

**Potensi Bakteri Endofit *Ochrobactrum intermedium*-C939A31,
Klebsiella oxytoca-C939A32, *Bacillus subtilis*-I308A32 Asal
Tanaman Kopi untuk Mengendalikan Nematoda Luka Akar
*Pratylenchus coffeae***

The Potential Endophytic Bacteria of *Ochrobactrum intermedium*-
C939A31, *Klebsiella oxytoca*-C939A32, *Bacillus subtilis*-I308A32
Isolated from Coffee Plant for Controlling Root Lesion Nematode
Pratylenchus coffeae

Dwi Halimah, Abdul Munif*, Giyanto
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Salah satu faktor penyebab menurunnya produksi kopi di Indonesia ialah serangan nematoda luka akar *Pratylenchus coffeae*. Pengendalian *P. coffeae* secara biologi dengan pemanfaatan agens hayati merupakan salah satu alternatif yang perlu dikembangkan karena sejalan dengan tuntutan dalam menghasilkan produk yang lebih ramah lingkungan. Penelitian bertujuan mengevaluasi tiga isolat bakteri endofit asal tanaman kopi untuk mengendalikan *P. coffeae*, yaitu *Ochrobactrum intermedium*-C939A31, *Klebsiella oxytoca*-C939A32 dan *Bacillus subtilis*-I308A32. Penelitian meliputi uji patogenisitas melalui reaksi hipersensitif dan hemolisis, kemampuan menekan *P. coffeae* secara *in vitro* dan di rumah kaca. Ketiga isolat bakteri endofit yang diuji tidak bersifat patogen terhadap tanaman maupun manusia. Uji *in vitro* menunjukkan bahwa 2 isolat bakteri endofit, yaitu *K. oxytoca* - C939A32 dan *O. intermedium* - C939A31 dapat menekan populasi *P. coffeae* sebesar 66.7 dan 100%. Pengujian di rumah kaca menunjukkan bahwa kedua isolat juga dapat menekan populasi *P. coffeae*.

Kata kunci: bakteri endofit, reaksi hipersensitif, uji hemolisis, uji patogenisitas

ABSTRACT

Infection of root lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, becomes an important factor causing yield loss in coffee production in Indonesia. Biological control of *P. coffeae* needs to be developed to meet the requirement of environmentally save crop production. The research was conducted to evaluate 3 selected endophytic bacteria isolates (*Ochrobactrum intermedium*-C939A31, *Klebsiella oxytoca*-C939A32, and *Bacillus subtilis*-I308A32) from coffee in controlling *P. coffeae*. Research methods involved pathogenicity test based on hypersensitive reaction and haemolysis test, and evaluation of their ability to suppress *P. coffeae* *in vitro* and *in planta*. The hypersensitive and haemolysis reactions indicated that these 3 isolates showed negative result both to plant and human. *In vitro* assays showed that two isolates, *K. oxytoca*-C939A32 and *O. intermedium*-C939A3, could suppress *P. coffeae* populations by 66.7 and 100%. Those results correlated positively with *in planta* assay's result.

Key words: endophytic bacteria, haemolysis test, hypersensitive reaction, pathogenicity test

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus Dramaga IPB, Bogor 16680
Telp: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, surel: munif73@gmail.com, munif22@yahoo.com

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan penghasil kopi terbesar di dunia setelah Brazil, namun pada beberapa tahun terakhir posisi tersebut tergeser oleh Vietnam. Hal tersebut disebabkan penurunan luas areal dan adanya serangan organisme pengganggu tanaman (OPT). Pada tahun 2009 luas areal pertanaman kopi di Indonesia mencapai 1 266 235 ha dengan produksi 682 591 ton. Angka tersebut menurun pada tahun 2013 menjadi 1 193 149 ha dengan produksi 669 064 ton (Ditjenbun 2014). Salah satu OPT yang memengaruhi produktivitas kopi ialah serangan nematoda, di antaranya *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus coffeae*, dan *Radhopolus similis*. Penurunan produksi akibat serangan nematoda tersebut pada kopi robusta berkisar 28.7–78.4% dan pada kopi arabika menyebabkan tanaman hanya dapat bertahan selama 2 tahun (Nursol *et al.* 2006).

Upaya pengendalian nematoda pada tanaman kopi dapat dilakukan dengan kultur teknis, kimiawi, varietas tahan, dan pengendalian secara biologi. Pengendalian biologi yang banyak diteliti pada saat ini ialah penggunaan bakteri endofit (Hallmann *et al.* 2001). Penggunaan bakteri endofit *Bacillus pumilus* dan *B. mycoides* menekan populasi dan jumlah puru nematoda *M. incognita* pada tanaman kopi (Mekete *et al.* 2009). Eksplorasi bakteri endofit dari beberapa lokasi pertanaman kopi di Jawa Barat dan Lampung dilaporkan oleh Harni dan Khaerati (2013). Tujuan penelitian ini ialah mengevaluasi potensi 3 isolat bakteri endofit terseleksi asal tanaman kopi dari Jawa Timur dan Jawa Barat untuk pengendalian nematoda luka akar *P. coffeae*.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Inokulum *P. coffeae* dan Isolat Bakteri Endofit

Inokulum *P. coffeae* diekstraksi dari akar tanaman kopi yang terserang nematoda parasit dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember. Nematoda diekstrak dengan metode *mist chamber* (Viglierchio dan Schmitt 1983). Nematoda diidentifikasi sebagai nematoda *P.*

coffae digunakan sebagai sumber inokulum pada uji *in vitro* dan di rumah kaca.

Sebanyak 3 isolat bakteri endofit digunakan, yaitu isolat C939A31, C939A32 dan I308A32. Ketiga isolat tersebut diremajakan pada medium *tryptone soya agar* (TSA) dan diidentifikasi berdasarkan sikuen gen 16S rRNA. Isolasi DNA total bakteri endofit mengikuti prosedur GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0722 (Thermo Scientific®, Lithuania). Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan sepasang primer universal, yaitu 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492R (5'-GGT TAC CTT ACG ACT T-3') (Lane 1991). Volume total reaksi untuk PCR ialah 25 µL, terdiri atas 24 µL bahan PCR (MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq polymerase 5 unit per reaksi, 9.5 µL ddH₂O, 1 µL primer 27F 20 pmol, dan 1 µL primer 1492R 20 pmol) dan 1 µL cetakan DNA isolat yang diuji. Program PCR dilaksanakan dengan kondisi sebagai berikut: 1 siklus predenaturasi pada 94 °C selama 3 menit; 30 siklus yang terdiri atas denaturasi 94 °C selama 30 detik, aneling pada 57 °C selama 30 detik, ekstensi pada 72 °C selama 1.5 menit; dan 1 siklus ekstensi akhir pada 72 °C selama 5 menit, serta 4 °C penyimpanan. Produk PCR dikirim ke First BASE Sequencing Singapura untuk proses perunutan. Hasil runutan basa nukleotida gen 16S rRNA dianalisis menggunakan program *basic local allignment search tool* (BLAST) untuk mendapatkan kesamaan data runutan pada GenBank. Selanjutnya tingkat homologi runutan basa nukleotida isolat terpilih dengan spesies lain pada GenBank dianalisis menggunakan program Bioedit®.

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri endofit mirip dengan aksesori pada GenBank, yaitu *Ochrobactrum intermedium* DSQ5 (HM217123.1), *Klebsiella oxytoca* NGB FR 50 (AB749216.1), dan *Bacillus subtilis* AIMST (10.T18.1) berturut-turut sebesar 99.8%, 84.8%, dan 96%. Selanjutnya ketiga isolat tersebut disebutkan sesuai dengan spesies kemiripannya, yaitu *O. intermedium*-C939A31, *K. oxytoca*-C939A32, dan *B. subtilis*-I308A32.

Uji Hipersensitif dan Hemolisis

Tiga isolat bakteri endofit berumur 24 jam dipindahkan dari medium TSA ke medium *tryptone soya broth* (TSB), diinkubasi dan digoyang pada kecepatan 100 rpm selama 24 jam atau hingga mencapai kerapatan 10^8 – 10^9 cfu mL⁻¹. Uji hipersensitif dilakukan dengan menyuntikkan 2 mL suspensi bakteri endofit pada bagian bawah lamina daun tembakau sehat. Selanjutnya tanaman diinkubasi selama 24–48 jam dan sebagai kontrol tanaman disuntik dengan air steril. Pengamatan dilakukan terhadap terjadinya klorosis/nekrosis pada daun.

Bakteri endofit yang menunjukkan reaksi negatif pada uji hipersensitif diuji kemampuannya dalam menghidrolisis butir darah merah. Biakan bakteri umur 24 jam ditumbuhkan pada medium agar-agar darah, kemudian diinkubasi selama 24 jam dan diamati terbentuknya zona bening (Khusnan *et al.* 2008).

Pengaruh Bakteri Endofit terhadap Mortalitas *P. coffeae* secara *in Vitro*

Nematoda uji disiapkan mengikuti prosedur penyiapan inokulum *P. coffeae*. Pengujian *in vitro* dilakukan mengikuti metode Harni dan Khaerati (2013). Bakteri endofit dibiakkan dalam 100 mL medium TSB dan digoyang dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Selanjutnya suspensi bakteri disentrifugasi pada kecepatan 6500 rpm, supernatannya disaring dengan kertas milipore dengan ukuran pori 0.2 µm.

Supernatan bakteri endofit diuji penekanan-nya terhadap *P. coffeae*. Sebanyak ± 50 ekor *P. coffeae* dimasukkan ke dalam 5 mL supernatan pada suhu ruang dan diamati persentase mortalitas setelah 24 jam. Nematoda yang diperlakukan dengan air dan medium TSB steril digunakan sebagai kontrol.

Pengujian disusun dengan rancangan acak lengkap. Tiga isolat bakteri endofit yang diuji dan sebagai kontrol ialah air dan medium TSB steril diulang sebanyak 3 kali.

Pengaruh Bakteri Endofit dalam Mengendalikan *P. coffeae* dan Memacu Pertumbuhan Tanaman

Pengujian dilakukan mengikuti metode Harni dan Khaerati (2013) yang dimodifikasi. Bakteri endofit sebanyak 1 ose ditumbuhkan dalam 200 mL medium TSB dan digoyang dengan kecepatan 100 rpm selama 4 hari pada suhu kamar. Sebelum aplikasi, bakteri disuspensikan dalam akuades steril dan diukur kerapatan populasinya hingga mencapai 10^9 cfu mL⁻¹. Tanaman kopi robusta klon BP936 umur ±5 bulan diberi perlakuan bakteri endofit dengan menyiramkan 100 mL suspensi bakteri endofit per tanaman dalam medium tanam steril (tanah:pasir, 2:1) sebanyak 1.5 kg tiap pot kantong plastik. Tanaman kopi yang diberi perlakuan akuades steril digunakan sebagai kontrol. Inokulasi nematoda dilakukan dengan menuangkan suspensi nematoda di sekeliling tanaman pada kedalaman 1 cm sebanyak 500 ekor per tanaman 2 minggu setelah perlakuan bakteri endofit. Dua bulan setelah inokulasi, tanaman dibongkar, akar dicuci, dan dikeringanginkan.

Pengamatan dilakukan dengan menghitung faktor reproduksi (pf/pi) nematoda, yaitu perbandingan antara populasi akhir dengan populasi awal nematoda. Nematoda pada akar diekstraksi dengan metode pengabutan, sedangkan nematoda dalam tanah diisolasi dengan metode sentrifugasi. Pertumbuhan tanaman diamati dengan mengukur tinggi tanaman, bobot basah serta bobot kering batang dan akar pada akhir pengamatan. Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap, tiap perlakuan diulang 4 kali dan setiap ulangan terdiri atas 4 unit pengamatan.

Karakterisasi Fisiologi

Pengujian karakter fisiologis bakteri endofit dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri endofit sebagai agens biokontrol, yaitu melalui pengujian aktivitas kitinolitik (Marin *et al.* 2013), proteolitik (Denizci *et al.* 2004), lipolitik menggunakan medium *rhodamin-B-agar*, kemampuan pelarutan fosfat (Gupta *et*

al. 2012), dan fiksasi nitrogennya (Yim *et al.* 2009).

HASIL

Bakteri endofit yang digunakan yaitu *O. intermedium* (C939A31), *K. oxytoca* (C939A32), dan *B. subtilis* (I308A32) tidak bersifat patogen terhadap tanaman maupun mammalia. Ketiganya dapat menekan populasi *P. coffeae* hingga 66.7, 100, dan 77.9% dibandingkan dengan kontrol sebesar 0%.

Pengaruh Bakteri Endofit dalam Menekan Populasi *P. coffeae* dan Memacu Pertumbuhan Tanaman.

Hidrolisis protein, lipid dan kitin pada *O. intermedium*-C939A31, serta sifat lipolisis

pada *K. Oxytoca*-C939A32 mampu membantu menekan *P. coffeae* hingga 62 dan 69.1%. Meskipun dapat menghidrolisis kitin dan lipid, namun *P. coffeae* masih dapat berkembang biak pada isolat *B. subtilis*-I308A32 (Tabel 1 dan 2). Penekanan populasi *P. coffeae* didukung oleh kemampuan isolat uji dalam memacu pertumbuhan tanaman. Dari ketiga isolat uji, *O. intermedium*-C939A31 paling dominan dalam meningkatkan berat basah, berat kering dan tinggi tanaman, diikuti *K. oxytoca*-C939A32 dan *B. subtilis*-I308A32 (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Hasil pengujian terhadap 3 isolat bakteri terpilih menunjukkan bahwa sebagai agens

Tabel 1 Pengaruh 3 isolat bakteri endofit terseleksi asal tanaman kopi terhadap populasi *P. coffeae* secara *in vitro* dan di rumah kaca

Perlakuan	Pengujian di rumah kaca			
	Populasi Awal	Populasi Akhir*	Pf/Pi	% Penekanan Populasi
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	500	458.3	0.92	62.0 a
<i>Klebsiella oxytoca</i>	500	372.9	0.75	69.1 a
<i>Bacillus subtilis</i>	500	1036.3	2.10	14.0 b
Kontrol	500	1205.4	2.40	0.0 c

*Rerata dari 4 ulangan

Angka dalam kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%.

Tabel 2 Karakter fisiologis 3 isolat bakteri endofit terseleksi asal tanaman kopi

Perlakuan	Kitinolitik	Proteolitik	Lipolitik	Pelarutan P	Fiksasi N
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	+	+	+	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	+	+
Kontrol	-	-	-	-	-

+, bereaksi positif pada pengujian yang dilakukan; -, bereaksi negatif pada pengujian yang dilakukan; P: fosfat; N, nitrogen.

Tabel 3 Pengaruh 3 isolat bakteri endofit asal tanaman kopi terhadap pertumbuhan tanaman kopi di rumah kaca pada minggu ke-8 setelah inokulasi *P. coffeae*

Perlakuan	Bobot basah (g)		Bobot kering (g)		Tinggi Tanaman (cm)
	Batang	Akar	Batang	Akar	
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	39.7 a	33.4 a	14.1 a	6.7 a	56.0 a
<i>Klebsiella oxytoca</i>	38.9 a	31.7 ab	13.4 a	6.3 a	53.9 a
<i>Bacillus subtilis</i>	38.7 a	33.4 a	12.7 ab	6.2 a	51.3 ab
Kontrol	32.0 b	26.61 b	10.9 b	6.4 a	47.5 b

Angka dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%.

biokontrol, isolat tersebut tidak bersifat patogen bagi tanaman maupun manusia, sehingga lebih aman untuk pengembangannya. Hasil pengujian *in vitro* menunjukkan bahwa ketiga isolat dapat menekan populasi *P. coffeae*. Hasil uji *in vitro* tersebut sejalan dengan hasil pengujian di rumah kaca, meskipun urutan penekanan terbaik tidak selaras. Penekanan populasi nematoda oleh isolat *K. oxytoca*-C939A32 (100%) lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Harni dan Khaerati (2013) yang kemampuan penekanannya sebesar 5–80 %. Nilai faktor reproduksi yang kecil menghasilkan penekanan nematoda yang semakin besar (Harni dan Khaerati 2013).

Penurunan populasi *P. coffeae* pada akar kopi disebabkan bakteri endofit dapat menekan penetrasi dan reproduksi nematoda di dalam akar (Sikora *et al.* 2007), serta menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat nematisidal (Harni dan Khaerati 2013). Metabolit sekunder dari bakteri endofit yang dapat menekan populasi nematoda, di antaranya enzim hidrolitik (kitinase, protease, lipase). Aktivitas enzim kitinase, protease, dan lipase dapat mengendalikan nematoda melalui mekanisme antibiosis (Lobna dan Zawam 2010; Moghaddam *et al.* 2014). Permukaan eksternal nematoda merupakan lapisan ekstraseluler yang terdiri atas kolagen kutikula yang fleksibel, epikutikula yang diperkaya lipid dan *surface-coat* yang diperkaya glikoprotein (Chisholm dan Xu 2012). Bagian tersebut merupakan target enzim hidrolisis, seperti kitinase, protease, dan lipase. Enzim kitinase dilaporkan dapat menghambat penetasan telur nematoda *M. incognita* (Lobna dan Zawam 2010), sedangkan enzim protease dan lipase dapat mendegradasi tubuh juvenil, telur dan massa telur nematoda *M. incognita* (Lobna dan Zawam 2010; Mendoza *et al.* 2008; Tian *et al.* 2009), menghambat mortalitas, penetasan telur, dan membunuh *M. javanica* (Moghaddam *et al.* 2014).

Selain menunjukkan penekanan tertinggi terhadap *P. coffeae*, isolat *K. oxytoca*-C939A32 dan *O. intermedium*-C939A31 juga menunjukkan pemacuan pertumbuhan tanaman kopi yang terbaik. Kondisi vigor

tanaman yang lebih jagur dengan batang dan akar yang lebih banyak menjadikan tanaman lebih sehat sehingga lebih tahan terhadap serangan patogen. Gupta *et al.* (2012) menyebutkan bahwa perlakuan bakteri endofit dapat meningkatkan bobot basah biomassa tanaman. Hal tersebut didukung dengan kemampuan isolat *O. intermedium*-C939A31 dalam memfiksasi nitrogen dan isolat *K. oxytoca*-C939A32 dalam melarutkan fosfat maupun memfiksasi nitrogen. Jha dan Kumar (2007) menyebutkan bahwa *K. oxytoca*-GR3 sebagai bakteri endofit diatrozof mampu melarutkan fosfat dan memfiksasi nitrogen, dan hal tersebut diidentifikasi sebagai penunjang kemampuannya dalam memacu pertumbuhan tanaman. Dalam sistem taksonomi, bakteri genus *Ochrobactrum* termasuk dalam ordo Rhizobiales. Bakteri dari ordo Rhizobiales banyak dilaporkan sebagai kelompok bakteri pelarut P dan penambat N (Mahal *et al.* 2014), misalnya *O. intermedium* isolat C7HL1 pada tebu (Muangthong *et al.* 2015) dan *O. intermedium* KC010521 serta KC010522 dari sorgum dan jagung. Bakteri genus *Klebsiella* juga dilaporkan sebagai bakteri penambat nitrogen (Chen *et al.* 2013). Ikeda *et al.* (2010) menyebutkan bahwa kemampuan memfiksasi dan memobilisasi nitrogen, serta pelarutan fosfat dapat berperan dalam memacu pertumbuhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen M, Lin L, Zhang Y, Sun L, An Q. 2013. Genome sequence of *Klebsiella oxytoca* SA2, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from the pioneer grass *Pennisetum polyanthes*. Genome Announc. 1(4):e00601–13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00601-133>.
- Chisholm AD, Xu S. 2012. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles. WIREs Dev Biol. 1(6):879–902. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/wdev.77>.
- Denizci AA, Kazan D, Abeln EC, Erarslan A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer

- capable to grow under highly alkaline conditions. *J Appl Microbiol.* 96:320–327. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02153.x>.
- [Ditjenbun] Direktorat Jenderal Perkebunan Pertanian. 2014. Luas Tanam, Produksi dan Produktivitas Kopi Menurut Provinsi Tahun 2009-2013. <http://www.ditjenbun.pertanian.go.id/>. [diakses pada 14 Maret 2015].
- Gupta M, Kiran S, Gulati A, Singh B, Tewari R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis*. *Microbiol Res.* 167:358–363. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.004>.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Miller WG, Sikora RA, Lindow SE. 2001. Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology.* 91:415–422. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.4.415>.
- Harni R, Khaerati. 2013. Evaluasi bakteri endofit untuk pengendalian nematoda *Pratylenchus coffeae* pada tanaman kopi. *Bull Ristri.* 4(2):109–116.
- Ikeda S, Okubo T, Anda M, Nakashita H, Yasuda M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Eda S, Momiyama A, Terasawa K, Mitsui H, Minamisawa K. 2010. Community and genome based views of plant associated bacteria: plant bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51(9):1398–1410. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcq119>.
- Jha PN, Kumar A. 2007. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *J Appl Microbiol.* 103: 1311–1320. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03383.x
- Khusnan, Salasia SIO, Soegiyono. 2008. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi fenotip bakteri *Staphylococcus aureus* dari limbah penyembelihan dan karkas ayam potong. *J Vet.* 9(1):45–51.
- Lane, DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Di dalam: Stackebrandt E, Goodfellow M, editor. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic.* New York (US): Willey. Hlm 115–175.
- Lobna M, Zawam H. 2010. Efficacy of some biocontrol agents on reproduction and development of *Meloidogyne incognita* infecting tomato. *J American Sci.* 6(11):495–509.
- Mahal R, Schicklberger M, Chakraborty M. 2014. Isolation and classification of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. The University of California. <http://www.e3s-center.org/> [diakses 2015 Des 11].
- Marin M, Wong I, Mena J, Moran R, Pimentel E, Sanchez I, Basulto R, Moreira A. 2013. *Zea mays* L. plant-growth promotion by *Tsukamurella paurometabola* strain C-924. *Biotechnología Aplicada.* 30(2):105–110.
- Mekete T, Hallmann J, Hallmann K, Sikora R. 2009. Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. *Nematology.* 11(1):117–127. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/156854108X398462>.
- Mendoza AR, Kiewnick S, Sikora RA. 2008. In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocont Sci Tech.* 18:377–389. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09583150801952143>.
- Moghaddam MR, Moghaddam EM, Ravari SB, Rouhani H. 2014. The first report of *Bacillus pumilus* influence against *Meloidogyne javanica* in Iran. *J Crop Prot.* 3(1):105–112.
- Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B. 2015. Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical Life Sci Res.* 26(1):41–51.
- Ngoma L, Mogatlanyane K, Babalola OO. 2014. Screening of Endophytic Bacteria towards the Development of Cottage Industry: An in Vitro Study. *J Hum Ecol.* 47(1): 45–63.

- Nursol M, Syahnen, Ida Roma TUS. 2006. Pengaruh Pemberian Kompos dan Ekstrak Daun Nimba, Pinang Muda dan Tembakau Terhadap Perkembangan Nematoda Akar Kopi. Medan (ID): Balai Pengembangan Proteksi Tanaman Perkebunan (BP2TP) Sumatera Utara, Medan.
- Sikora RA, Schafer K, Dababat AA. 2007. Modes of actions associated with microbially induced in-plant suppression of plant-parasitic nematodes. *Aust Plant Pathol* 36:124–134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/AP07008>.
- Tian BY, Ke CR, Huang W, Zhang KQ, Huang JZ. 2009. Direct visualization bacterial infection process in nematode hosts by an improved immunocytochemical method. *World J Microbiol Biotech*. 25:909–912. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9945-6>.
- Vigliorchio DR, Schmith RV. 1983. On the methodology of nematode extraction from field samples: comparison of methods for soil extraction. *JON*. 15(3):450–454.
- Yim WJ, Poonguzhali S, Madhaiyan M, Palaniappan P, Siddikee M, Sa T. 2009. Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. *J Microbiol*. 47(2):147–155. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-008-0201-4>.