk membeli pupuk dan pestisida.

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi endofitik actinomycetes dari jaringan batang, akar dan daun plasma nutfah padi lokal NTB.
2. Mengidentifikasi kemampuan sekresi antibiotik antijamur melalui uji antagonisme dengan jamur penyebab penyakit tanaman.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat Percobaan

Penelitian ini akan dilakukan di rumah kaca dan laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Mataram.

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih 5 aksesori plasma nutfah padi Lombok, campuran tanah-humus, ethanol, spiritus, NaOCl, media PDA, WYE (*Water-Yeast Extract Agar*) dan YECD (*Yeast Extract Casein-Hydrolysate Agar*), streptomycin, benomyl, isolat jamur (*Fusarium sp.*).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cangkul, pot plastik, ember, kantong plastik, papan etiket, spidol, ballpoint, pensil, penggaris, kertas, pinset, pisau scalpel, gunting, petridish, lampu Bunsen, gelas ukur, Erlenmeyer,

gelas piala, tabung reaksi, botol vol 1L, autoclave, incubator, laminar air flow.

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini meliputi 3 tahap kegiatan yaitu:

#### 1. Penanaman 5 kultivar padi loka.

Penanaman 5 kultivar padi lokal Lombok di kebun percobaan Fakultas Pertanian Unram. Benih dari kultivar padi lokal masing-masing ditanam dalam pot. Pengamatan dilakukan setiap 2 minggu sekali dimulai dari umur 2 minggu hingga umur 6 minggu setelah tanam. Pengamatan dilakukan dengan mengambil 2 tanaman dari masing-masing kultivar lokal.

#### 2. Isolasi dan identifikasi endofitik actinomycetes

Isolasi endofitik actinomycetes dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Unram. Pertama-tama dilakukan sterilisasi permukaan tanaman sesuai dengan yang dipaparkan oleh Coombs dan Franco (2003) sebagai berikut:

- a. Tanaman yang telah dibersihkan dengan air mengalir, kemudian dipisahkan antara bagian akar, batang dan daun.
- b. Sample tanaman dicelupkan 1 menit ke ethanol 99%, kemudian direndam dalam larutan NaOCl 3% selama 6 menit dan dicelupkan kembali dalam ethanol 99% selama 30 detik. Sampel kemudian dibilas dengan air steril dan dikeringkan dengan tissue steril.
- c. Masing-masing bagian tanaman yang telah steril tersebut kemudian dipotong-potong kurang lebih 1 cm dan diletakkan pada media isolasi. Untuk mengecek yang tumbuh adalah actinomycetes endofit, sebelum diletakkan pada medium isolasi, sampel tanaman tersebut digulingkan pada media kontrol untuk meyakinkan bahwa permukaan tanaman benar-benar steril.
- d. Media isolasi yang digunakan adalah beberapa media isolasi actinomycetes terbaik dari hasil beberapa penelitian:
  - WYE (Water-Yeast Extract Agar) mengandung yeast extract 0,3 g/L;  $K_2HPO_4$  0.5 g/L dan agar 18 g/L (Crawford, 1993)
  - YECD (Yeast Extract-Casein Hydrolysate Agar) mengandung yeast extract 0.3 g/L;  $K_2HPO_4$  2 g/L; glucose 0.3 g/L dan agar 18 g/L (Coombs dan Franco, 2003a). Masing-masing media dibuat dalam kisaran pH  $7.2 \pm 0.2$ . Kedalam media

ditambahkan antibiotic streptomycin 50ug/l dan benomyl 50 ug/l sebagai selektif media untuk mencegah tumbuhnya bakteri dan jamur kontaminan.

- e. Sampel diinkubasi pada 27°C selama 1-2 minggu sampai koloni actinomycetes muncul. Masing-masing koloni tunggal kemudian dipindahkan ke medium PDA sebagai medium pertumbuhan.

#### 3. Identifikasi endofitik actinomycetes

Pengamatan dilakukan terhadap isolat-isolat yang didapat, meliputi pengamatan warna miselia, spora dan ada tidaknya sekresi warna ke medium.

#### 4. Identifikasi sekresi antibiotik

Identifikasi sekresi antibiotik (antijamur) ditentukan melalui uji antagonis dengan spesies jamur penyakit tanaman yaitu *Fusarium* sp. Sedangkan bakteri diwakili oleh bakteri gram positif dan gram negatif. Media yang digunakan dalam bioassay adalah PDA. Bioassay terhadap jamur dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat actinomycetes pada sepertiga bagian petridis (diameter 9 mm). Actinomycetes kemudian diinkubasi sampai terjadi sporulasi. Pada saat ini diduga antibiotik telah meresap ke dalam agar. 0.5 cm<sup>2</sup> potongan agar dari kultur jamur diletakkan pada bagian tengah dari dua per tiga bagian petri yang telah berisi kultur actinomycetes. Kultur tersebut kemudian diinkubasi selama 2-3 hari untuk melihat penghambatan pada pertumbuhan jamur yang dites. Zona hambatan diukur sebagai selisih antara diameter pertumbuhan jamur pada petri bioassay dibandingkan dengan control yaitu petri yang ditumbuhi jamur tanpa isolat actinomycetes (Coombs dan Franco, 2003).

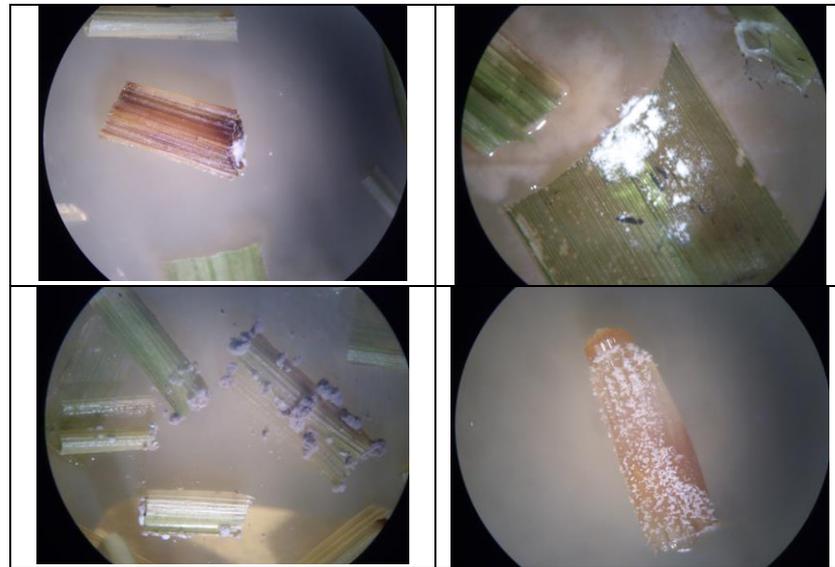
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Endofit Actinomycetes

Isolasi endofit actinomycetes dari dalam jaringan 5 aksesi tanaman padi berhasil memunculkan 74 isolat mikrobial dari jaringan akar, batang maupun daun tanaman padi yang sehat. Identifikasi awal dengan observasi bentuk koloni dan ciri khas bau yang ditimbulkan kultur actinomycetes, yaitu bau tanah, menunjukkan hanya 4 (empat) isolat yang diyakini tergolong dalam kelas actinomycetes. Keempat isolat tersebut

Tabel 1. Isolat endofit actinomycetes yang diisolasi dari dalam jaringan tanaman padi.

No.	Isolat	Aksesi tanaman padi	Bagian tanaman padi	Umur tanaman saat isolasi	Media yang digunakan
1.	EL41	A21	Daun	4 minggu	WYE
2.	EL48	A18	Batang	2 minggu	YECD
3.	EL70	A2	Batang	4 minggu	WYE
4.	EL71	A2	Daun	4 minggu	WYE



Gambar 1. Isolat Endofit yang muncul dari dalam jaringan batang dan daun tanaman padi.

berasal dari bagian tanaman padi yang berbeda pada 3 aksesi padi lokal NTB koleksi Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram. Isolat-isolat lainnya kemungkinan bukan merupakan golongan actinomycetes atau actinomycetes yang masih tercampur dengan mikrobial golongan lain dan sulit dipisahkan sehingga kulturnya tidak menimbulkan bau khas actinomycetes. Keempat isolat tersebut adalah isolat EL41, EL48, EL70 dan EL71 (Tabel 1). Keempat isolat tersebut muncul dari dalam jaringan batang dan daun tanaman padi yang berumur antara 2 - 4 minggu (Gambar 1). Frekuensi munculnya isolat dari batang sama dengan isolat yang muncul dari daun yaitu masing-masing sebanyak 2 isolat (50%). Fenomena ini menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut mampu mengkolonisasi jaringan batang dan daun dari tanaman padi lokal hingga sedikitnya berumur satu bulan. Actinomycetes mampu muncul dari kedua medium isolasi yang digunakan yaitu Water - Yeast Extract Agar dan Yeast Extract - Casein Hydrolysate Agar. Kedua medium tersebut adalah medium yang miskin hara. Hasil penelitian Coombs dan Franco (2003) juga menunjukkan bahwa, isolasi endofit actinomycetes lebih efektif dari media yang miskin nutrisi. Isolat-isolat actinomycetes tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

### Identifikasi Endofit Actinomycetes

Identifikasi keempat isolat actinomycetes dilakukan dengan mengkulturkan keempat isolat tersebut pada tiga macam media berbeda. Media-media yang digunakan adalah media PDA, ISP2 dan ISP4.

Karakterisasi dilakukan dengan mengobservasi perbedaan warna koloni masing-masing isolat actinomycetes pada keempat media tersebut. ISP2 termasuk *undefined* medium karena tersusun dari bahan-bahan organik yang tidak diketahui pasti komponen-komponen penyusunnya. ISP4 termasuk *defined* medium, karena tersusun dari garam-garam anorganik. Perbedaan warna yang terjadi disebabkan perbedaan kemampuan dari masing-masing isolat actinomycetes dalam mencerna komponen-komponen media tersebut.

Sifat atau karakter yang diamati meliputi warna pada substrat miselia, aerial miselia, spora, reverse pigmen dan solubel pigmen. Substrat miselia adalah miselia yang tumbuh langsung dari substrat. Sedangkan aerial miselia tumbuh ke arah luar substrat dan tumbuh di atas/setelah substrat miselia. Reverse pigmen adalah warna yang terbentuk dibagian dasar/bawah dari kultur actinomycetes. Reverse pigmen diamati dengan

Tabel 2. Karakterisasi Isolat Actinomycetes pada Tiga Macam Media

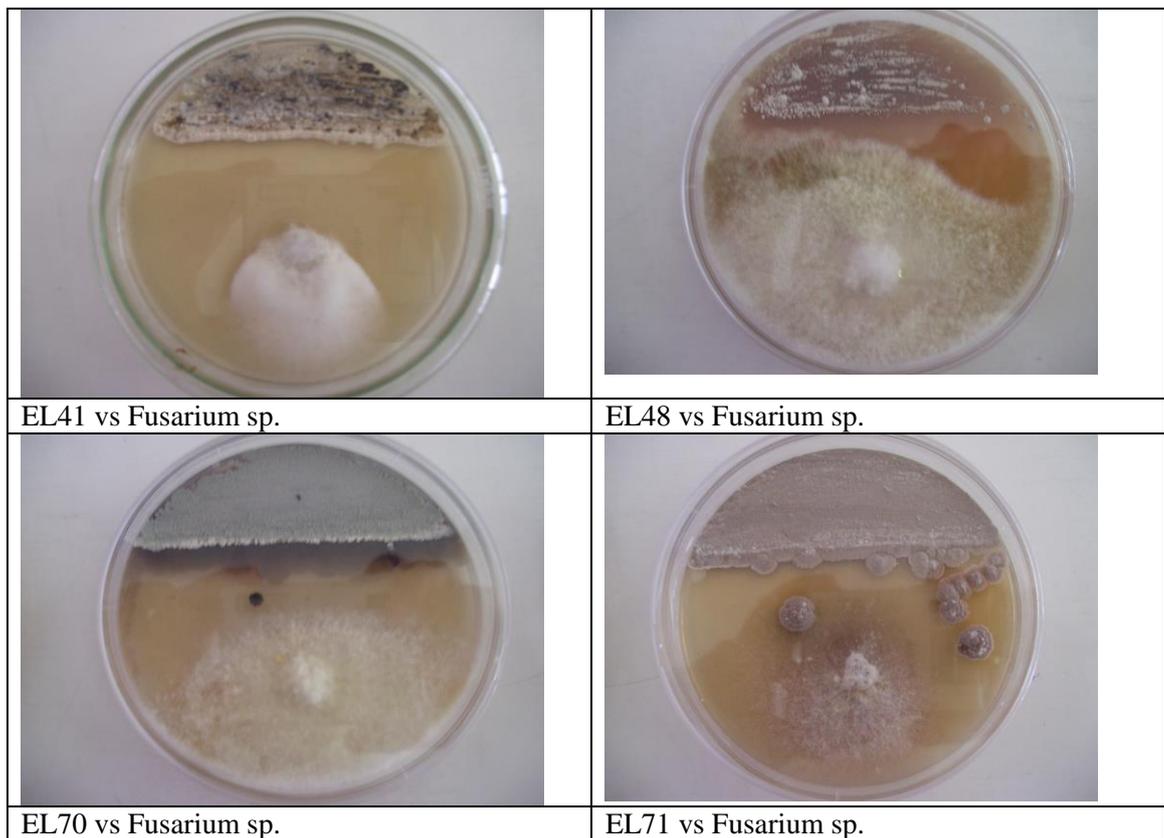
No.	Isolat	Media	Karakter Isolat Actinomycetes				
			Substrat miselia	Aerial miselia	Spora	Reverse Pigmen	Solubel Pigmen
1.	EL41	PDA	Cream keputihan	Cream keputihan	Putih keabuan	Kuning kecoklatan	Tidak ada
		ISP2	Cream keputihan	Abu-abu keputihan	putih	Cream kekuningan	Tidak ada
		ISP4	Cream keputihan	Abu-abu keputihan	putih	Cream kekuningan	Tidak ada
2.	EL48	PDA	Cream kekuningan	Cream kecoklatan	Putih kecoklatan	Cream kecoklatan	Tidak ada
		ISP2	Cream kekuningan	Cream kecoklatan	Putih kecoklatan	Cream kecoklatan	Tidak ada
		ISP4	Cream kekuningan	Cream kecoklatan	Putih kecoklatan	Cream kecoklatan	Tidak ada
3.	EL70	PDA	Cream keputihan	Putih	Abu-abu kebiruan	Hitam	Tidak ada
		ISP2	Cream keputihan	Putih	Putih keabuan	Hitam	Tidak ada
		ISP4	Cream keputihan	Putih	Putih keabuan	Hitam	Tidak ada
4.	EL71	PDA	Cream	Cream kecoklatan	Coklat	Cream kekuningan	Tidak ada
		ISP2	Cream	Cream kecoklatan	Putih kecoklatan	Cream	Tidak ada
		ISP4	Putih	Cream keputihan	Putih kecoklatan	Cream	Tidak ada

membalikkan petri dan melihat warna yang terbentuk pada bagian dasar kultur. Solubel pigmen adalah warna yang diekskresikan oleh kultur kedalam media tumbuh. Hasil observasi dari keempat isolat actinomycetes tersebut adalah seperti terlihat pada Tabel 2. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang jelas diantara keempat macam isolat bila ditumbuhkan pada medium yang sama. Namun terdapat sedikit perbedaan warna karakter-karakter yang diamati dari suatu isolat pada tiga media berbeda. Selain itu, masing-masing isolat rata-rata membutuhkan waktu yang lebih lama untuk tumbuh pada medium ISP4. Diduga isolat-isolat actinomycetes tersebut lebih mampu memanfaatkan bahan-bahan organik yang terdapat pada media PDA dan ISP2 sebagai sumber nutrisinya.

Masih diperlukan identifikasi lanjutan yang lebih akurat terhadap masing-masing isolat. Identifikasi tersebut dapat dilakukan pada tingkat DNA dengan mengisolasi 16S ribosomal DNA untuk mengidentifikasi golongan actinomycetes hingga tingkat genus dan untuk mengetahui apakah isolat-isolat tersebut masih dalam cluster yang sama (Coombs dan Franco, 2003).

### Sekresi Anti Jamur

Uji kemampuan sekresi antijamur antibiotik dari masing-masing isolat dilakukan dengan mengkulturkan isolat pada 1/3 bagian petri hingga terjadi sporulasi. Setelah sporulasi, antijamur antibiotik dianggap telah disekresikan ke dalam media sehingga hambatan pertumbuhan jamur patogen akibat antijamur dapat teramati. Jamur phytopatogen kemudian dikulturkan pada bagian tengah dari 2/3 bagian petri yang sama untuk melihat hambatan pertumbuhan yang terjadi. Hasil uji ini menunjukkan bahwa keempat isolat mampu menghambat pertumbuhan jamur baik *Fusarium* sp. (Gambar 2) maupun *Rhizoctonia solani*. Namun "clear zone" atau zona hambatan yang jelas hanya ditunjukkan oleh isolat EL41. EL41 mampu menghasilkan zona hambatan pada petri rata-rata selebar 17 mm melawan *Fusarium* sp. dan 19 mm melawan *Rhizoctonia solani*. Crawford *et al.* (1993) dan Taechowisan *et al.* (2002) mengemukakan, zona hambatan  $\geq 20$ mm termasuk sangat kuat (+++); 11-19 mm termasuk kuat (++); 2-10 mm termasuk pertumbuhan terhambat/zona hambatan dekat koloni (+);  $\leq 1$ mm termasuk hambatan minor,



Gambar 2. Foto Uji Sekresi Senyawa Anti Jamur dari Empat Isolat Endofit Actinomycetes

pertumbuhan hifa jamur tipis (tidak tebal) dan pertumbuhan terhambat ( $\pm$ ); 0 mm bila tidak ada hambatan pertumbuhan (-). Berdasarkan hasil pengamatan, isolat EL41 termasuk kuat (++), sedangkan EL48, EL70 dan EL71 termasuk hambatan minor ( $\pm$ ) terhadap kedua jenis jamur. Dari hasil ini dapat diduga bahwa isolat EL41 mensekresi antijamur yang cukup kuat untuk menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium* sp. atau *Rhizoctonia solani*. Isolat ini perlu diuji lebih lanjut secara *in planta* untuk melihat kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen saat berada dalam jaringan tanaman inang.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Diperoleh 4 isolat endofit actinomycetes dari dalam jaringan batang dan daun tanaman padi lokal NTB yang sehat.
2. Hasil identifikasi menunjukkan keempat isolat memiliki karakteristik warna berbeda.
3. Isolat EL41 mampu mensekresi senyawa antijamur yang menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani*.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anugrahwati, D.R., 2005. Activity of endophytic actinomycetes against *Meloidogyne javanica*. Master Thesis. Flinders University of South Australia.
- Bappeda, 1997. Bank Data pembangunan Provinsi Daerah Tk.I Nusa Tenggara Barat. Bappeda NTB. Mataram.
- Behal, V., 2000. Bioactive product from *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology*. 47: 113-157.
- Berdy, J., 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification. *Progress in Industrial Microbiology*. 27: 3-25.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H., Robinson, R., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Stevens, D. and Yaver, D., 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*. 148: 2675-2685.
- Coombs, J.T. and Franco, C.M.M., 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9): 5603-5608.

- Coombs, J.T., Michelsen, P.P. and Franco, C.M.M., 2003. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*. 29: 359-366.
- Cook, R.J., 1993. Making Greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 31: 53-80.
- Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Clene, M., Mew, T.W. and Swings, J., 2000. Bacterial Population Associated with Rice Seed in The Tropical Environment. *Phytopathology*. 9 (3): 282-292.
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. and Ousley, M.A., 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (11): 3899-3905.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M. and Puglia, A.M., 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*. 99: 187-198.
- El-Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F. and Hardy, G.E.St.J., 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*. 49: 573-583.
- Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S., Scala, F. and Lorito, M., 2002. Pseudomonas Lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15 (4): 323-333.
- Hallmann, J., 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. Biotic interactions in plant-pathogen associations. CAB International. pp 87-119.
- Irawati, A. F. C. 2005. Characterization and Hypovirulent Test of *Rhizoctonia* sp. from Healty Vanilla Roots. Paper Presented on The 1<sup>st</sup> International Conference of Crop Security 2005, Brawijaya University, Malang, September 20<sup>th</sup> – 22<sup>nd</sup>, 2005. 17 p.
- Lezin, D.C., Salove, M.K.H., Crawford, D.L. and Beaulieu C., 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 82 (3): 85-102.
- Mundt, J.O. and Hinkle, N.F., 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*. 32: 694-698.
- Nejad, P. and Johnson, P.A., 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control*. 18: 208-215.
- Nishimura, T., Meguro, A., Hasegawa, S., Nakagawa, Y., Shimizu, M. and Kunoh, H., 2002. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30. *Journal of General Plant Pathology*. 68(4): 390-397.
- Okazaki, T., Takahashi, K., Kizuka, M. and Enokita, R., 1995. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. *Annual Report of the Sankyo Research Laboratory*. 47: 97-106.
- Patten, C.L and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (8): 3795-3801.
- Persello-Cartiaux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C., 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*. 26: 189-199.
- Shimizu, M., Nakagawa, Y., Sato, Y., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, R. and Kunoh, H., 2000. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from rhododendron and its antifungal activity. *Journal of General Plant Pathology*. 66 (4): 360-366.
- Sulistiyowati, L., N. F. Deci and A. R. Gendall. 2005. Isolation and Sequencing of Chitinase and Glucanase Genes of Endophytic *Trichoderma asperellum* from Citrus Stem. In Program and Abstract The 1<sup>st</sup> International Conference of Crop Security 2005, Brawijaya University, Malang, September 20<sup>th</sup> – 22<sup>nd</sup>, 2005. 264 p.
- Sumarjan, 2004. Laporan Pengembangan Konservasi Plasma Nutfah. Koleksi Plasma Nutfah Tanaman Pangan di Nusa Tenggara Barat. Program Studi Pemuliaan Tanaman. Fakultas Pertanian. Universitas Mataram.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F. and Lumyong, S., 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19 (4): 381-385.
- Waksman, S.A., 1967. The actinomycetes, a summary of current knowledge., 1967. The Ronald Press Company. New York. 280p.