

AKTINOMISETES KHITINOLITIK DAN PROTEOLITIK SEBAGAI AGEN PENGENDALIAN HAYATI NEMATODA SISTA KUNING (*Globodera rostochiensis*)

Agustinus Joko Nugroho

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI
Jln. Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Kompleks Cibinong Science Center
e-mail: agusjokoid@yahoo.com

ABSTRACT

Golden cyst nematode (GCN/Globodera rostochiensis) is a new potato parasitic nematodes found in Indonesia in 2003 and caused great economic losses more than 70% of the production. Due to the problem caused by chemically control (resistancy, killed non target organisms, and environment pollution) development of alternative control measures is a great importance i.g. microbial control. The purpose of this research was to find chitinolytic and proteolytic actinomycetes for controlling eggshell nematode which bears vitelin (protein) and chitin. The result found 21 actinomycetes isolates with ratio chitinolytic and proteolytic activities more than 3.0 and among of seven isolates were chitinolytic, 11 isolates were proteolytic and three isolates had double enzyme activities. Seven selected isolates were examined on their chitinase and protease specific activities and ability to degrade nematode eggs. The results showed three isolates had chitinase activity more than 200 IU/mg, four isolates had protease activity more than 300 IU/mg. Results of the bioassay test using crude enzyme on the GCN eggs found that three isolates were able to damage eggs more than 90%. The three isolates can be applied as an agent for biocontrol of GCN in the future.

Keywords: Actinomycetes, Chitinolytic, Proteolytic, *Globodera rostochiensis*, Biocontrol.

PENDAHULUAN

Nematoda Sista Kuning (*Globodera rostochiensis*) di Indonesia sejak tahun 2003 mengundang perhatian berbagai pihak, baik pemerintah pusat dan daerah maupun petani. Nematoda Sista Kuning (NSK) merupakan “hama kentang baru”¹ dan menurut Daftar Organisme Pengganggu Tanaman Karantina termasuk A1, berarti tidak boleh ada di Indonesia.^{2,3} Kerugian ekonomi akibat serangan NSK dapat mencapai 70% produksi dan nematoda ini mampu membentuk sista yang bertahan hidup lebih dari 10 tahun. Terlebih lagi tiap nematoda betina mampu memproduksi telur sekitar 200–500 butir.^{4,5,6}

Hasil survei menunjukkan bahwa NSK ditemukan di Kota Batu (Jawa Timur) Kabupaten Banjarnegara dan Wonosobo (Jawa Tengah) serta Kabupaten Karo (Sumatra Utara). Populasi NSK relatif tinggi ditemukan di Kecamatan Bumiaji, Kota Batu, lebih dari 100 sista/20 g tanah dan

di Kecamatan Batur Banjarnegara, lebih dari 40 sista/20 g tanah.⁷ NSK juga tersebar luas di sentra-sentra produksi kentang daerah subtropika dan tropika seperti Inggris, Amerika, Eropa, Jepang, Afrika Selatan, India, Pakistan, dan Filipina.^{4,5,6} Di luar negeri, pengendalian NSK diutamakan dengan menanam varietas kentang tahan serangan nematoda dan pergiliran tanaman selain famili Solanaceae. Hal ini dikarenakan NSK mempunyai inang spesifik (*host*), yaitu Solanaceae (cabai, tomat, terung, dan gulma). Undang-Undang Budi Daya Tanaman No. 12 Tahun 1998 mengamanatkan bahwa pengendalian hama dan penyakit tanaman ditempuh melalui teknik pengendalian secara terpadu.

Pengendalian NSK dapat dilakukan secara khemis (nematisida), biologis (pemanfaatan jamur, bakteri atau aktinomisetes) ataupun pergiliran tanaman. Garabedian dan Van Gundy⁸ melaporkan bahwa *Streptoverticillium albi-*

reticuli menghasilkan avermectins, golongan senyawa lactone makrosiklik yang bersifat nematisidal (anthelmintiks). *Avermectins* berhasil dipakai untuk mengendalikan *Meloidogyne incognita* dengan efektivitas 10 kali lebih tinggi daripada nematisida *Oxamyl* dan *Aldicarb* dalam memberantas NSK. *Pasteuria penetrans*, jamur yang sporanya dapat melekat pada kutikula larva *Meloidogyne* stadium-2, dapat menembus dinding larva menggunakan hostoria dan mematikan larva.⁹ *Hirsutella rhossiliensis* dan *H. minnesotensis* adalah jamur penyerang nematoda yang melekatkan spora pada kutikula nematoda stadium infeksi. *Arthrobotrys dactyloides* dan *A. brochophaga* merupakan jamur penangkap nematoda yang menggunakan alat perangkap berbentuk cincin, modifikasi miselium.^{10,11,12,13} Tikhonov *et al.*¹⁴ melaporkan bahwa jamur *Verticillium chlamydosporium* dan *V. suchlassporium* dapat merusak kulit telur nematoda sista putih, *Globodera pallida*, menggunakan khitinase dan protease yang dihasilkannya. Kulit telur nematoda memiliki lapisan khitin dan vitelin (protein). Jika lapisan ini rusak (oleh khitinase dan protease) maka telur dapat pecah atau menetas prematur sehingga viabilitas larva menurun.¹⁵

Aktinomisetes dilaporkan menghasilkan beberapa macam enzim khitinase, protease, xilanase, lipase, dan selulase, yang dapat merusak organ dan telur nematoda.^{16,17} Aktivitas khitinase dilaporkan mampu menghancurkan kutikula nematoda dewasa dan khitin pada telur.¹⁷ Gomes *et al.*¹⁸ menunjukkan bahwa khitinase aktinomisetes memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan khitinase di pasaran. Potensi aktinomisetes sebagai agen pengendalian NSK juga didukung oleh kemampuannya menghasilkan antibiotik seperti streptomisin, neomisin, kloramfenicol, dan tetrasiklin yang membantu survival aktinomisetes di lingkungan.¹⁹

Aktinomisetes dalam genus *Streptomyces*, *Nocardia*, *Microsomonas*, *Actinoplanes*, dan *Streptosporangium* mampu menghasilkan enzim khitinase dan protease.²⁰ Kemampuan mikrobia dalam menghasilkan enzim khitinase atau/ dan protease dapat digunakan sebagai agensia pengendali nematoda puru akar.^{21,22} Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat-isolat

aktinomisetes khitinolitik dan proteolitik yang mampu merusak telur NSK melalui isolasi dan seleksi dari habitat aslinya.

BAHAN DAN METODE

Sumber isolat diperoleh dari beberapa bahan dan lokasi, yaitu inokulum kompos komersial (Stardec) dan inokulum kompos buatan; Limbah jamur *Ganoderma lucidum* dari daerah Pare (Kediri); Limbah udang pabrik petis dari Kecamatan Prambon, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur, dan dari Desa Sareman Bantul; serta Tanah *rhizosphere* tanaman solanaceae di Kecamatan Wonocatur (Yogyakarta), dari Kecamatan Tulung, Kecamatan Klaten Utara, dan Kecamatan Ngawen (kabupaten Klaten).

Isolasi aktinomisetes khitinolitik dan proteolitik. Sebelas gram sampel dari masing-masing sumber isolat dilarutkan dalam 99 ml aquadest steril dan dibuat seri pengenceran sampai dengan 10^{-6} . Sebanyak 0,1 ml suspensi (pengenceran 10^{-3} – 10^{-6}) diinokulasikan pada medium agar. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 7 hari (khitinolitik) dan 3 hari (proteolitik). Pertumbuhan koloni diamati secara visual dan mikroskopis. Isolat aktinomisetes yang tumbuh terpisah dan memiliki zona hidrolisis di sekeliling koloni (lingkaran jernih di sekitar koloni), diisolasi dan dipindahkan ke medium agar miring untuk penelitian selanjutnya. Komposisi medium yang digunakan adalah (g/l): K_2HPO_4 - 0,7; KH_2PO_4 - 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,01; $ZnSO_4$ - 0,001; $MnCl_2$ - 0,001; Agar - 20; dan sumber C yang ditambahkan koloidal khitin 0,2% dan skim milk 1%. Preparasi khitin atau pembuatan koloidal khitin dilakukan menurut metode Vessey and Pegg.²³

Seleksi isolat aktinomisetes. Seleksi secara kualitatif dilakukan berdasarkan daya hidrolitik²⁴ dan secara kuantitatif berdasarkan aktivitas spesifik enzim. Isolat yang memiliki nilai daya hidrolitik lebih dari 4,0 diseleksi berdasarkan aktivitas spesifik enzimnya. Isolat yang terseleksi kemudian ditumbuhkan dalam medium cair dengan jumlah inokulum 5% (v/v), pH 6,7, diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 72 jam dan suhu 30°C.

Pengukuran aktivitas enzim khitinase merujuk pada Harman *et al.*²⁵ Pengukuran

aktivitas enzim protease dilakukan memakai reaksi campuran *crude enzyme* dan casein menurut Marco dan Felix.²⁶ Substrat disiapkan dengan membuat 480 µl larutan 2% casein (b/v) dalam 20 mM buffer fosfat pH 7, kemudian ditambahkan *crude* enzim 120 µl, dan diinkubasi pada shaker inkubator suhu kamar, 30 menit. Kemudian ditambahkan 600 µl larutan TCA 10%, dan diinkubasi pada es 30 menit, selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit, supernatan diambil 800 µl dan ditambahkan 1,8 N NaOH sebanyak 200µl. Satu unit aktivitas enzim protease adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis casein sehingga meningkatkan nilai OD₂₈₀ sebesar 1%. Sementara aktivitas spesifik protease adalah U/mg protein. Penentuan kadar protein total ditentukan dengan Protein Assay (Bio Rad), USA.

Produksi dan pemanenan enzim dilakukan menurut Kamel *et al.*²⁷ dan Singh *et al.*²⁸ Isolat aktinomisetes khitinolitik dan proteolitik masing-masing ditumbuhkan dalam 20 ml medium cair {khitin 0,2% (b/v), skim milk 1% (b/v)} dengan pH 6,7. Medium diinokulasi biakan 5% (v/v), dan diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 72 jam dan suhu 30°C. Kerapatan sel inokulum adalah 1×10^7 /ml konidia dari miselium udara aktinomisetes. Enzim dipanen dengan menyentrifugasi medium kultivasi pada 4000 rpm, suhu 4°C, selama 20 menit. Supernatan disimpan pada suhu 0°C untuk pengujian lebih lanjut.

Bioassay crude enzyme dilakukan berdasarkan Tikhonov *et al.*¹⁴

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Aktinomisetes Khitinolitik dan Proteolitik

Hasil isolasi aktinomisetes menghasilkan 84 isolat (Tabel 1). Dominasi isolat berasal dari limbah udang sebanyak 38 isolat dan diikuti oleh lingkungan *rhizosphere* tanaman famili Solanaceae. Sementara sumber isolat lain tidak banyak ditemui isolat yang sesuai harapan. Tingginya isolat yang diperoleh dari limbah udang adalah sesuai dengan sifat limbah yang kaya mengandung khitin yang berasal dari kulit udang. Di daerah *rhizosphere* tanaman famili Solanaceae banyak ditemukan aktinomisetes khitinolitik yang dapat mengindikasikan Penyerangan oleh nematoda puru akar terhadap tanaman di persawahan, lebih-lebih jika penanamannya sudah berulang kali. Menurut Waksman,²⁹ tanah daerah *rhizosphere* tanaman dan kompos adalah habitat yang memiliki jumlah aktinomisetes melimpah. Pada daerah *rhizosphere* tanaman ditemukan aktinomisetes dengan jumlah dua kali lipat³⁰ atau bahkan tiga kali lipat³¹ dibandingkan dengan di daerah non-*rhizosphere*. Ditemukannya aktinomisetes pada kompos adalah karena kelompok aktinomisetes ini banyak ditemukan di alam sebagai saprofit dan mampu memanfaatkan ber-

Tabel 1. Hasil isolasi aktinomisetes khitinolitik dan proteolitik

Jenis Sampel	Jumlah isolat Aktinomisetes
Tanah sawah	34
Inokulum kompos	7
Limbah jamur	5
Limbah udang	38
Total isolat	84

Tabel 2. Aktivitas khitinase dan protease isolat Aktinomisetes terpilih

No	Kode Isolat	Aktivitas Khitinase			Aktivitas Protease		
		Akt. Enzim (U/ml)	Akt. Spesifik (U/mg)	Berat Kering Sel (mg/ml)	Akt. Enzim (U/ml)	Akt. Spesifik (U/mg)	Berat Kering Sel (mg/ml)
1	IKSM	10,37	223,80	1,76	5,22	441,17	3,19
2	LPS 27	4,05	230,77	1,54	43,33	136,76	4,34
3	LPS 36	3,63	144,22	2,03	26,67	366,24	3,33
4	LPS 47	4,23	206,96	2,27	56,67	462,75	4,57
5	LUBD 4	4,47	46,72	1,16	56,67	224,84	4,25
6	TSTL 8	4,60	55,61	3,04	65,00	370,50	4,54
7	TSTL 10	8,70	15,85	1,12	41,67	286,21	3,76

Tabel 3. Hubungan antara daya hidrolitik, aktivitas enzim, dan kerusakan telur NSK (*Globodera rostochiensis*)

No	Isolat Aktinomisetes	Daya hidrolitik		Aktivias spesifik		Kerusakan telur (%)		
		khitin	protein	Khitinase (U/mg)	Protease (U/mg)	khitinase	protease	khitinase + protease
1	IKSM	5,70	4,10	223,80	441,17	85,26	50,43	93,54
2	LPS 27	5,70	1,1	230,77	136,76	61,83	62,93	91,12
3	LPS 36	3,00	3,30	144,22	366,24	59,31	23,21	76,25
4	LPS 47	4,30	5,50	206,96	462,75	78,72	63,07	92,56
5	LUBD 4	1,1	4,70	46,72	224,84	80,17	44,44	70,48
6	TSTL 8	1,1	4,90	55,61	370,50	58,33	23,07	74,35
7	TSTL10	2,70	3,10	151,85	286,21	39,33	24,80	86,10

bagai sumber karbon serta tahan pada perubahan temperatur ke arah termotoleran.³²

Isolat-isolat yang berasal dari tanah sawah atau tanah daerah *rhizosphere* tanaman memiliki aktivitas hidrolisis kecil. Hal ini terjadi karena tanah tersebut mengandung sisa-sisa khitin yang sangat sedikit dan protein atau di lingkungan tanah tersebut lama tidak mengalami eksplosif serangan hama penyakit yang berasal dari jamur, serangga ataupun nematoda. Oleh karena itu, kondisi ini kurang mendukung perkembangan aktinomisetes khitinolitik dan proteolitik.

Seleksi Aktinomisetes Khitinolitik dan Proteolitik

Daya hidrolitik yang dianggap mewakili aktivitas enzim ditetapkan atas dasar nilai rasio > 3 dan diperoleh 7 isolat bersifat khitinolitik, 11 isolat bersifat proteolitik, dan 7 isolat di antaranya memiliki kemampuan enzimatik ganda, yakni khitinolitik dan proteolitik.

Empat isolat dari 7 isolat yang memiliki kemampuan enzimatik ganda adalah IKSM, TSTL 10, LPS 36, dan LPS 47 yang memberikan pengharapan dalam aplikasi sebagai agen pengendalian hayati NSK di masa depan.

Hasil uji aktivitas khitinase dan protease isolat IKSM, LPS 27, dan LPS 47 menghasilkan aktivitas enzim spesifik yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya, sedangkan isolat LUBD 4 dan TSTL 8 memiliki aktivitas enzim jauh lebih kecil (Tabel 2). Hasil ini sejalan dengan daya hidrolitik yang mereka hasilkan pada uji tahap pertama. Aktivitas khitinase dan protease, berturut-turut adalah IKSM (223,80 U/mg dan 441,17 U/mg), LPS 27 (230,77 U/mg dan 136,76 U/mg), dan LPS 47 (206,96 U/mg dan 462,75 U/mg). Kamel *et al.*²⁷ melaporkan

bahwa *Streptomyces* CU 105 yang ditumbuhkan dalam khitin sebagai sumber karbon selama 3 hari memiliki aktivitas khitinase 62 U/ml, sedangkan isolat terpilih jauh lebih tinggi selain LUBD 4 dan TSTL 8.

Bioassay Crude Enzyme

Dalam merusak telur NSK, isolat aktinomisetes IKSM, LPS 27, dan LPS 47 memiliki prospek terbaik karena mampu merusak telur, berturut-turut 93,54%, 91,12% dan 92,56% dengan menggunakan campuran supernatan yang mengandung ekstraseluler enzim khitinase dan protease (Tabel 3). Kemampuan ini lebih besar bila dibandingkan dengan perlakuan tunggal masing-masing enzim. Untuk itu isolat IKSM, LPS 27, dan LPS 47 merupakan kandidat sebagai agen pengendali NSK dari kelompok aktinomisetes. Aplikasi ketiga isolat tersebut memiliki keuntungan di skala industri karena memiliki dua macam enzim sehingga perbanyakkan biomasnya lebih ekonomis.

Hasil *bioassay* enzim kasar (*crude enzyme*) terhadap telur nematoda menunjukkan bahwa kerusakan yang ditimbulkan oleh perlakuan khitinase lebih besar dibandingkan dengan perlakuan protease, namun telur yang diperlakukan dengan kedua macam enzim memberikan kerusakan mendekati 100%.

Zdenka *et al.*³³ melaporkan bahwa telur nematoda *Huffmanella huffmanii* (Trichosomodidae) memiliki komposisi yang terdiri atas lapisan vitelin (protein) dan khitin. Vitelin adalah lapisan luar dan tipis, sedangkan lapisan khitin cukup tebal dan berada pada lapisan dalam sesudah vitelin. Kerusakan telur akan menjadi lebih besar apabila telur nematoda diperlakukan dengan campuran khitinase dan protease. Hasil peneli-

tian ini juga diperkuat oleh peneliti sebelumnya yang melaporkan bahwa aktinomisetes dapat menghasilkan enzim khitinase, protease, lipase, dan selulase yang juga dapat merusak organ dan telur nematoda.^{16,17} Tikhonov *et al.*¹⁴ melaporkan bahwa jamur *Verticillium chlamydosporium* dan *V. suchlassporium* mampu menghasilkan khitinase dan protease yang dapat merusak kulit telur nematoda sista putih, *Globodera pallida*. Kulit telur nematoda memiliki lapisan khitin dan vitelin (protein). Apabila lapisan ini kontak dengan larutan enzim khitinase dan protease maka telur dapat rusak/pecah atau menetas prematur sehingga menurunkan viabilitas larva.¹⁵

KESIMPULAN

Dari penelitian ini berhasil diisolasi 84 isolat aktinomisetes khitinolitik dan proteolitik dari inokulum kompos, limbah udang, limbah jamur, dan lingkungan *rhizosphere* tanaman solanaceae. Tiga isolat mampu merusak telur NSK mendekati 100%, sehingga isolat tersebut merupakan kandidat prospektus dalam aplikasinya untuk mengendalikan hama kentang NSK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Sebastian Margino (Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta) yang telah membimbing dan memberikan masukan selama pelaksanaan penelitian. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Gono Semiadi (Puslit Biologi LIPI) yang telah memberikan bimbingan penulisan serta saran dan masukan dalam penulisan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

¹Mulyadi, B. Rahayu T. P., B. Triman, dan S. Indarti. 2003. Identifikasi Nematoda Sista Kuning (*Globodera rostochiensis*) pada Kentang di Kota Batu Jawa Timur. *J. Perlindungan Tanaman Indonesia* 9(1): 46–53.

²Soeroto. 2003. Strategi Perbenihan dalam Pengendalian Nematoda *Globodera rostochiensis* pada Tanaman Kentang. *Seminar Nasional Penanggulangan Globodera rostochiensis*. Jakarta, 3 April 2003: Direktorat Perlindungan Tanaman Hortikultura.

³Daryanto. 2003. Program Penanggulangan Nematoda Sista Kentang (*Globodera rostochiensis*). *Seminar Nasional Penanggulangan Globodera rostochiensis*. Jakarta, 3 April 2003: Direktorat Perlindungan Tanaman Hortikultura.

⁴Jatala, P. dan J. Bridge. 1990. Nematode Parasites of Root and Tuber Crops. In M. Luc, R. A. Sikora, dan J. Bridge. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Wallingford: CAB Intl., p. 137–180.

⁵Brodie, B. B., K. Evans, dan J. Franco. 1993. Nematode Parasites of Potatoes. In K. Evans, D.L. Tridgill, and M. Webster. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*: 87–132. Wallingford: CAB International.

⁶Singh, R. S. dan K. Sitaramaiah. 1993. Plant Pathogens. *The Plant Parasitic Nematodes*: 320. USA: Sci. Publish. Inc.

⁷Mulyadi, B. Rahayu T. P., B. Triman, dan S. Indarti. 2003. Survei Keberadaan Nematoda Sista Kuning (*Globodera rostochiensis*) di Beberapa Sentra Produksi Kentang di Indonesia. *Kongres XVII dan Seminar Ilmiah Nasional PFI*. Bandung, 6–8 Agustus 2003: UNPAD.

⁸Garabedian, S. dan S. D. Van Gundy. 1983. Use of Avermectins for the Control of *Meloidogyne Incognita* on Tomato. *J. of Nematology* (15): 503–510.

⁹Darban, D.A., B. Pembroke, dan S. R. Gowen. 2004. The relationship of time and temperature to body weight and numbers of endospores in *Pasteuria penetrans* infected *Meloidogyne javanica* females. *Nematology* 6(1): 33–36.

¹⁰Meyer, S.L.F., R.N. Huettel, X.Z. Liu, R.A. Humber, J. Juba, dan J.K. Nitao. 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology* 6(1): 23–32.

¹¹Morton, C.O., P.R. Hirsch dan B.R. Kerry. 2004. Infection of plant parasitic nematodes by nematophagous fungi a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6(2): 161–170.

¹²Trotter, J.R., D.A. Darban, S.R. Gowen, A. H. Bishop, dan B. Embroke. 2004. The isolation of single spore isolate of *Pasteuia penetrans*, and its pathogenicity on *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 6(4): 463–471.

¹³Thomas, R.F.K., dan A. Baudena. 1999. Nematode-trapping fungi provide a new approach to control equine nematodes. *Newsletter* 7(1): 1–5.

- ¹⁴Tikhonov, V.E., L.V. Lopez-Llorca, J. Salinas, dan H. Jansson. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlassporium*. *Fungal Genetic and Biology* (35): 67–78.
- ⁵Mercer, C.F., D.R. Greenwood, dan J.L. Grant. 1992. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chidwood. *Nematologica* 8: 227–236.
- ¹⁶Park, J.O., K.A. El-Tarabily, E.L. Ghisalberti dan K. Sivastithamparam. 2002. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology* (35): 361–365.
- ¹⁷Miller, P.M., dan D.C. Sands. 1977. Effect of hydrolytic enzymes on plant parasitic nematodes. *J. of Nematology* (9): 192–197.
- ¹⁸Gomes, R.C., L.T.A.S. Semedo, R.M.A. Soares, C.S. Alviano, L.F. Linhares dan R.R.R. Coelho. 2000. Chitinolytic activity of Actinomycetes from Cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* 30: 146–150.
- ¹⁹Keiser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater, dan D.A. Hopwood. 2000. *General introduction to Actinomycetes biology*. In: *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, England. p. 1–21.
- ²⁰Alexander, M. 1990. *Introduction to Soil Microbiology*. Second edition. New York: John Willey and Sons.
- ²¹Mohamed, M.A. dan M.A. Hussein. 2007. Purification and characterization of an Alkaline Protease Produced by the Bacterium *Xenorhabdus nematophila* BA2, a Symbion of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*. *Res. J. Agric & Biol. Sci.*, 3 (5): 510–521.
- ²²Hirano, S. dan N. Nagao. 1989. Effect of Chitosan, Pectic Acid, Lysozyme and Chitinase on the Growth of Several Phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* 53: 3065–3066.
- ²³Vessey, J.C., and G.F. Pegg. 1973. Autolysis and Chitinase Production in Cultures of *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 60: 133–143.
- ²⁴Putro, S. 1987. Fermentasi Limbah Udang dengan Mikroorganisme Chitinoclastic. Dalam: *Bioproses dalam Industri Pangan*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Liberty. Yogyakarta.
- ²⁵Harman, G.E., C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer dan A. Tron-smo. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. *Phytopathology* 83: 313–318.
- ²⁶Marco, J.L., dan C.R. Felix. 2002. Characterization of a protease produced by *Trichoderma harzianum* isolate which control cocoa plant witchis' broom disease. *BMC Biochemistry* 3. 1–7.
- ²⁷Kamel, Z., N. Heikel dan F. Fahmy. 1993. Extracellular Chitinase from *Streptomyces* sp. and Its Antifungal Activity. *Acta Pharmaceutica Turcica* 35: 135–143.
- ²⁸Singh, P.P., Y.C. Shin, C.S. Park dan Y.R. Chung. 1999. Biological Control of *Fusarium* Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology* 89: 92–99.
- ²⁹Waksman, S.A. 1967. *The Actinomycetes, A Summary of Current Knowledge*. New York: The Ronald Press Company.
- ³⁰Crawford, D.L., J.M. Whipps dan M.A. Ousley. 1993. Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonist of A Fungal Root Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3899–3905.
- ³¹Sembiring, L. 2000. *Selective Isolation and Characterization of Streptomyces Associated with the Rhizosphere of the Tropical Legume, Parasarianthes falcataria (L) Nielsen*. Ph.D. Thesis. University of Newcastle Upon Tyne. United Kingdom.
- ³²McCarthy, A.J. dan S.T. Williams. 1992. Actinomycetes as Agent of Biodegradation in the Environment—A Review. *Gene* 115: 189–192.
- ³³Zdenka Z., D.G. Huffman, F. Moravec, dan J. Nebesarova. 2001. Egg Shell Ultrastructure of the fish nematode *Huffmanella huffmanii* (Trichosomoidae). *Folia Parasitologia* 48: 231–234.