

Identifikasi Isolat Rhizobakteria Indigenos Kandidat Agen Biokontrol *Ganoderma boninense* Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

(Identification of Indigenous Rhizobacteria Isolates as Biocontrol Agents Candidate of *Ganoderma boninense* Based on 16S rRNA Gene Sequence)

Yulmira Yanti ^{1*}, Nurbailis ¹, Imam Rifai ²

¹ Program Studi Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Jl. Unand Kampus Limau Manis Kec. Pauh Kota Padang, Telp./Fax.: (0751)72701/(0751)72702, Kode Pos: 25163 dan ² Pascasarjana Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Jl. Unand Kampus Limau Manis Kec. Pauh Kota Padang, Telp./Fax.: (0751)72701/(0751)72702, Kode Pos: 25163

E-mail: yy.anthie79@gmail.com; mira23@agr.unand.ac.id

ARTICLE INFO

Article history

Submitted: January 7, 2020

Accepted: March 19, 2021

Published: May 21, 2021

Keywords:

basal stem rot,
indigenous rhizobacteria,
oil palm,
16S rRNA

ABSTRACT

Rhizobacteria is a group of bacteria that colonize roots, affect growth and control plant pathogens. Based on the results of previous studies, 6 isolates have the best ability to control *Ganoderma boninense* in oil palm seedlings. It is important to characterize them molecularly. Molecular identifications of the selected rhizobacteria isolates were done using the 16S rRNA gene. The results showed that all isolates were identified to have similarity as 5 different species i.e *Bacillus paramycoides*, *Microbacterium paraoxydans*, *B. albus*, *B. cereus*, and *Serratia marcescens* based on NCBI database.



Copyright © 2021 Author(s). This work is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan komoditas tanaman perkebunan sebagai penghasil minyak yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Salah satu kendala dalam budidaya kelapa sawit antara lain gangguan penyakit tanaman (Azizah *et al.*, 2015). Penyakit busuk pangkal batang (BPB) yang disebabkan oleh *Ganoderma boninense* merupakan penyakit utama pada kelapa sawit di Asia Tenggara termasuk Indonesia (Chong *et al.*, 2011). Penyakit ini dilaporkan menyebabkan kerugian sekitar 50–80% per ha (Cooper *et al.*, 2011). Indonesia dan Malaysia merupakan negara dengan kerugian terbesar akibat BPB yang diperkirakan mencapai 500 juta USD.tahun⁻¹ (Ommelna *et al.*, 2012). Penyakit ini sulit dikendalikan, sebab *G. boninense* merupakan patogen tular tanah yang memiliki kisaran inang luas. *G. boninense* juga memiliki struktur bertahan khusus berupa klamidospora dan struktur pseudosklerotia yang mampu menginfeksi inang (Sanderson, 2005; Susanto *et al.*, 2013).

Upaya pengendalian yang telah dilakukan terhadap *G. boninense*, yaitu pengendalian secara fisik melalui teknik sanitasi, serta menggunakan fungisida sintetis belum menunjukkan

hasil yang maksimal karena dapat menyebabkan dampak negatif bagi lingkungan (Idris *et al.*, 2004). Pengendalian biologi patogen tular tanah menggunakan agen hayati yang hidup di rizosfer merupakan salah satu pilhan yang tepat dan potensial untuk dikembangkan dalam budidaya tanaman perkebunan yang ramah lingkungan (Bivi *et al.*, 2010). Mikroorganisme yang sudah banyak dilaporkan sebagai agen hayati adalah rizobakteri dari kelompok *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Beneduzi *et al.*, 2012). Penapisan terhadap sejumlah rizobakteri indigenos dari berbagai lahan ultisol di Sulawesi Selatan dan Tenggara mampu memacu pertumbuhan tanaman dan menghambat patogen tular tanah (Khaeruni *et al.*, 2011). Beberapa rizobakteri yang telah dilaporkan memiliki kemampuan sebagai agen hayati terhadap *G. boninense* antara lain *Pseudomonas*, *Bacillus* sp. dan *Burkholderia* (Suryanto *et al.*, 2012; Buana *et al.*, 2014)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rizobakteri mempunyai kemampuan dalam mengendalikan patogen tanaman secara langsung melalui beberapa cara yaitu produksi antibiotik, siderofor, enzim kitinase, β -1,3-glucanase, sianida, parasitisme, kompetisi sumber nutrisi dan relung ekologi (Glick *et al.*, 2007). Rizobakteri juga memiliki kemampuan melarutkan posfat yang juga dapat meningkatkan ketersediaan nutrisi bagi pertumbuhan tanaman (Chen *et al.*, 2006).

Dalam pengembangan agens hayati, informasi mengenai identitas kandidat agens hayati penting untuk diketahui. Informasi mengenai identitas rizobakteri penting untuk mengetahui penyebaran dan keragamannya (Zahid, *et al.*, 2015). Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara fenotipik, fisiologis, biokimia dan molekuler. Identifikasi bakteri secara fenotipik memiliki kelemahan yaitu tidak stabil terhadap waktu dan dapat berubah akibat kondisi lingkungan seperti media, suhu dan pH (Rossello-Mora dan Amann, 2001). Identifikasi molekuler menggunakan sekuens 16S rRNA merupakan teknik yang baik dan paling banyak digunakan dalam identifikasi spesies bakteri (Petti *et al.*, 2005). Penggunaan sekuens 16S rRNA sebagai metode alternatif identifikasi bakteri semakin meningkat karena hemat biaya dan waktu (Simmon *et al.*, 2008). Analisis sekuens 16S rRNA juga telah banyak dilaporkan dan merupakan metode yang mapan untuk analisis fiogenetik dan studi taksonomi (Tan *et al.*, 2001).

Berdasarkan penelitian sebelumnya (Yanti *et al.*, 2019) diperoleh 6 isolat rizobakteri indigenos dari rizosfer perkebunan kelapa sawit di PTPN IV Kabupaten Simalungun hasil seleksi secara *in planta* dan diketahui memiliki kemampuan terbaik dalam meningkatkan ketahanan bibit kelapa sawit terhadap penyakit BPB. Isolat-isolat tersebut perlu diidentifikasi untuk mengetahui spesiesnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara molekuler isolat rizobakteri indigenos yang telah terseleksi sebagai agens biokontrol *G. boninense*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada Januari-April 2019. Kegiatan meliputi peremajaan dan perbanyak isolat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian sedangkan isolasi DNA dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah inokulum *Ganoderma boninense* koleksi Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan.

Peremajaan Isolat Rizobakteri Indigenos

Sumber isolat rizobakteri indigenos diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan HPT, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas. Isolat yang digunakan yaitu 1) RZ.1A 2.1; 2) RZ2B 1.1; 3) RZ2C 2.1; 4) RZ1E 2.1; 5) RZ2E 1.2; 6) RZ2E 2.1 (Yanti *et al.*, 2019). Isolat tersebut diremajakan dengan metode gores pada medium *Nutrient Agar* (NA) kemudian inkubasi selama 2x24 jam.

Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

Ekstraksi DNA. DNA diekstraksi berdasarkan protokol *Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)*. Untuk melisis sel bakteri gram negatif, pelet isolat RBI disuspensikan dengan 180 μ L larutan *Purelink Genomic Digestion Buffer*, ditambahkan 20 μ L Proteinase K dan dihomogenkan dengan divorteks. Sampel bakteri diinkubasi pada suhu 55 °C dalam oven dan dihomogenkan tiap 10 menit sampai proses lisis selesai (30 menit). Setelah itu 20 μ L RNase A ditambahkan ke *lysate* dan dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu ruangan 2 menit. Setelah itu 200 μ L *Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer* ditambahkan pada *lysate* dan divorteks, kemudian 200 μ L *ethanol* 96-100% ditambahkan *lysate* dan dihomogenkan selama 5 detik. Sementara itu, untuk Bakteri gram positif, pelet bakteri diresuspensi dengan 180 μ L *lysozyme digestion buffer*, dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Sebanyak 20 μ L Proteinase K ditambahkan, dihomogenkan, lalu ditambahkan 200 μ L *PureLink Genomic lysis/binding buffer* dan dihomogenkan serta diinkubasi kembali pada suhu 55 °C selama 30 menit di dalam oven. Sebanyak 200 μ L *ethanol* 96-100% ditambahkan ke *lysate* dan dihomogenkan selama 5 detik. Pengikatan, pencucian dan elusi DNA dilakukan sesuai protocol *Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)*.

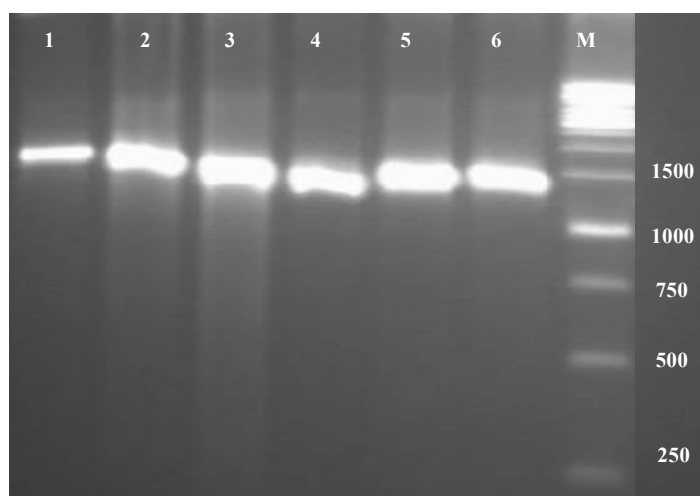
Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA diamplifikasi dengan primer 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG'3) dan primer 1492R (5'CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT '3). Pelaksanaan PCR dilakukan sesuai Protokol *GreenTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific)*. Campuran Reaksi dibuat sesuai protokol untuk masing-masing volume reaksi 25 μ L dengan campuran untuk tiap reaksi yaitu *Master Mix* 12.5 μ L, *Primer Forward* 1 μ L, *Primer Reverse* 1 μ L dan *Nuclease Free Water* 7.5 μ L. Campuran reaksi PCR sebanyak 25 μ L dimasukkan ke dalam microtube 100 μ L dan tiap tube dimasukkan 3 μ L template DNA sampel. Kondisi awal PCR diatur pada suhu 94 °C selama 5 menit, selanjutnya diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 menit, *annealing* pada suhu 55 °C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 2 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit (Chen *et al.*, 2015). Amplifikon dielektroforesis menggunakan agarose gel 1% dalam buffer TAE 1x dan divisualisasi dengan *gel imaging* dan diperoleh pita basa berukuran \pm 1.500 bp. Sequencing dilakukan di *First base* Singapore.

Analisis data sekuens. Data sekuens susunan basa nukleotida dibandingkan dengan *database* BLAST-N secara online pada website NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat rizobakteri yang diuji diidentifikasi secara molekuler dengan gen penyandi 16S rRNA. Amplifikasi gen 16S rRNA dari isolat tersebut dengan primer universal 27F dan 1492R

menunjukkan ukuran basa lebih kurang 1.500 bp (Gambar 1). Panjang pita gen 16S rRNA isolat Rizobakteri indigenos (RBI) menunjukkan kesejajaran dengan *marker* 1.500 bp. Hal ini sesuai dengan pendapat Webster *et al.*, (2003) bahwa penggunaan primer 27F-1492R menghasilkan produk sekitar 1.500 bp, mendekati jumlah basa gen penyandi 16S rRNA secara keseluruhan. Pita DNA amplikon yang mendekati keseluruhan gen 16S ideal untuk dibandingkan dengan database keragaman bakteri. Gen 16S rRNA memiliki beberapa *conserved region* yang umum ditemukan pada banyak spesies bakteri, dan *region* yang beragam dan ditemukan pada beberapa spesies (Fredriksson *et al.*, 2013).



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR berbagai DNA rizobakteri menggunakan pasangan primer 27F dan 1429 R. M) 1Kb DNA marker; 1) RZ.1A 2.1; 2) RZ2B 1.1; 3) RZ2C 2.1; 4) RZ1E 2.1; 5) RZ2E 1.2; 6) RZ2E 2.1

Hasil analisis BLAST isolat RZ1A 2.1 memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus paramycooides* strain MCCC, isolat RZ2B 1.1 memiliki kemiripan 97% dengan *Microbacterium paraoxydans* strain W5, isolat RZ22C 2.1 memiliki kemiripan 100% dengan *Bacillus albus* strain MCCC 1A02146, isolat RZ2E 2.1 memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus cereus* strain JCM 2152, isolat RZ2E 1.2 memiliki kemiripan 99% dengan *Serratia marcescens* strain NBRC 102204, dan isolat RZ1E 2.1 memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Tabel 1).

Sebagian isolat rizobakteri indigenos terseleksi adalah genus *Bacillus*. Bakteri dikenal sebagai genus yang dilaporkan sebagai PGPR dan agens biokontrol. Sebagai contoh, *B. paramycooides* strain KVS27 dilaporkan memiliki kemampuan PGPR yang baik karena memiliki kemampuan melarutkan posfat dan *Indole Acetid Acid* (IAA) bagi pertumbuhan tanaman (Vishwakarma *et al.*, 2018), *B. cereus* strain B-02 dilaporkan mampu melisis sel jamur patogen *Botrytis cinerea* (Li *et al.*, 2012), dan *B. subtilis* strain B10 dilaporkan mampu menekan pertumbuhan *G. boninense* pada bibit kelapa sawit (Bakhtiar *et al.*, 2012). Pengintroduksi *Bacillus* sp. pada bibit kelapa sawit juga diketahui mampu meningkatkan pertumbuhan bibit kelapa sawit dan mampu menekan munculnya gejala BPB pada bibit kelapa sawit (Puspita *et al.*, 2013).

Tabel 1. Hasil analisis BLAST isolat rizobakteri indigenos yang diuji

No.	Isolat	Identitas	No. akses	Kemiripan (%)
1.	RZ1A 2.1	<i>Bacillus paramycoides</i> strain MCCC 1A04098	NR_157734.1	99
2.	RZ2B 1.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain CF36	NR_025548.1	97
3.	RZ2C 2.1	<i>Bacillus albus</i> strain MCCC 1A02146	NR_112354.1	100
4.	RZ2E 2.1	<i>Bacillus cereus</i> strain JCM 2152	NR_113266.1	99
5.	RZ2E 1.2	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC 102204	NR_114043.1	99
6.	RZ1E 2.1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	NR_074540.1	99

Informasi mengenai identitas agens hayati potensial telah banyak dilaporkan. *Serratia marcescens* juga dilaporkan sebagai agens biokontrol yang potensial pada *Pythium ultimum*, *Pyricularia oryzae*, dan *G. boninense* (Jaiganesh et al., 2007; Roberts et al., 2007; Azizah et al., 2015). *Microbacterium paraoxydans* telah dilaporkan memiliki kemampuan sebagai PGPR dan agens biokontrol *Microbacterium paraoxydans* juga telah dilaporkan memiliki kemampuan dalam melarutkan posfat dan juga mampu menghasilkan siderofor yang berpotensi mampu mengendalikan patogen tanaman (Kaur et al., 2011). Bosshard et al. (2003) menyatakan bahwa kesamaan antara 98-99% dari sekuens 16S ditetapkan sebagai spesies baru dalam genus yang sama.

KESIMPULAN

Isolat rizobakteri indigenos diidentifikasi memiliki kemiripan berdasarkan database NCBI sebagai *Bacillus paramycoides* strain MCCC (RZ1A 2.1), *Microbacterium paraoxydans* strain CF36 (RZ2B 1.1), *Bacillus albus* strain MCCC 1A02146 (RZ2C 2.1), *Bacillus cereus* strain JCM 2152 (RZ2E 2.1), *Serratia marcescens* strain NBRC 102204 (RZ2E 1.2), dan *Bacillus cereus* ATCC 14579 (RZ1E 2.1).

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, S. N., Mubarik, N. R., & Sudirman, L. I. (2015). Potential of chitinolytic *Bacillus amyloliquefaciens* SAHA 12 . 07 and *Serratia marcescens* KAHN 15 . 12 as biocontrol agents of *Ganoderma boninense*. *Research Journal of Microbiology*, 10(10), 452–465. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.452.465>
- Bakhtiar, Y., Yahya, S., & Sumaryono, W. (2012). Adaptation of oil palm seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal endosymbiotic bacteria *Bacillus subtilis* B10 towards biotic stress of pathogen *Ganoderma boninense* Pat. *Jurnal Microbiology Indonesia*, 6(4), 157–164. <https://doi.org/10.5454/mi.6.4.3>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 4, 1044–1051.

- Bivi, M. R., Farhana, M. S., Khairulmazmi, A., & Idris, A. (2010). Control of *Ganoderma boninense*: A causal agent of basal stem rot disease in oil palm with endophyte bacteria in vitro. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(6), 833–839.
- Bosshard, P. P., Abels, S., Zbinden, R., Böttger, E. C., & Altwegg, M. (2003). Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4134-4140.
- Buana, R. F. N., Wahyudi, A. T., & Toruan-Mat, N. (2014). Control activity of potential antifungal-producing *Burkholderia* sp. in suppressing *Ganoderma boninense* growth in oil palm. *Asian Journal of Agricultural Research*, 8(5), 259–268. <https://doi.org/10.3923/ajar.2014.259.268>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Chong, K. P., Lum, M. S., Foong, C. P., Wong, C. M. V. L., Atong, M., & Rossall, S. (2011). First identification of *Ganoderma boninense* isolated from Sabah based on PCR and sequence homology. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), 14718–14723. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1096>
- Cooper, R.M, Flood J., Rees R.W. 2011. *Ganoderma boninense* in oil palm plantations: Current thinking on epidemiology, resistance and pathology. *Planter*, 87(1024): 515–52.
- Fredriksson, N. J., Hermansson, M., & Wilén, B. M. (2013). The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PloS one*, 8(10), e76431.
- Glick B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329-39.
- Idris, A., Kushairi, A., Ismail, S., & Ariffin, D. (2004). Selection for partial resistance in oil palm progenies to *Ganoderma* basal stem rot. *J Oil Palm Res.*, 16(2), 12-18.
- Kaur, G., Kaur, J., Dadhich, K. S., & Caemotra, S. S. (2011). Phosphate-solubilizing bacteria *Microbacterium paraoxydans* isolated from the rhizospheric system of wheat (*Triticum aestivum*). *Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res.*, 12, 149–161.
- Khaeruni, A., Sutariati, G. A. K., & Rahman, A.. (2011). Potensi Rizobakteri indigenous Ultisol untuk mengendalikan penyakit busuk batang Phytophthora (*Phytophthora capsici*) pada tanaman cabai. *Jurnal Agroteknos*, 1(1), 9-15.
- Li, F. X., Ma, H. Q., Liu, J., & Zhang, C. (2012). Antagonistic effects of *Bacillus cereus* strain B-02 on morphology, ultrastructure and cytophysiology of *Botrytis cinerea*. *Polish Journal of Microbiology*, 61(2), 119–128.
- Ommelna, B. G., Jennifer, A. N, Chong, K. P. (2012). The potential of chitosan isuppressing *Ganoderma boninense* infection in oil palm seedlings. *JSSM* 7(2):186-19.
- Petti, C. A., Polage, C. R., & Schreckenberger, P. (2005). The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6123-6125.

- Puspita, F, Zul, D., & Khoiri, A. (2013). Potensi *Bacillus* sp. asal rizosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu sebagai rhizobacteria pemacu pertumbuhan dan antifungi pada pembibitan kelapa sawit. Seminar Nasional “Peranan Teknologi dan Kelembagaan Pertanian dalam Mewujudkan Pembangunan Pertanian yang Tangguh dan Berkelanjutan, 2009 (November), 7–15.
- Roberts, D. P., McKenna, L. F., Lakshman, D. K., Meyer, S. L. F., Kong, H., de Souza, J. T., ... Chung, S. (2007). Suppression of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum* with live cells and extracts of *Serratia marcescens* N4-5. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(9), 2275–2288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.029>
- Rosselló-Mora R, & Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25(1):39–67.
- Sanderson, F. R. (2005). An insight into spore dispersal of *Ganoderma boninense* on oil palm. *Mycopathologia*, 159(1), 139–141. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-4436-2>
- Simmon, K. E., Mirrett, S., Reller, L. B., & Petti, C. A. (2008). Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1596-1601.
- Suryanto, D., Wibowo, R. H., Siregar, E. B. M., & Munir, E.. (2012). A possibility of chitinolytic bacteria utilization to control basal stems disease caused by *Ganoderma boninense* in oil palm seedling. *African Journal of Microbiology Research*, 6(9). <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1343>
- Susanto, A., Prasetyo, A. E., Priwiratama, H., Wening, S., & Suriyanto, S. (2013). *Ganoderma boninense* penyebab penyakit busuk batang atas kelapa sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 9(4), 123-123. <https://doi.org/10.14692/jfi.9.4.123>
- Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Müller, P., Ladha, J. K., & Reinhold-Hurek, B. (2001). Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3655-3664.
- Vishwakarma, K., Kumar, V., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2018). Characterization of rhizobacterial isolates from *Brassica juncea* for multitrait plant growth promotion and their viability studies on carriers. *Environmental Sustainability*, 1(3), 253–265. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0026-y>.
- Webster, G., Newberry, C. J., Fry, J. C., & Weightman, A. J. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), 155-164.
- Yanti, Y., Arnetti, A., & Rifai, I. (2019). Penapisan isolat rizobakteri indigenos untuk pengendalian *Ganoderma boninense* pada bibit kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agro Industri Perkebunan*, 7(2), 59-68. <https://doi.org/10.25181/jaip.v7i2.1156>
- Zahid, M., Abbasi, M. K., Hameed, S., & Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00207>