

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN TESIS

JUDUL: PEMENCILAN BAKTERIA ENDOFIT DARIPADA *Camellia sinensis* L. UNTUK UJIAN AKTIVITI ANTIMIKROB DAN KESAN TERHADAP PERTUMBUHAN *Amaranthus sp.*

IJAZAH: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS PERTANIAN

SAYA: NORASTIKIN SABUDIN
(HURUF BESAR)

SESI PENGAJIAN: 2010 / 2011

Mengaku membenarkan tesis * (LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh:
NORAZLYNN MOHD JUNAN @ JACKLYN
PUSTAKAWAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Drij
(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: NO. 33 KAMPUNG
SRILAMBAK, JALAN ABDULLAH
86000 KUANG, JOHOR

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

CLAMENT CHIN FUI SEUNG
Penyelidik
Sekolah Pertanian Lestari
Universiti Malaysia Sabah

TARIKH: 17 / 01 / 2014

(NAMA PENYELIDIK)
TARIKH: 17 / 01 / 2014

Catatan:

*Potong yang tidak berkenaan.

*Jika tesis ini SULIT dan TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

*Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana Secara Penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



**PEMENCILAN BAKTERIA ENDOFIT DARIPADA *Camellia sinensis* L.
UNTUK UJIAN AKTIVITI ANTIMIKROB DAN KESAN TERHADAP
PERTUMBUHAN *Amaranthus* sp.**

NORASHIKIN BINTI SABUDIN

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
PERTANIAN DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM PENGETAHUAN TANAMAN
SEKOLAH PERTANIAN LESTARI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2014**



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya mengakui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya. Saya juga mengakui bahawa disertasi ini tidak pernah atau sedang dihantar untuk perolehi ijazah dari universiti ini atau mana universiti yang lain.



NORASHIKIN BINTI SABUDIN

BR10110056

14 DISEMBER 2013

DIPERAKUKAN OLEH

1. En. Clament Chin Fui Seung

PENYELIA



CLAMENT CHIN FUI SEUNG

Lecturer

School Of Sustainable Agriculture
Universiti Malaysia Sabah

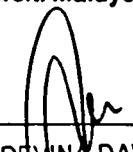
2. Prof. Madya Dr. Markos Atong

PEMERIKSA 1

.....
PROF. MADYA DR. MARKUS ATONG

Penyayrah

Sekolah Pertanian Lestari
Universiti Malaysia Sabah



3. Puan Devina David

PEMERIKSA 2

DEVINA DAVID

Penyayrah/ Penasihat Akademik
Sekolah Pertanian Lestari
Universiti Malaysia Sabah

4. Prof. Madya Dr. Sitti Raehanah Binti Muhammad Shaleh

DEKAN



SEKOLAH PERTANIAN LESTARI

PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi puji dan syukur kehadrat Allah SWT kerana dengan rahmat dan izin-Nya, kajian ini dapat dilaksanakan dengan sempurna. Saya ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan ribuan terima kasih kepada penyelia projek yang saya hormati, En. Clament Chin Fui Seung yang telah banyak membimbing, membantu serta memberi tunjuk ajar kepada saya sepanjang kajian ini dijalankan.

Saya juga ingin berterima kasih kepada pihak Sekolah Pertanian Lestari kerana telah menyediakan bahan-bahan dan tempat untuk saya menjalankan kajian ini. Penghargaan ini juga saya tujukan kepada staf-staf dan pembantu makmal, Encik Panjiman, Puan Ajiah dan Puan Anika kerana telah banyak menolong dalam penyediaan alatan-alatan makmal untuk saya menjalankan kajian ini.

Setinggi penghargaan juga saya tujukan kepada ayahanda, Sabudin bin Manap dan bonda, Jummah binti Sahar kerana tidak putus-putus memberi sokongan dan dorongan sepanjang tempoh kajian ini dijalankan. Tidak lupa juga kepada sahabat saya Nur Pazillah Acho, Iylia Huzaifah Zamri, Nur Fairuz Abd Rahman, Nurul Amira Abd Aziz serta sahabat-sahabat lain yang banyak membantu dan memberi tunjuk ajar dalam tempoh pelaksanaan kajian ini.

Akhir penulisan, jutaan terima kasih diucapkan sekali lagi kepada semua sahabat dan rakan seperjuangan saya serta pihak-pihak yang terlibat, sama ada secara langsung ataupun tidak langsung dalam tempoh saya menyiapkan kajian ini.

ABSTRAK

Endofit adalah mikroorganisma yang berada di dalam perumah tumbuhan, mereka mengkoloni tisu tumbuhan yang berada di bawah lapisan sel epidermis tanpa menyebabkan sebarang kemudaratan yang jelas atau jangkitan kepada perumah, ia hidup di dalam ruang intersetular tisu dan boleh menembusi sel hidup yang lain. Kebanyakan kajian terdahulu menyatakan tumbuhan yang menjadi perumah kepada mikrob endofit akan rintang kepada pelbagai jenis patogen kerana mikrob ini berupaya menghasilkan antibiotik. Selain itu, mikrob endofit juga akan menjadi penggalak pertumbuhan pokok. Kajian ini dibuat untuk mengkaji kehadiran bakteria endofit di dalam pokok *Camellia sinensis* dan mengkaji aktiviti antimikrobial daripada bahan yang dihasilkan oleh bakteria tersebut. Sampel daripada daun, batang, dan akar *Camellia sinensis* L. telah dipencarkan dan dieramkan di agar nutrient. Ciri-ciri morfologi makroskopik telah di kenalpasti. Terdapat 21 bakteria endofit telah dipencarkan. Berdasarkan hasil kajian, hanya 9 bakteria endofit yang boleh merencat pertumbuhan *Ganoderma boninense* dan 3 boleh merencat pertumbuhan penyakit akar merah. B17-B dan B21-A menunjukkan perencatan yang tinggi. Selain itu, B21-A boleh menghasilkan asid indole asetik yang tinggi iaitu, $46.37 \mu\text{g/ml}$. Kajian ini juga mengkaji kesan bakteria endofit terhadap tumbesaran bayam hijau (*Amaranthus* sp.). Pada hari ke-25 pokok bayam yang diberi rawatan B16-B dan B21-A menunjukkan tumbesaran pokok bayam yang paling tinggi iaitu 10.45 cm. Seterusnya B8-T, B12-T, B13-A dan B21-A diekstrak untuk melihat kedudukan bahan aktif yang dihasilkan oleh bakteria tersebut menggunakan kromatografi lapisan nipis, hasil nilai R_f adalah $0.16 \pm 0.271a$, $0.48 \pm 0.047ab$, $0.51 \pm 0.050ab$ dan $0.56 \pm 0.050c$.

ISOLATION and CULTIVATION of ENDOPHYTIC BACTERIA from Camellia sinensis L. for ANTIMICROBIAL ACTIVITY and EFFECT PERFORMANCE GROWTH on Amaranthus sp.

ABSTRACT

Endophytes are microorganisms that inhabit plant host for all part of their life cycle. They colonize the internal plant tissues beneath the epidermal cell layers without causing any apparent harm or symptomatic infection to their host, living within the intercellular spaces of the tissues and it seems that they may penetrate the living cell. Most of the previous studies state that, plant which becomes host to endophytic microbe will be resistance to various pathogens because the microbe was able to produce antibiotic substance. Besides, endophytic bacteria also will promote plant growth. This study aims to investigate the presence of endophytic bacteria from C. sinensis and look for antimicrobial activity of the substances that released by the bacteria. The sample leaves, stem and root were isolated and cultivated on Nutrient Agar (NA). The characteristics and morphology of endophytic bacteria was identified. There are 21 endophytic bacteria were isolated. Based on the results, only 9 endophytic bacteria that can inhibit the growth of Ganoderma boninense and 3 can inhibit the growth of red root disease. B17-B and B21-B-A showed high inhibition. In addition, B21-A can produce indole acetic acid at a high production, 46.37 µg /ml. The study also examined the impact of the endophytic bacteria on the performance growth of green spinach (Amaranthus sp.). On the 25th day the spinach plants treated with B16 and B21-B-A showed the higher growth which is 10.45cm. Next, B8-T, B12-T, B13-A and B21-A is extracted to see the active substance produced by bacteria using thin layer chromatography (TLC), the result for Rf are $0.271a \pm 0.16$, $0.48 \pm 0.047ab$, $0.51 \pm 0.050ab$ and $0.56 \pm 0.050c$ respectively.

ISI KANDUNGAN

Kandungan

PENGAKUAN	
DIPERAKUI OLEH	
PENGHARGAAN	
ABSTRAK	
<i>ABSTRACT</i>	
ISI KANDUNGAN	
SENARAI JADUAL	
SENARAI RAJAH	
SENARAI RINGKASAN NAMA, SIMBOL DAN UNIT	
SENARAI FORMULA	

Muka Surat

ii
iii
iv
v
vi
vii
ix
x
xi
xii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan	1
1.2 Justifikasi	3
1.3 Objektif Kajian	3
1.4 Hipotesis Kajian	4

BAB 2 KAJIAN PERPUSTAKAAN

2.1 Morfologi dan Klasifikasi <i>Camellia sinensis</i> L.	5
2.2 Endofit Bakteria	6
2.3 Penyukatan Aktiviti Antimikrob	7
2.4 Interaksi antara Bakteria Endofit dengan Perumah	8
2.5 Kesan Bakteria Endofit Terhadap Tumbuhan	9
2.6 Faktor-Faktor Fizik yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroorganisma	
2.6.1 Suhu	10
2.6.2 Oksigen	10
2.6.3 pH	11
2.6.4 Tekanan Osmosis	11
2.6.5 Tekanan Hidrostatik	12
2.7 Faktor-Faktor Kimia yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroorganisma	
2.7.1 Sumber Tenaga dan Karbon	12
2.7.2 Sumber Mineral Utama	13
2.7.3 Keaktifan Air	13
2.8 Organisma Ujian	
2.8.1 Kulat <i>Ganoderma boninense</i>	13
2.8.2 <i>Ganoderma philippii</i>	15
2.9 Ciri-Ciri Morfologi Koloni Bakteria yang Tumbuh di atas Plat Agar	15

BAB 3 METODOLOGI

3.1 Jangka Masa	18
3.2 Lokasi	18
3.3 Pengumpulan Sampel	18
3.4 Kajian di Makmal	
3.4.1 Pengeraman Bakteria Endofit	19
3.4.2 Pemerhatian Morfologi	19
3.4.3 Mengenal Pasti Bakteria yang Mempunyai Aktiviti Antimikrob	19
3.4.4 Penghasilan Asid Indol Asetik (IAA)	20

3.4.5	Mengenalpasti Bakteria Endofit yang Mengikat Nitrogen dan Solubilizing Fosfat	20
3.4.6	Penapaian dan Penyediaan Ekstrak	21
3.4.7	Pemisahan Bahan Aktif Bakteria Endofit	21
3.5	Ujian di Ladang	
3.5.1	Menguji Tumbesaran Pokok Bayam Hijau (<i>Amaranthus sp.</i>)	21
3.5.2	Parameter	22
3.6	Analisis Statistikal	22
 BAB 4 KEPUTUSAN		
4.1	Kajian di Makmal	
4.1.1	Pemencilan Bakteria Endofit	23
4.1.2	Ciri-ciri Bakteria Endofit	24
4.1.3	Pengenalpastian Bakteria yang Mempunyai Aktiviti Antimikrob Terhadap <i>Ganoderma boninense</i> dan Penyakit Akar Merah	24
4.1.4	Bakteria Endofit yang boleh Mengikat Nitrogen dan Sebagai Pelarut Fosfat	25
4.1.5	Penghasilan Asid Indol Asetik (IAA) oleh Bakteria Endofit	26
4.2.6	Pemisahan Bahan Aktif Bakteria Endofit Melalui Kromatografi Lapisan Nipis.	28
4.2	Kajian di Ladang	
4.2.1	Ketinggian Pokok Bayam Hijau	27
4.2.2	Jumlah Berat kering Bayam Hijau	28
4.2.3	pH tanah dan Keupayaan pertukaran Kation, CEC	29
 BAB 5 PERBINCANGAN		
5.1	Pemilihan sampel	38
5.2	Pemencilan Bakteria Endofit	38
5.3	Ciri-Ciri Bakteria Endofit	39
5.4	Bakteria yang Berpotensi Merencat Pertumbuhan <i>Ganoderma boninense</i> dan Penyebab Akar Merah.	39
5.5	Pemisahan Bahan Aktif Endofit Melalui Kromatografi Lapisan Nipis	40
5.6	Bakteria yang boleh Menghasilkan Auksin dan Bertindak Sebagai Pelarut Fosfat.	40
5.7	Ujian Di Ladang	
5.7.1	Ketinggian Pokok Bayam Hijau	41
5.7.2	Jumlah Berat Kering Bayam	42
5.7.3	pH Tanah dan Keupayaan Pertukaran Kation, CEC	42
 BAB 6 KESIMPULAN		
6.1	Kesimpulan	44
6.2	Cadangan	45
 RUJUKAN		
 LAMPIRAN		
		50

SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
2.1	Klasifikasi saintifik teh	5
2.2	Klasifikasi saintifik <i>Ganoderma boninense</i>	13
2.3	Klasifikasi saintifik kulat penyebab akar merah (<i>Ganoderma philippii</i>)	14
4.1	Peratus bakteria endofit yang berjaya dipencarkan daripada <i>Camellia sinensis</i> L.)	23
4.2	Ciri-ciri endofit yang dipencarkan daripada <i>Camellia sinensis</i> L.	24
4.3	Pengenalpastian bakteria endofit yang berpotensi melawan <i>Ganoderma boninense</i> dan penyakit akar merah.	25
4.4	Bakteria endofit yang boleh mengikat nitrogen dan sebagai pelarut fosfat	26
4.5	Nilai Rf yang berlaku perencatan <i>Aspergillus niger</i> .	30
4.6	Nilai purata $Rf \pm Sd$	30
4.7	pH tanah dan Keupayaan pertukaran Kation, CEC	37

SENARAI RAJAH

Rajah		Muka surat
2.1	Ciri-ciri elavasi bakteria	16
2.2	Ciri-ciri pinggir bakteria	17
2.3	Ciri-ciri struktur dalaman bakteria	17
4.1	Jumlah asid indol asetik (IAA) yang dihasilkan oleh bakteria endofit	27
4.2	Peratus kehadiran bakteria endofit daripada <i>Camellia sinensis</i> L. yang boleh menghasilkan auksin dan sebagai pelarut fosfat.	28
4.3	Pemisahan bahan aktif bakteria endofit melalui kromatografi lapisan nipis yang dilihat (a) di bawah gelombang pendek ultraviolet dan (b) di bawah gelombang panjang ultraviolet	29
4.4	Perencatan <i>Aspergillus niger</i> di atas plat disebabkan kehadiran bahan aktif bakteria endofit	29
4.5	Ketinggian pokok bayam hijau (<i>Amaranthus</i> sp.) pada hari ke 25	31
4.6	Ketinggian pokok bayam hijau pada hari ke 25 setelah diberi rawatan dengan bakteria endofit (a) B13-A , (b) B12-T, (c) B15-B, (d) B8-A, (e) B2-A, (f) B10-B, (g) B18-B, dan (h) B21-A	32
4.7	Ketinggian pokok bayam hijau pada hari ke 25 setelah diberi rawatan dengan bakteria endofit (i) B3-B, (j) B9-T, (k) B19-A, (l) B5+B12+B15+B22, (m) B1-T, (n) B5-M, (o) B7-T, dan (p) B11-B	33
4.8	Ketinggian pokok bayam hijau pada hari ke 25 setelah diberi rawatan dengan bakteria endofit (q) B16-B, (r) B20-B, (s) B14-M, (t) B6-T, (u) B4-T, (v) B17-B, dan (w) Kawalan	34
4.9	Jumlah berat kering bayam hijau (<i>Amaranthus</i> sp.)	36

SENARAI NAMA SINGKATAN, SIMBOL DAN UNIT

%	Peratus
H_0	Hipotesis Null
H_a	Hipotesis Alternatif
cm	Centimeter
L	Liter
ml	Mililiter
mm	Milimiter
nm	Nanometer
NA	Nutrient Agar
Rf	Retention factor
sp.	Spesies
TLC	Thin Layer Chromatography

SENARAI FORMULA

Formula	Muka Surat
3.1 Retention Factor	21

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang dilalui oleh bahan antimikrob}}{\text{Jarak yang dilalui oleh bahan pelarut}}$$

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Pendahuluan

Malaysia adalah sebuah negara beriklim tropika yang kaya dengan flora dan fauna. Terdapat banyak jenis tumbuhan yang menjadi sumber kepada khazanah negara yang tidak ternilai. Tumbuhan ini mempunyai jaringan yang kompleks dengan mikroorganisma samada memberi kebaikan atau keburukan. Sejak akhir-akhir ini kajian mengenai mikroorganisma yang terdapat di dalam tumbuhan mula mendapat perhatian ramai. Ia dikaji untuk pelbagai tujuan terutamanya kepada bidang perubatan, pertanian, dan industri.

Endofit merujuk kepada lokasi organism hidup, di mana "endo~" bermaksud di dalam manakala "~phyte" bermaksud tumbuhan. Oleh itu, endofit adalah organisma yang hidup di dalam tumbuhan namun tidak memberikan kesan negatif terhadap perumahnya (Ryan *et al.*, 2008). Sebenarnya, endofit bakteria mempunyai banyak kesan positif kepada hos contohnya, di dalam pengikatan nitrogen, aktiviti antibakteria, antifungus dan juga merangsang pertumbuhan pada tumbuhan (Berg *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 1994; Rijavec *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2006). Penyelidikan mengenai endofitik bakteria boleh membawa kepada pengenalpastian antibiotik novel untuk tujuan terapeutik pada manusia, tumbuhan dan haiwan (Ryan *et al.*, 2008; Strobel *et al.*, 2004). Sehingga kini masih banyak lagi bidang yang belum diterokai berkaitan hubungan tumbuhan dengan mikroorganisma.

Kitaran hidup bakteria endofit boleh dibahagikan kepada dua, pertama obligat dan kedua fakultatif. Obligat adalah bakteria endofit yang bergantung kepada perumah untuk hidup dan membiak serta menjangkiti tumbuhan sihat yang lain. Fakultatif pula,

bakteria endofit hidup di luar perumah ia boleh dikategorikan sebagai bipasik iaitu hidup diantara tumbuhan dan persekitaran terutamanya tanah. Sekiranya terdapat luka atau lubang halus pada akar pokok bakteria ini akan menembusi sel seterusnya membiak di ruang interselular.

Bakteria endofit berpotensi untuk menghasilkan antibiotik serta metabolit sekunder dimana ia memberi impak positif kepada tumbuhan. Kajian di Malaysia juga telah dilakukan di mana tiga endofit *Streptomycte* telah berjaya dipencarkan daripada tumbuhan *Thotteagrandiflora*, *Ployalthia* sp., dan *Mapania* sp. yang menunjukkan aktiviti antifungal terhadap satu atau lebih fungus patogenik (Zin *et al.*, 2007). Selain itu, kajian oleh Ghadin *et al.* (2008) menunjukkan endofit *Streptomyces* SUK 06 mengandungi aktiviti antibakteria yang baik terhadap bakteria ujian seperti *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dan *Bacillus cereus*.

Bakteria endofit mampu untuk menghalang sesuatu penyakit yang disebabkan oleh organisma patogen. Bakteria endofit memberi kesan baik kerana terdapat hubungan perumah dengan rhizosphere. Mekanisma ini telah ditemui daripada hasil kajian Kloepper *et al.* (1999) dan (Gray dan Smith, 2005). Penyakit kulat, bakteria, dan virus yang menyerang tanaman adalah disebabkan oleh serangga dan nematode jadi melalui inokulasi endofit kepada tanaman yang dijangkiti ia boleh membantu dalam mengurangkan penyakit (Berg dan Hallman, 2006).

Dipercuryai bakteria endofit boleh merangsang fenomena yang dikenali sebagai *induced systemic resistance* (ISR) dimana ia sama dengan *systemic-acquired resistance* (SAR). SAR boleh mengaktifkan mekanisma pertahanan di dalam tumbuhan yang bertindak sebagai pertahanan primer apabila diserang oleh patogen, kemudian merangsang tindak balas hipersensitif (Van Loon *et al.*, 1998). ISR juga sangat berkesan melawan berbagai jenis patogen.

Ladang Sabah Teh merupakan kawasan kajian bagi mendapatkan sampel bakteria endofit. Ladang ini terletak di daerah Ranau, Sabah dan merupakan satu satunya ladang teh organik yang terdapat di kepulauan Borneo ini. Dianggarkan keluasan kawasan adalah 10,000 ekar (Sabah Tea Plantation, 2004).

1.2 Justifikasi

Berdasarkan kajian yang terdahulu masih belum ada kajian mengenai pemencilan antimikrob daripada *Camellia sinensis* L. terutamanya di Ladang Sabah Teh, Ranau. Pada masa sekarang, tumpuan lebih diberikan kepada sesuatu yang lebih mesra alam. Disebabkan itu penggunaan mikroorganisma sangat dititik beratkan sebagai salah satu langkah alternatif menggantikan sistem yang telah lama diguna pakai dalam bidang pertanian mahupun yang lain seperti penggunaan bahan kimia untuk memusnahkan perosak tanaman, amalan ini mendarangkan kesan negatif kepada keseimbangan ekosistem dan menyebabkan masalah kesihatan yang serius. Sebagai contoh, pencemaran air bawah tanah hasil mendapan nitrogen dari baja kimia.

Selain itu juga, melalui kajian ini bakteria endofit yang terdapat dan hidup di dalam *Camellia sinensis* L. dapat dikenal pasti. Penggunaan mikroorganisma baik telah lama digunakan sebagai langkah pengurangan bahan kimia (Dobbelaere *et al.*, 2003). Contohnya diazotrofbakteria, agen kawalan biologi, rhizobakteria dan kulat memainkan peranan penting untuk mengatasi cabaran ini (Hermosa *et al.*, 2011). Secara tidak langsung, kajian ini dapat menyumbang kepada penemuan baru bakteria endofit yang hidup di dalam *Camellia sinensis* L. dan juga membantu pihak yang memerlukan maklumat mengenai aktiviti antimikrob bagi penambahbaikan kepada sesuatu bidang, sebagai contoh bidang pertanian dan bidang perubatan.

1.3 Objektif kajian

Kajian ini mempunyai empat objektif yang utama iaitu;

1. Untuk mengetahui tentang keberadaan bakteria endofit di dalam *Camellia sinensis* L.
2. Untuk mengkaji aktiviti antimikrob dari bakteria endofit yang terdapat di dalam *Camellia sinensis* L.
3. Untuk isolat bakteria endofit daripada *Camellia sinensis* L. yang boleh menghasilkan asid indole asetik (auksin) dan pelarut fosfat.
4. Untuk mengkaji bakteria endofit yang terpilih ke atas pertumbuhan bayam hijau (*Amaranthus* sp.)

1.4 Hipotesis kajian

- H_o: Tiada kehadiran bakteria endofit di dalam *Camellia sinensis* L.
- H_a: Terdapat kehadiran bakteria endofit di dalam *Camellia sinensis* L.
- H_o: Tiada berlaku aktiviti antimikrob yang terhasil dari bakteria endofit yang terdapat di dalam *Camellia sinensis* L.
- H_a: Terdapat aktiviti antimikrob yang terhasil dari bakteria endofit yang terdapat di dalam *Camellia sinensis* L.
- H_o: Tiada kehadiran bakteria endofit di dalam *Camellia sinensis* L. yang menghasilkan asid indole asetik (auksin) dan pelarut fosfat.
- H_a: Terdapat kehadiran bakteria endofit di dalam *Camellia sinensis* L. yang menghasilkan asid indole asetik (auksin) dan pelarut fosfat.
- H_o: Tiada signifikan antara bakteria endofit yang terpilih ke atas pertumbuhan bayam hijau (*Amaranthus* sp.)
- H_a: Terdapat signifikan antara bakteria endofit yang terpilih ke atas pertumbuhan bayam hijau (*Amaranthus* sp.)

BAB 2

KAJIAN PERPUSTAKAAN

2.1 Morfologi dan Klasifikasi *Camellia sinensis* L.

Camellia sinensis L., adalah pokok renek yang boleh mencapai ketinggian sehingga 10-15 m dan 0.6- 1.5 m apabila ditanam untuk dikomersialkan. Daunnya berwarna hijau muda, tangkai daun pendek, alternatif, berbentuk oval seperti pisau pembedah, tepinya bergerigi, berbulu dibahagian bawah daun, panjang dari 5 hingga 30 cm dan 4 cm lebar. Daun yang matang berwarna hijau gelap, licin dan keras manakala daun muda adalah pubescen. Bunganya berwarna putih berukuran 2.5 hingga 4 cm diameter, boleh dijumpai dalam satu, dua, atau empat kelompok. Bunga teh mempunyai banyak stamen yang mengandungi anter berwarna kuning dan menghasilkan biji berwarna merah keperangan. Buahnya bulat berbentuk tiga sel berkapasul, licin, biji bersendirian dalam setiap tangkai, saiz kacang kecil (Biswas, 2006).

Jadual 2.1 Klasifikasi *Camellia sinensis* L.

Superdivisi	:Spermatophyte
Divisi	:Magnoliophyta
Kelas	:Magnoliopsida
Sub kelas	:Dilleniidae
Order	:Theales
Family	:Theaceae
genus	:Camellia

Sumber: Mahmud *et al.*, 2010

Tradisi meminum teh telah bermula sejak 3000 tahun sebelum Masihi. Rasa yang menyenangkan dan menyegarkan memberikan kepuasan kepada pengemar teh, ia juga memberi manfaat yang baik kepada kesihatan diri (Sharangi, 2009). Pengambilan teh memberikan impak positif kepada kesihatan kita. Menurut Frei dan Higdon 2003, teh hijau dipercayai boleh memberikan faedah sebagai antioksidan ia sama seperti buah-buahan dan sayur-sayuran yang kita makan. Sebenarnya, teh diperkaya dengan kandungan polifenol, termasuklah catechin, theaflavin dan thearubigins. Selain itu juga kandungan polifenol memainkan peranan penting dalam pencegahan penyakit kanser, melalui pemusnahan sel DNA (Shankar, Ganapathy dan Srivastava, 2007).

Pokok teh akan mengambil florida yang terdapat di tanah kemudian ia akan terkumpul di dalam daun, disebabkan hal ini ekstrak daun teh mengandungi florida dan dianggarkan secawan air teh terdapat 0.3 hingga 0.5 mg florida. Florida akan terikat pada enamel gigi serta melindungi gigi daripada menjadi reput (Hamilton Miller, 2001). Polifenol dalam teh hijau mempunyai kandungan anti bakteria yang dapat mencegah penyakit gingivitis serta periodontal dengan cara membunuh bakteria terkumpul di dalam mulut yang menyebabkan kerosakan gigi. Anti bakteria ini juga dikatakan mampu merawat masalah mulut berbau dengan cara membunuh bakteria penyebab mulut berbau.

2.2 Bakteria Endofit

Tumbuhan merupakan habitat kepada sejumlah besar mikroorganisma yang lebih dikenali sebagai endofit (Bacon dan White, 2000). Endofit adalah mikroorganisma yang boleh hadir di dalam perumah samada pada sebahagian atau keseluruhan kitaran hidup perumah. Mikroorganisma ini mengkoloni tisu tumbuhan yang berada di bawah lapisan sel epidermis tanpa menyebabkan sebarang kemudaratan yang jelas atau jangkitan kepada perumah, ia hidup di dalam ruang interselular tisu dan boleh menembusi sel hidup yang lain (Strobel, 2003). Dianggarkan bahawa, hampir 300,000 spesis tumbuhan yang wujud di muka bumi ini, setiap satu merupakan perumah kepada endofit (Strobel dan Daisy, 2003). Dijangkakan terdapat lebih kurang satu juta spesies endofit yang berbeza, tetapi hanya segelintir sahaja yang telah dikenalpasti (Guo B *et al*, 2008).

Cara hidup bakteria endofit terbahagi kepada dua iaitu obligat dan fakultatif. Obligat bermaksud endofit ini sangat bergantung kepada perumah untuk hidup dan akan berpindah kepada pokok lain dengan bantuan vektor. Sementara fakultatif adalah endofit yang boleh hidup walaupun berada di luar perumah. Tetapi bagi bakteria phytopatogen ia boleh tergolong dalam kalangan fakultatif atau obligat (Van Overbeek *et al.*, 2004).

2.3 Penyukatan Aktiviti Antimikrob

Endofit mempunyai pelbagai metabolit bioaktif yang digunakan secara meluas sebagai agen agrokimia, antibiotik, antiparasit, antioksidan dan antikanser (Gunatilaka, 2006). Beberapa sebatian antimikrob seperti alkaloid, peptide, steroid, terpenoid, fenol, quinone, dan flavonoid boleh dijumpai melalui penciran endofit (Joseph dan Priya 2011).

Kaedah yang biasa dilakukan untuk mengkaji tindakan antimikrob ialah resapan agar-agar. Satu plat petri yang mengandungi medium agar-agar yang telah diinokulasi secara rata dengan organisma ujian disediakan. Plat ujian diinokulasi dengan menuangkan satu lapisan agar-agar yang mengandungi organisma ujian ataupun dengan menyapu permukaan medium kultur broth organisma ujian. Jumlah agen antimikrob yang diketahui nilainya ditambahkan melalui kepingan-kepingan turas yang berbentuk cakera diletakkan diatas permukaan agar. Kemudian plat tersebut akan dieramkan, agen itu akan meresap ke dalam agar sekiranya ia meresap lebih jauh daripada kertas turas maka nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) akan tercapai. Selepas daripada titik ini pertumbuhan akan berlaku tetapi disekitar cakera tiada pertumbuhan. Kawasan yang tiada pertumbuhan dipanggil sebagai zon perencatan dan saiznya boleh diukur menggunakan pembaris; diameternya didapati berkadar dengan jumlah agen antimikrob yang ditambah pada kepingan cakera.

Saiz zon perencatan dipengaruhi oleh kepekaan organisma ujian, medium kultur dan keadaan pengermanan, kadar resapan agen dan kepekatan agen dalam kepingan cakera kertas turas. Tafsiran tentang keertian zon perencatan yang boleh menjadi luas atau sempit bukannya sesuatu yang senang. Sejenis agen yang menghasilkan zon yang lebar tidak semestinya lebih aktif berbanding dengan agen yang menghasilkan zon yang sempit kerana kadar resapan dalam agar pada agen-agen

yang berlainan amat berbeza sekali. Untuk membandingkan dua agen, kaedah pencairan tiub lebih diutamakan. Walaubagaimanapun, kaedah resapan agar-agar lebih mudah untuk disediakan dan digunakan dengan meluasnya bagi mengasai antibiotik dan dalam bidang perubatan klinikal (Brock *et. al.*, 1993).

2.4 Interaksi antara Bakteria Endofit dengan Perumah

Tumbuhan mungkin menjadi perumah kepada satu atau lebih endofit dan boleh mengkoloni perumah. Berkemungkinan terdapat banyak spesies endofit yang masih belum ditemui. Kebanyakan endofit menghasilkan pelbagai metabolit bioaktif yang boleh terlibat secara langsung dalam hubungannya dengan perumah (Strobel, 2003). Metabolit ini boleh berfungsi sebagai sumber produk baru semulajadi untuk dieksplotasi dalam bidang perubatan, pertanian, dan industri (Bacon dan White, 2000).

Pelbagai jenis hubungan boleh wujud antara endofit dengan tumbuhan perumah mereka, antaranya adalah mutualisme atau simbiosis kepada antagonisme atau patogenesis (Schulz dan Boyle, 2005). Hubungan perumah dengan endofit boleh digambarkan dari segi perumah-spesifisiti, perumah-berulang, perumah-pilihan, atau perumah-utama (Zhou dan Hyde, 2001).

Perumah-spesifisiti adalah hubungan dimana mikroorganisma terhad kepada satu jenis perumah atau kumpulan spesies yang berkaitan, spesifisiti menunjukkan bahawa terdapat interaksi biokimia yang kompleks antara perumah dengan endofit yang berkaitan (Strobel, 2003). Perumah-berulang merujuk kepada kekerapan atau endofit yang dominan terhadap sesuatu perumah, walaupun endofit itu boleh dijumpai pada perumah tumbuhan lain dalam habitat yang sama (Zhou dan Hyde, 2001). Satu spesies endofit boleh membentuk hubungan dengan dua atau banyak perumah tumbuhan, tetapi jika terdapat keutamaan terhadap satu perumah tertentu sahaja fenomena ini boleh ditakrifkan sebagai perumah-pilihan (Cohen, 2006). Istilah bagi perumah-utama sering digunakan untuk menunjukkan kejadian biasa atau keunikan endofit dalam perumah tertentu, dan juga untuk menandakan perbezaan dalam komposisi komuniti endofit tersebut dan kekerapan hubungan dengan perumah tumbuhan yang berbeza (Suryanarayan dan Kumaresan, 2000). Sebenarnya, endofit boleh mendiami perumah dari yang hidup di dalam habitat yang sama walaupun

berlainan famili, penyebaran endofit dari satu perumah kepada perumah yang lain menggunakan mekanisma yang sama terhadap perumah yang berkait rapat (Huang *et al.*, 2008). Terdapat perbezaan dari segi profil metabolismik, seterusnya dalam aktiviti biologi dan juga perbezaan kimia antara perumah tumbuhan yang berbeza (Paulus *et al.*, 2006).

2.5 Kesan Bakteria Endofit Terhadap Tumbuhan

Endofit bakteria memberikan kesan yang besar kepada tumbuhan perumah. Endofit boleh membantu pertumbuhan pokok dalam banyak cara, melalui rembesan bahan pertumbuhan pokok contohnya asid indole-asetik (Lee *et al.*, 2004), terhasil semasa aktiviti solubilizing fosfat dengan meningkatkan percambahan hatal dan penajahan micorrhizal (Will dan Sylvia, 1990), penghasilan siderophores (Costa dan Loper, 1994), membantu dalam pengikatan nitogen kepada tumbuhan (James *et al.*, 1994). Selain itu juga, bakteria endofit membekalkan vitamin yang diperlukan kepada tumbuhan perumah (Rodelas *et al.*, 1993). Memberi kesan terhadap penghasilan sebatian seperti auksin di dalam perumah seterusnya meningkatkan pengeluaran biji benih, percambahan dan juga meningkatkan pertumbuhan tunas (Kevin, 2003). Kesan-kesan lain bakteria endofit terhadap tumbuhan perumah adalah termasuklah penyesuaian osmotik, pengawalan stomata, mengubah suai morfologi akar, meningkatkan pengambilan mineral dari sumber tanah serta pengubahan pengumpulan dan metabolism nitrogen (Belesky dan Malinowski, 2000).

2.6 Faktor-Faktor Fizik yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroorganisma

Menurut Darah Ibrahim dan Ibrahim Che Omar, 2004 terdapat empat faktor fizik bagi pertumbuhan mikroorganisma, diantaranya adalah suhu, oksigen, pH, tekanan osmosis, dan tekanan hidrostatik. Pemahaman mengenai keperluan utama pertumbuhan sesuatu mikroorganisma membantu dalam menjangkakan kadar pertumbuhan.

2.6.1 Suhu

Tahap keperluan suhu terhadap pertumbuhan mikroorganisma adalah berbeza mengikut spesies. Setiap spesies kebiasaannya mempunyai satu suhu minimum, optimum, dan maksimum. Pada suhu minimum, aktiviti mikroorganisma akan terencat walaupun tiada kematian, kerana berlakunya proses penggelan membran sel sementara proses pengangkutan di dalam sel berjalan amat perlahan sehingga menyebabkan pertumbuhan sel tidak akan berlaku. Pada suhu optimum pula, adalah sangat sesuai untuk pertumbuhan dan fisiologi sel, iaitu proses enzimologi dan tindak balas fisiologinya berlaku pada tahap maksimum. Manakala bagi suhu yang paling tinggi iaitu maksimum, pada peringkat ini berlaku penyahslian protein dan kemusnahan membran sel sehingga mengakibatkan penglisian sel. Sekiranya mikroorganisma berada pada suhu melebihi maksimum ia akan mati atau musnah.

2.6.2 Oksigen

Oksigen adalah satu komponen pertumbuhan yang penting selain itu juga oksigen menjadi sebahagian daripada juzuk molekul air, pelbagai sebatian organik dan karbon dioksida. Berdasarkan tahap keperluan oksigen, terdapat lima kategori iaitu aerob obligat, anaerob obligat, aerob fakultatif atau anaerob fakultatif, anaerob aerotoleran dan mikroaerofili.

Mikroorganisma aerob obligat adalah mikroorganisma yang memerlukan oksigen sahaja bertindak sebagai penerima elektron terminal semasa proses respirasi yang boleh menghasilkan tenaga. Seandainya keadaan sekeliling tiada kehadiran oksigen atau kepekatan oksigen yang rendah mengakibatkan mikroorganisma yang berada disitu terbunuuh. Bagi mikroorganisma anaerob obligat ia amat peka terhadap kehadiran oksigen dalam sesuatu kawasan. Mikroorganisma ini tidak memerlukan oksigen sebagai penerima elektron terminalnya. Walaupun kehadiran oksigen itu sedikit ia akan menyebabkan keadaan menjadi toksik dan dapat membunuhnya. Manakala, mikroorganisma aerob fakultatif atau anaerob fakultatif boleh menggunakan oksigen sebagai penerima elektron terminalnya tetapi sekiranya oksigen tiada ataupun tidak mencukupi ia boleh menggantikannya dengan nitrat bagi menjana tenaga secara fermentasi.

2.6.3 pH

pH adalah ukuran bagi keaktifan ion hidrogen dan nilai yang sering digunakan antara 0 hingga 14. Nilai yang kurang daripada 7 ialah asid, nilai yang melebihi 7 ialah alkali, manakala nilai 7 dinyatakan sebagai neutral. Mikroorganisma juga boleh dikelaskan mengikut keperluan pH medium untuk pertumbuhan. Kebanyakkan mikroorganisma neutrofil boleh hidup pada pH yang menghampiri neutral (pH 6-8). Neutrofil tidak boleh hidup pada pH 4 atau kurang dan juga pada pH yang melebihi 9. Hal ini terjadi disebabkan oleh kehadiran ion hidrogen ataupun ion hidroksil yang mengaktifkan protein sel seterusnya memecahkan sel-sel tersebut. Kumpulan asidofil memerlukan ion hidrogen untuk menstabilkan membrane selnya. Ion hidrogen tidak akan berkumpul di dalam sel oleh itu pH sel adalah neutral. Bakteria alkalofil ialah mikroorganisma yang boleh hidup pada pH 9 atau lebih.

2.6.4 Tekanan Osmosis

Mikroorganisma yang sedang tumbuh mengambil zat makanan daripada persekitaran sama ada medium pertumbuhan atau persekitaran semula jadi. Zat makanan ini akan larut didalam air. Apabila sesuatu mikroorganisma diletakkan dalam larutan yang lebih pekat daripada bendalir sel, air yang berada di dalam sel akan keluar melalui membran sitoplasma. Larutan ini dipanggil hipertonik yang mengakibatkan sel-sel kehilangan air, keadaan ini disebut sebagai plasmolysis. Terdapat juga mikroorganisma yang boleh beradaptasi pada persekitaran kepekatan garam yang tinggi. Ia dikenali sebagai halofil (cinta garam). Halofil fakultatif menunjukkan ketahanan terhadap kepekatan garam sehingga 2%, manakala halofil lampau menunjukkan ketahanan terhadap kepekatan garam yang tinggi sehingga 15%.

RUJUKAN

- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Bacon, C. W. and White, J. F. 2000. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker
- Belesky, D. P. and Malinowski, D. P. 2000. Abiotic Stresses and Morphological Plasticity and Chemical Adapts of *Neotyphodium*-Infected Tall Fescue Plants: *Microbial Endophytes* (eds) C. W. bacon and J. F. White Jr. New York: Marcel Dekker
- Berg, G. 2009. Plant-Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**: 11-18
- Berg, G., Eberl, L. and Hartmann, A. 2005. The Rhizosphere as Areservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria. *Environ Microbiol* **7**: 1673-1685
- Biswas, K. P. 2006. Description of Tea Plant. In *Eyclopedia of Medicinal Plants* : 964-966
- Boddey, R. M., Urquiaga, S., Alves, B. J. R. and Reis, V. 2003. Endophytic Nitrogen Fixation in Sugarcane: Present knowledge and future application. *Plant Soil* **252**: 139-49
- Brock, T. D. 1989. *Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Brock, T. D., Brock, K. M. dan Ward, D. M. 1993. *Basic Microbiology with Application*. New Jersey: Prentice-Hall Englewood Cliffs
- Brooks, D. S., Gonzalez, C. F., Appel, D. N. and Filer, T. H. 1994. Evaluation of Endophyte Bacteria as Potential Biological Control Agents for Oak Wilt. *Biol. Control* **4**: 373-381
- Chareprasert, C., Piapukiew, J., Thienhirun, S., Whalley, A. J. S., Sihanonth P. 2006. Endophytic Fungi of Tree Leaves *Tectona Grandis* L. dan Rain Tree Leaves *Samanea saman* Merr. *World J. Microbiol Biotechnol*. **22**: 481-486.
- Cohen, S. D. 2006. Host Selectivity and Genetic Variation of *Discula Umbrinella* Isolates From Two Oak Species: Analyses of Intergenic Spacer Region Sequences of Ribosomal DNA. *Microbial Ecology* **52**: 463-469.
- Costa, J. M. and Lopez, J. E. 1994. Characterization of Siderophore Production by The Biological Control Agent *Enterobacter cloacae*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 440-448
- Darah, I. dan Ibrahim, C. O. 2004. *Konsep Dalam Mikrobiologi: Biologi Mikroorganisma*. Pulau Pinang: Universiti Sains Malaysia.
- Desy, P. and Anto, R. 2010. Somatic Incompatibility Test to Reveal Disease Spread of *Ganoderma Philippii* in *Acacia mangium* Plantation. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* **4(1)**: 49-61
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant Growth-Promoting Effects Diazotrophs in The Rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* **22**: 107-149
- Drapeau, P., Melinshyn, E. and Armass, S. S. 1989. Contact-Mediated Loss of The Nonsynaptic Response to Transmitter During Reinnervation of an Identified Leech Neuron in Culture. *Journal Neurosci* **9**: 2502-2508
- Firakova, S., Sturdikova, M. and Muckova, M. 2007. Bioactive Secondary Metabolites Produced By Microorganisms Associated With Plants. *Biologia* **62(3)**: 251-257
- Frei, B. and Higdon, J. V. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *Journal of Nutrition* **133(10)**: 3275S-3284S
- Gangwar, M., and Kaur, G. 2008. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Endorhizosphere of Sugarcane and Ryegrass. *The Internet Journal of Microbiology*. Volume 7 Number 1.

- Ghandin, N., Zin, N. M., Sabaratnam, V., Badya, N., Basri, D. F., Lian, H. H., and Sidik, N.M. 2008. Isolation and Identification of Novel Endophytic Streptomyces SUK 06 With Antimicrobial Activity From Malaysian Plant. *Asian journal of Plant Science* **7(2)**: 189-194
- Gray, E. J., and Smith, D. L. 2005. Intercellular PGPR: Commonalities and Distinctions In The Plant-Bacterium Signalling Processes. *Soil Biol Biochem* **37**: 395-412
- Gunatilaka, A. A. L. 2006. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity and Implication of Their Occurrence. *Journal of Natural Product*. **69**: 509-526.
- Guo, L., Wu, J., Han, T., Cao, T., Rahman, K., and Qin, L.P. 2008. Chemical Composition, Antifungal, and Antitumor Properties of Ether Extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. *Molecules*.**13**: 14-25
- Hamilton Miller, J. M. 2001. Anticariogenic Properties of Tea *Camellia sinensis* L. *Journal of Medical Microbiology* **50**: 299-302
- Hardoim, P.R., Overbeek, L.S.V., and Elsas, J.D.V.. Properties of Bacterial Endophytes and Their Proposed Role in Plant Growth. *Trends Microbiol*. 2008, **16 (10)**: 463-471.
- Hermosa, R., Botella, L., Alonso-Ramirez, A., Arbona, V., Gomez-Cadenas, A., Monte, E., and Nicolas, C. 2011. Biotechnological Applications of The Gene Transfer From The Beneficial Fungus *Trichoderma harzianum* Spp. to Plants. *Plant Signal Behav.***6**: No 8
- Huang, Z. J., Cai, X. L., Shao, C. L., She, Z. G., Xia, X. K., and Chen, Y. G. 2008. Chemistry and Weak Antimicrobial Activities of Phomopsis Produced by Mangrove Endophytic Fungus Phomopsis Sp. ZSU-H76. *Phytochemistry* **69(16)**:4-8
- Jabatan Pertanian Negeri Pulau Pinang. 2013
- James, E. K., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. I., and Debereiner, J. 1994. Infection of Sugar Cane By The Nitrogen-Fixation Bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* **45**: 757-766
- Ji P., Momol M. T., Olson S. M. and Pradhanang P. M. 2005. Evaluation of thymol as biofungimigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. *Plant Disease* **89**: 497–500.
- Joseph B. and Priya R. M., 2011. Bioactive Compounds from Endophytes and Their Potential In Pharmaceutical Effect: A Review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **1**: 291-309.
- Kevin, V. J. 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria As Biofertilizers. *Plant soil* **255**: 571-586
- Kloepper, J. W., Rodriguez-Kabana, R., Zehnder, G. W., Murphy, J., Sikora, E. and Fernandez, C. 1999. Plant Root-Bacterial Interaction in Biological Control of Soil Borne Diseases and Potential Extension to Systemic and Foliar Diseases. *Aust J Plant Pathol* **28**: 27-33
- Lee, S., Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. E., and Kennedy, C. 2004. Indole-3Acetic Acid Biosynthesis Is Deficient In Gluconacetobacterc Diazotrophicus Strains With Mutations In Cytochrome C Biogenesis Genes. *Journal Bacteriol* **186**: 5384-5391
- Madhurama G., Sheela R. and Neerja S. 2008. Investigating Endophytic Actinomycetes Diversity from Rice for Plant Growthpromoting and Antifungal Activity. *International Journal of Advanced Life Sciences* **1**: 10-21

- Magnani, P., Conforti, A., Zanolin, E., Marzotto, M. and Bellavite, P. 2010. Dose-Effect Study of Gelsemium Semperflorens in High Dilutions on Anxiety-Related Responses in Mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **210**: 533–545.
- Mahmood, T., Akhtar, N. and Ali Khan, B. 2010. The Morphology, Characteristics, and Medicinal Properties of 'Camellia Sinensis' Tea. *Journal of Medicinal Plants Research* **4(19)**: 2028-2033
- Mantell, S. H. and Smith, H. 1983. Cultural Factors That Influence Secondary Metabolite Accumulations in Plant Cell and Tissue Cultures. *Cambridge Univ Press* : 75-108.
- Mattos, K. A., Pádua, V. L. M., Romeiro, A., Hallack, L. F., Bianca, C. N., Ulisses, T. M. U., Barros, C. F., Todeschini, A. R., Previato, J. O. and Previato, L. M. 2008. Endophytic Colonization of Rice (*Oryza sativa* L.) by The diazotrophic Bacterium *Burkholderia kururiensis* and Its Ability to Enhance Plant Growth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **80(3)**: 477-493
- Paulus, B., Kanowski, J., Gadek, P. and Hyde, K. D. 2006. Diversity and Distribution of Saprobic Microfungi in Leaf Litter of an Australian Tropical Rainforest. *Mycological Research* **110**: 1441-1454
- Rodelas, B., Salmeron, V., Martinez-Toledo, M. V. and Gonzalez-Lepz, J. 1993. Production of Vitamins by *Azospirillum brasilense* in Chemically-Defined Media. *Plant Soil* **153**: 97-101
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J. and Dowling, D. N. 2008. Bacterial Endophytes Recent Developments and Applications. *FEMS Microbiology Letters* **278**: 1-9
- Saharan, B. S. and Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21
- Schulz, B. and Boyle, C. 2005. The Endophytic Continuum. *Mycol. Res.* **109**: 661-686
- Seo, G. S. and Kirk, P. M. 2000. *Genodermataceae: Nomenclature and Classification*. Journal Flood, PD Bridge, M Holderness, editor. Ganoderma diseases of Parrennial Crops. UK: CABI Publishing.
- Shahzad, S. M., Khalid, A., Arshad, M., Khalid M. and Mehboob I. 2008. Integrated use of Plant Growth Promoting Bacteria and Penriched Compost for Improving Growth, Yield and Nodulating of Chickpea. *Pakistan Journal of Botany* **40**: 351-441
- Shankar, S., Ganapathy, S. and Srivastava, R. K. 2007. Green Tea polyphenols, Biology and Therapeutic Implications in Cancer. *Front Bioscience* **1(12)**: 4881-4899
- Sharangi, A. B. 2009. Medicinal and Therapeutic Potentialities of Tea (*Camellia sinensis* L.). *Food Research International* **42**: 529-535
- Strobe, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganism. *J Nat Prod* **67**: 257-268
- Strobel, G. A. 2003. Endophytes as Sources of Bioactive Products. *Microb Infect*. **5**: 535-544
- Suryanarayanan, T. S., and Kumaresan, V. 2000. Endophytic Fungi of Some Halophyte from an Estuarine Mangrove Forest. *Mycological Research* **104**: 1465-1467
- Tan, R. X. and Zou, W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Nat. Pro. Rep.* **18**: 448-459
- Tariq, M., Naveed, A. and Barkat, A. K. 2010. The Morphology, Characteristics and Medicinal Properties of *Camellia Sinensis* Tea. *Medicinal plants research* **4(19)**: 2028-2033
- Turner, P. D. 1981. *Oil Palm diseases and disorders*. Kuala Lumpur: The Incorporated society of Planters

- Upadhyay R.K. and Patra D.D. 2011. Influence of Secondary Plant Nutrients (Ca and Mg) on Growth and Yield of Chamomile (*Matricaria recutita L.*). *Asian Journal of Crop Science* **3**: 151-157.
- Van, L. L. C., Bakker, P. A., and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. *Ann Rev Phyto* **36**:453-483
- Van, O. L. S. et al. 2004. The Low Temperature Induced Viable-But-Nonculture State Affects The Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. *Phytopathology* **94**: 463-469
- Vance, C.P., Ehde-Stone, C., and Allan, D.L. 2003. Phosphorous Acquisition and use: Critical Adaptations By Plants for Screening a Renewable Resource. *New Phytol.* **157**: 423-447
- Will, M. E. and Sylvia, D. M. 1990. Interaction of Rhizosphere Bacteria, Fertilizer and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi With Zea Oats. *Appl Environ. Microbiology* **56**: 2073-2079
- Wood, A.J., and Roper, J. 2000. A Simple and Nondestructive Technique for Measuring Plant Growth and Development. *American Biology Teacher.* **62 (3)**: 215-17.
- Yong, R. N. and Warkentin, B. P. 1975. Soil properties and behaviour. Elsevier Scientific Publishing Company.
- Zhou, D., and Hyde, K. D. 2001. Host Specificity, Host Exclusively, And Host Recurrence In Saprobic Fungi. *Mycological Research* **105**: 1449-1457
- Zin, N. M., Sarmin, M. N., Ghandin, N., Basri, D.F., Sidik, N.M., and Strobel, G. 2007. Bioactive Endophytic Streptomyces From Malay Peninsula. FEMS. *Microbiology Letters* **274**: 83-88