

Pengaruh Sumber Karbon Terhadap Daya Antagonistik Bakteri *Pseudomonas Pendar Fluor* Terhadap *Erwinia Carotovora*

Hardian Susilo ADDY

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jl. Kalimantan 37 Jember 68121

ABSTRACT. This research was conducted to study antimicrobial stimulation of fluorescent pseudomonad to inhibit *Erwinia carotovora*. We used several carbon sources to stimulate antimicrobial substances from fluorescent pseudomonad that available to inhibit *E. carotovora* in vitro. The results shown that mannitol 10% was the best stimulant agent to increase antagonistics of fluorescent psudomonad againts *E. carotovora*. Also, mannitol increased antimicrobial substances twohold compared with control without stimulant agent. Detection of antimicrobial substance using TLC showed that only one antimicrobial was detected with retention factor (Rf) of 0,68. However, identification and characterisation of that substance is needed.

Keyword(s) : *antimicrobial stimulation, fluorescent pseudomonad, Erwinia carotovora, carbon sources*

PENDAHULUAN

Erwinia carotovora merupakan salah satu spesies bakteri yang umumnya menyebabkan gejala busuk lunak pada beberapa tanaman hortikultura (Schaad *et al.*, 2001). Bakteri ini memiliki kisaran inang yang sangat banyak dan dapat menginfeksi tanaman dalam penyimpanan (Goto, 1992). Dampak yang disebabkan oleh bakteri patogen tersebut sangat serius (Semangun, 1991). Bakteri ini merupakan patogen terbawa tanah yang sulit dikendalikan secara kimiawi (Arwiyanto dan Hartana, 1999) dan penyebarannya sangat cepat.

Kondisi di atas memberikan gagasan untuk melakukan pengendalian secara biologi, tepatnya dengan memanfaatkan agensia pengendali hayati karena dianggap lebih efektif dan ramah lingkungan (Kloepper, 1993). Bakteri risosfer seperti pseudomonas pendar fluor telah banyak digunakan sebagai agensia pengendali hayati patogen tumbuhan (Arwiyanto, 1999; Compant *et al.*, 2005). Pemanfaatan pseudomonas pendar fluor sebagai agensia pengendali hayati telah banyak dilakukan karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antimikrobia (Whippes, 2001; de Boer *et al.*, 2003; Kazempour, 2004).

Mekanisme antagonistik agensia pengendali hayati berbeda-beda tergantung pada genus, spesies dan strain bakteri antagonis maupun patogennya (Whippes, 2001; Addy, 2005). Produksi senyawa antimikrobia berhubungan dengan kemampuan suatu bakteri antagonis yang secara genetik biosintesis senyawa tersebut melibatkan lebih dari satu gen (Sigeer, 1993) dengan regulasi yang berbeda tergantung pada jenis senyawa antimikrobia yang dihasilkan (Poole and McKay, 2003).

Pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa regulasi masing-masing jenis senyawa antimikrobia ini berhubungan erat dengan sumber karbon (Duffy and Defago, 1999). Schnider *et al.* (1995) menemukan bahwa biosintesis antibiotik pyrrolnitrin sangat dipengaruhi oleh sumber karbon berupa glukosa.

Namun informasi tentang pengaruh stimulan senyawa antimikrobia dalam mekanisme penghambatan masih kurang diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh stimulasi senyawa antimikrobia yang diproduksi pseudomonas pendar fluor terhadap kemampuannya dalam mengendalikan bakteri patogen *E. carotovora* subsp. *carotovora*.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri. Bakteri patogen busuk lunak (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) dan Bakteri pseudomonas pendar fluor dari risosfer tanaman kubis diisolasi dari tanaman kubis dengan cara streak plate pada medium NA (Nutrient Agar) dan King's B. Koloni yang tumbuh kemudian diidentifikasi dan diuji virulensi serta patogenesisitasnya mengikuti Fahy and Hayward (1983) dan Schaad *et al.* (2001).

Larutan Stimulan dan Medium Pengujian. Stimulan berupa sumber karbon adalah Glukosa, Fruktosa, Manitol dan Gliserol ditambahkan dalam medium uji KB (King's B) volume 10 ml dengan konsentrasi akhir 1%, 2,5%, 5% dan 10% (wt/vol) sedangkan kontrol berupa medium uji tanpa penambahan sumber karbon. Setelah itu medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Uji Antagonistik Pseudomonas Pendar Fluor terhadap *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Uji antagonistik dilakukan untuk mengetahui pengaruh stimulan terhadap daya antagonistik pseudomonas pendar fluor dalam mengendalikan patogen busuk lunak (*E. carotovora* subsp. *carotovora*). Pengujian dilakukan dengan metode *double layer agar*. Bakteri antagonis ditumbuhkan pada medium uji (King's B yang mengandung stimulan) dalam petridish, masing-masing petridis 4 titik biakan, kemudian menginkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Setelah inkubasi petridis dibalik dan pada tutupnya ditetesi dengan 1 ml kloroform dan dibiarkan selama 2 jam hingga semua kloroform

menguap kemudian petridis dibalik seperti keadaan semula. Sebanyak 0,2 ml suspensi *E. carotovora* subsp. *carotovora* yang berumur 24 jam dicampur dengan 4 ml agar air 0,6 % suhu 50° C, dan dituang dalam biakan bakteri antagonis. Hasilnya kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan didasarkan pada luas zona penghambatan yang terbentuk hasil terbaik dari masing-masing perlakuan konsentrasi dipilih untuk pengujian selanjutnya.

Produksi Senyawa Antimikrobia *Pseudomonas Pendar Fluor*. Masing-masing konsentrasi larutan stimulan baik sumber karbon dan mineral terbaik dari hasil uji sebelumnya diamandemenkan pada medium King's B cair pada tabung (volume 5 ml). Sebanyak 1 ml suspensi bakteri antagonis (*pseudomonas pendar fluor*) dimasukkan ke dalam medium tersebut dan diinkubasikan selama 48 jam dengan menggunakan *rotary shaker*. Selanjutnya filtrat kultur bakteri yang mengandung senyawa antimikrobia ini diambil dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 10 menit dan disterilkan dengan mikrofilter 0,22 mM. Hasil filtrasi ditampung dalam erlenmeyer untuk pengujian daya hambat senyawa antimikrobia.

Pengujian Daya Hambat Senyawa Antimikrobia. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui besarnya peningkatan daya hambat senyawa antimikrobia *pseudomonas pendar fluor* untuk menghambat perkembangan bakteri patogen busuk lunak *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Pengujian ini dilakukan dengan cara meneteskan filtrat masing-masing perlakuan pada pengenceran yang mengikuti nilai *Arbitrary Unit* (AU) (Klement *et al.*, 1990).

Sebanyak 1 ml suspensi bakteri *E. carotovora* subsp. *carotovora* diteteskan dalam 9 ml medium NBA yang belum membeku dan divortek lalu dituang dalam petridish untuk pengujian daya hambat. Masing-masing filtrat perlakuan diencerkan diencerkan mengikuti nilai AU yaitu 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 dan 1/64 sedangkan kontrol adalah air steril. Sebanyak 500 µl filtrat bakteri antagonis dari perlakuan pengenceran diteteskan pada permukaan medium NBA yang mengandung bakteri patogen *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Pengamatan zona bening pada daerah tetesan filtrat dilakukan setelah 24 jam untuk mengetahui kemampuan senyawa antimikrobia dalam menghambat *E. carotovora* subsp. *carotovora*.

Ekstraksi dan Deteksi Senyawa Antimikrobia. Untuk mengetahui jumlah macam senyawa antimikrobia yang distimulasi maka dilakukan ekstraksi dan deteksi senyawa antimikrobia dari bakteri antagonis *pseudomonas pendar fluor*. Ekstraksi senyawa antimikrobia bakteri antagonis dilakukan dengan mengikuti Duffy dan Defago (1999). Filtrat kultur bakteri pada medium cair uji yang mengandung stimulan dengan konsentrasi terbaik sebanyak 20 ml diambil dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 4.500 rpm untuk memisahkan bakteri dengan metabolitnya yang terdifusi ke dalam medium cair,

kemudian pH nya diatur menjadi pH 2 dengan menambahkan 700 µl HCl 1 M. Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 20 ml etil asetat pada supernatan yang diperoleh dari pemisahan lalu digojok dengan *rotary shaker* selama 30 menit pada 150 sampai 200 rpm. Tahap pemisahan antara substansi metabolit yang terlarut dan tidak terlarut dipercepat dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 4.500 rpm, setelah itu fase pelarut organik dipindahkan pada labu evaporator dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu yang terbentuk dilarutkan dengan 1 ml metanol.

Deteksi senyawa antimikrobia bakteri antagonis dengan *Thin Layer Chromatography* dan *bioassay* pada ekstrak menggunakan plat *Aluminium silica gel 60 F₂₅₄* berukuran 117 mm x 40 mm. Pengujian dilakukan dengan meneteskan 5 µL masing-masing ekstrak menggunakan pipa kapiler 5 µL dengan jarak antar sampel 1 cm, 1 cm dari sisi bawah dan 0,5 cm dari sisi samping. Setelah itu plat TLC dikembangkan dalam eluen berupa metanol : air (60 : 40) setinggi 1 cm dari sisi bawah dan dibiarkan terserap dalam plat TLC hingga 1 cm dari sisi atas. Setelah itu plat dibiarkan mengering dan diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 362 nm lalu ditandai kromatogramnya (berwarna ungu berpendar) dan dihitung nilai faktor retensinya (*Rf* = perbandingan jarak munculnya *spot* dengan jarak yang ditempuh eluen).

Untuk mengetahui jumlah macam senyawa antimikrobia dilakukan bioassay terhadap masing-masing spot pada *Rf* tertentu dengan cara mengerok tiap spot yang selanjutnya disuspensikan dalam 1 ml air steril (4 ulangan spot dalam 1 ml air steril). Selanjutnya diteteskan pada media NA yang telah ditaburi dengan suspensi *E. carotovora* subsp. *carotovora* dan diinkubasikan selama 24 jam. Suspensi yang tampak zona bening menunjukkan bahwa suspensi tersebut mengandung senyawa antimikrobia.

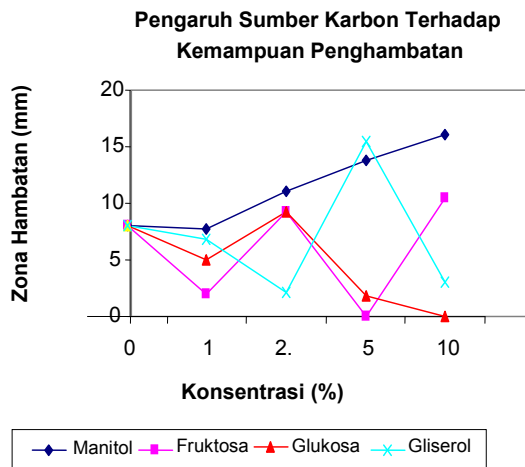
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh stimulan terhadap kemampuan antagonistik *pseudomonas pendar fluor* dalam mengendalikan patogen busuk lunak (*E. carotovora* subsp. *carotovora*).

Pengaruh stimulan terhadap kemampuan antagonistik *pseudomonas pendar fluor* (PF) untuk mengendalikan patogen busuk lunak (*E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)) disajikan dalam Gambar 1.

Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh bahan stimulan dan konsentrasi terhadap kemampuan PF untuk menghambat Ecc secara *in vitro*. Secara umum pengaruh sumber karbon terhadap penghambatan *Erwinia carotovora* ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan sebesar 9,75 mm dibandingkan dengan kontrolnya yaitu 8 mm. Kemampuan kelompok bakteri menghasilkan senyawa antimikrobia merupakan salah satu faktor penting sebagai agensia pengendali hayati. Senyawa antimikrobia yang dihasilkan secara *in vitro*

ditunjukkan dengan besar kecilnya zona hambatan yang terbentuk di sekitar koloni bakteri agensia hayati yang diujikan (Sige, 1993).



Gambar 1. Pengaruh stimulan sumber karbon (A) terhadap kemampuan penghambatan pseudomonas pendar fluor terhadap *Erwinia carotovora* secara *in vitro* pada beberapa konsentrasi. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat kali.

Hasil menunjukkan bahwa sumber karbon yang berbeda berpengaruh terhadap kemampuan penghambatan PF terhadap Ecc. Sumber karbon berupa manitol merupakan stimulan senyawa antimikrobia PF terbaik dibandingkan sumber karbon lainnya yang ditunjukkan dengan besarnya zona hambatan yang terbentuk pada media yang mengandung manitol. Hasil juga menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi manitol makin tinggi daya hambatnya. Sebaliknya makin tinggi konsentrasi gliserol makin rendah kemampuan penghambatan PF terhadap Ecc. Manitol dengan konsentrasi 10% merupakan konsentrasi terbaik untuk meningkatkan kemampuan penghambatan PF terhadap Ecc yaitu 16 mm sedangkan gliserol pada konsentrasi yang sama menyebabkan tidak tampaknya zona hambatan yang dibentuk oleh PF terhadap Ecc.

Sumber karbon secara umum diperlukan oleh mikroba untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Goto, 1992) dan sangat berpengaruh terhadap produksi senyawa antimikrobia, transkripsi dan promosi biosintesis, dan ketersediaan nutrisi dan pH selain menjaga integritas sel, sebagai katalisator enzim dan protein (Weinberg, 1977).

Pengujian pengaruh sumber karbon terhadap kemampuan penghambatan pseudomonas pendar fluor terhadap *Erwinia carotovora* menunjukkan bahwa sumber karbon mampu mempengaruhi produksi senyawa antimikrobia. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa antimikrobia dapat distimulasi dengan penambahan sumber karbon tertentu. Engelhard (1989) mengatakan bahwa sumber karbon dapat menstimulasi pembentukan antibiotik oleh bakteri antagonis.

Peningkatan Daya Hambat Senyawa Antimikrobia *Pseudomonas Pendar Fluor*.

Larutan stimulan berupa sumber karbon berupa manitol 10 % berpengaruh terhadap nilai *arbitrary unit* (AU). Arbitrary unit merupakan nilai pengenceran tertinggi suatu larutan antimikrobia yang masih mampu memiliki penghambatan terhadap organisme targetnya. Hasil menunjukkan bahwa metabolit bakteri pada filtrat kultur dari medium tumbuh yang mengandung larutan stimulan berupa sumber karbon yang diujikan (manitol 10%) memiliki nilai AU yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrolnya (Tabel 1).

Tabel 1. Daya Hambat Filtrat Kultur *Pseudomonas Pendar Fluor* Pada Media Tumbuh yang Mengandung Larutan Stimulan Terhadap *Erwinia carotovora*.

LARUTAN STIMULAN	Nilai Arbitrary Unit (AU)						
	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Manitol 10 %	+ ^a	+	+	-	-	-	-
Kontrol	+	+	-	-	-	-	-

Keterangan : ^a Tanda (+) menunjukkan ada zona hambatan, (-) tidak ada zona hambatan. Masing-masing perlakuan di ulang 3 (tiga) kali

Nilai AU dari filtrat kultur pada media yang mengandung manitol 10% adalah 1/4 yang menunjukkan bahwa filtrat kultur masih memiliki kemampuan penghambatan meskipun kandungannya hanya 25% dalam air steril dibandingkan dengan kontrolnya yang memiliki nilai AU hanya 1/2 atau kandungan filtrat kulturnya 50% dalam air steril. Hal ini menunjukkan bahwa larutan stimulan berupa manitol 10% mampu meningkatkan produksi senyawa antimikrobia dalam filtrat kultur (metabolit bakteri) hingga 2 kali lipat lebih banyak dibandingkan kontrolnya (tanpa penambahan larutan stimulan).

Sumber karbon yang diujikan berupa manitol, fruktosa, glukosa dan gliserol menunjukkan bahwa masing-masing memiliki peran yang berbeda dalam menstimulasi produksi senyawa antimikrobia. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan pembentukan zona hambatan terhadap *E. carotovora* subsp. *carotovora* tergantung pada konsentrasinya. Tingginya zona hambatan yang terbentuk menunjukkan bahwa larutan stimulan yang digunakan mampu menstimulasi pembentukan senyawa antimikrobia dengan baik, sebaliknya rendah atau hilangnya kemampuan pembentukan zona hambatan menunjukkan bahwa larutan stimulan mampu menghambat pembentukan senyawa antimikrobia bahkan dapat membunuh bakteri antagonis. Duffy and Defago (1999) menemukan bahwa senyawa antimikrobia berupa pyoluteorin dan pyrrolnitrin oleh *Pseudomonas fluorescens* CHA0 dapat ditingkatkan dengan penambahan manitol maupun glukosa.

Penambahan manitol 10% diduga sebagai penyebab meningkatnya nilai *arbitrary unit* (AU) atau nilai pengenceran terakhir terhadap suatu larutan antimikrobia

yang masih efektif. Dugaan ini sesuai dengan penemuan Duffy and Defago (1999) bahwa penambahan manitol dalam media biakan dapat meningkatkan produksi antimikrobia pyoluteorin dibandingkan dengan kontrolnya. Tingginya nilai AU dari filtrat kultur yang diperoleh dari penambahan manitol menunjukkan bahwa kedua larutan ini mampu meningkatkan produksi senyawa antimikrobia maupun aktivitas penghambatannya dibandingkan dengan tanpa penambahan kedua larutan tersebut.

Jumlah Senyawa Antimikrobia *Pseudomonas Pendar Fluor* yang distimulasi.

Metabolit ekstraselular yang dimiliki oleh *pseudomonas pendar fluor* sangat beraneka ragam. Diketahui bahwa senyawa-senyawa antimikrobia yang terkandung dalam ekstrak metabolit dapat dipisahkan satu sama lain dengan kromatografi seperti TLC. Hasil menunjukkan bahwa pemisahan dengan senyawa antimikrobia PF dengan TLC tampak berupa noda yang berwarna ungu terang jika diamati di bawah sinar ultraviolet. Munculnya noda menunjukkan bahwa pada tiap noda merupakan senyawa-senyawa hasil pemisahan. Namun perlu dilakukan pengujian lebih lanjut untuk memastikan senyawa yang berupa antimikrobia dengan melakukan *bioassay*. Pada Tabel 2. ditunjukkan bahwa terdapat 7 noda senyawa pada masing-masing perlakuan dengan nilai Rf (faktor retensi) yang bervariasi berkisar 0,08 – 0,85.

Berdasarkan hasil *bioassay* tampak bahwa substansi senyawa dengan faktor retensi berkisar 0,68-0,72 mengandung senyawa antimikrobia yang berperan dalam mengendalikan *Ecc*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penghambatan yang dibentuk oleh senyawa yang diisolasi dari ekstrak metabolit yang diambil noda pada TLC dengan faktor retensi tersebut (Tabel 2.)

Tabel 2. Nilai faktor retensi (Rf), keberadaan dan daya hambat senyawa *pseudomonas pendar fluor* terhadap *Erwinia carotovora* yang dianalisis dengan TLC dan *Bioassay*

Nomor urut noda	Nilai Rf	Keberadaan dan daya hambat senyawa yang distimulasi dengan	
		Manitol 10%	Kontrol
1	0,08	+ ^a / NIz ^b	+ / NIz
2	0,24	+ / NIz	+ / NIz
3	0,41 – 0,45	+ / NIz	+ / NIz
4	0,51 – 0,53	+ / NIz	+ / NIz
5	0,68 – 0,72	+ / Iz	+ / Iz
6	0,76 – 0,81	+ / NIz	+ / NIz
7	0,85	+ / NIz	-

Keterangan : ^a(+) menunjukkan munculnya spot; (-) menunjukkan tidak adanya spot, ^b NIz: menunjukkan tidak ada penghambatan; Iz: menunjukkan adanya penghambatan

Jumlah senyawa antimikrobia yang dapat distimulasi oleh sumber karbon sangat berbeda-beda tergantung pada jenis bakteri maupun jenis sumber karbon. Diketahui bahwa dua spesies bakteri antagonis yang berbeda akan menghasilkan senyawa antimikrobia yang berbeda pula (Jo Handelsman and Stabb, 1996). Hasil

analisis ekstrak metabolit dengan TLC dan *bioassay* menunjukkan bahwa hanya satu substansi yang merupakan senyawa antimikrobia yang terkandung dalam ekstrak. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan oleh hasil isolasi substansi dari plat TLC yang berupa noda ketika diujikan pengaruh daya hambatnya terhadap *E. carotovora*. Masih belum jelas jenis dan karakteristik senyawa antimikrobia tersebut sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Menurut Duffy and Defago (1999) bahwa sumber karbon dapat meningkatkan senyawa antimikrobia berupa 2,4-diasetil fluoro glusinol, pyoluteorin, and pyrrolnitridin dan siderofor berupa asam salisilat dan pyochelin oleh *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0.

KESIMPULAN

Larutan stimulan berupa manitol 10% merupakan larutan stimulan terbaik untuk meningkatkan kemampuan penghambatan *pseudomonas pendar fluor* terhadap *E. carotovora*. Peningkatan daya hambat senyawa antimikrobia yang distimulasi dengan manitol dan seng masing-masing dua kali lipat lebih besar dibandingkan dengan kontrolnya. Terdapat satu jenis senyawa antimikrobia yang di stimulasi oleh manitol.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H.S. 2005. Mekanisme Antagonistik Bakteri *Pseudomonas Pendar Fluor* terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Erwinia carotovora*. Tesis S2. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Arwiyanto, T dan I. Hartana. 1999. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Bakteri Tembakau : 2. Percobaan Di Rumah Kaca. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. **5** (1): 50 – 59.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, and E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4951-4959.
- Daly, J. S., R. A. Dodge, R. H. Glew, D. T. Soja, B.A. Deluca, and S. Hebert. 1997. Effect of zinc concentration in mueller-hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. *American Society for Microbiology* **35**:1027-1029.
- de Boer, M., P. Bom, F. Kindt, J.J.B. Keurentjes, L. van der Sluis, L.C. van Loon and P.A.H.M. Bakker. 2003. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strain that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* **93**:626-632.
- Dopson, M., C.B. Austin, P. R. Koppineedi and P. L. Bond. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* **149**:1959–1970.

- Duffy, B. K., and G. Défago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2429-2438.
- Duffy, B. K., C. Keel and G. Défago. 2004. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1836-1842.
- Engelhard, A. W. 1989. *Soilborne plant pathogens: management of diseases with macro- and microelements*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
- Fahy, P. C. and A. C. Hayward. 1983. *Media and Methods for Isolations and Diagnostic Test. In: Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide*. Eds. Fahy P.C. and G. J. Persley. New York. Academic Press. p. 337-374
- Goto. M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Acad. Press. Inc., Tokyo, Japan.
- Jo Handelsman dan E.V. Stabb, 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* **8**:1855-1869.
- Kazempour, M. N. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology Journal* **3**:88-96
- Klement, Z. 1990. Introduction and General Instruction. In: Klement, Z. , K. Rudolph and D. C. Sands. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kado. Budapest.
- Kloepper, J. W. 1993. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents*. Auburn University. Alabama.
- Poole, K and G. A. McKay. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: Many roads lead to Rome. *Frontiers in Bioscience* **8**: 661-686.
- Schaad, N., J. Jones, W. Chun. (eds). 2001. *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Edition*. APS Press.
- Schnider, U., C. Keel, C. Blumer, J. Troxler, G. Défago, and D. Haas. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* **177**:5387-5392
- Semangun, H. 1991. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Sigee, D. C. 1993. *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspect*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Weinberg, E. D. 1977. *Mineral Element Control of Microbial Secondary Metabolism*. In E. D. Weinberg (ed.), *Microorganisms and minerals*. Marcel Dekker, New York, N.Y.