

Optimasi Proses Fermentasi Senyawa Antijamur *Bacillus subtilis* CAF3 Terhadap *Athelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr

Syukria Ikhsan Zam^{1*}, Irwan Taslapratama², Yusmar³, Dewi Febrina⁴ 

^{1,2,3}Program Studi Agroteknologi, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau, Pekanbaru, Indonesia

⁴Program Studi Peternakan, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau, Pekanbaru, Indonesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received August 11, 2022

Revised August 12, 2022

Accepted January 14, 2023

Available online April 25, 2023

Kata Kunci:

Antifungi, *Bacillus subtilis*, *Athelia rolfsii*, efektivitas.

Keywords:

Anti-fungal, *Bacillus subtilis*, *Athelia rolfsii*, effectiveness.



This is an open access article under the [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.

Copyright © 2023 by Author. Published by Universitas Pendidikan Ganesha.

ABSTRAK

Bacillus subtilis CAF3 adalah bakteri endofit yang potensial dalam menghasilkan senyawa antifungi. Bakteri ini memiliki senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan *Athelia rolfsii*. Produksi senyawa antifungi tersebut dapat ditingkatkan dengan melakukan optimasi pada proses fermentasinya. Pada penelitian ini dilakukan pemilihan media fermentasi, optimasi konsentrasi inokulum, optimasi pH awal media dan optimasi agitasi, selain itu juga dilakukan uji bioaktivitas ekstrak hasil fermentasi serta identifikasi senyawa dengan menggunakan LC/MS. Hasil penelitian menunjukkan hasil fermentasi *B. subtilis* CAF3 memiliki daya hambat tertinggi terhadap *A. rolfsii* pada media tryptic soy broth (90,59%), konsentrasi inokulum 5% (90,59%), pH awal media 7 (90,59%) dan agitasi 110 rpm (90,59%). Ekstrak etil asetat menghasilkan jumlah senyawa terbanyak (228 mg/L) dan memiliki bioaktivitas tertinggi (100%). Hasil LC/MS menunjukkan terdapat empat senyawa yang berbeda yaitu: T1.86 (392 m/z), T2.24 (261,59 m/z), T2.67 /mL (436,04 m/z) dan T3.28 (282,23 m/z). Fermentasi senyawa antifungi oleh *B. subtilis* CAF3 terhadap *A. rolfsii* optimum pada medium TSB, konsentrasi inokulum 5%, pH awal media 7 dan agitasi 110 rpm. Senyawa yang dihasilkan oleh strain ini merupakan senyawa yang berbeda dengan senyawa yang umum dihasilkan oleh *B. subtilis*.

ABSTRACT

Bacillus subtilis CAF3 is an endophytic bacterium that has the potential to produce antifungal compounds that can inhibit the growth of *Athelia rolfsii*. The production of the antifungal compounds can be increased by optimizing the fermentation process. In this study, the selection of fermentation media, optimization of inoculum concentration, the initial pH of the media, and agitation were applied along with the bioactivity test of fermented extracts and identification of compounds using LC/MS. The results showed that fermentation by *B. subtilis* CAF3 had the highest inhibition against *A. rolfsii* in tryptic soy broth (90.59%) with pH 7 (90.59%), 5% inoculum concentration (90.59%), and 110 rpm agitation (90.59%). Ethyl acetate extract was the dominant compound (228 mg/L) and had the highest bioactivity (100%). The LC/MS results showed four compounds from the ethyl acetate extract that were T1.86 (392 m/z), T2.24 (261.59 m/z), T2.67/mL (436.04 m/z), and T3.28 (282.23 m/z). Fermentation of antifungal compounds by *B. subtilis* CAF3 against *A. rolfsii* was optimum in TSB medium, 5% inoculum concentration, at 7 initial pH of medium and 110 rpm agitation. The compounds produced by this strain was different from the compounds commonly produced by *B. subtilis*.

1. PENDAHULUAN

Athelia rolfsii (Curzi) C.C. Tu & Kimbr. sebelumnya dikenal sebagai *Sclerotium rolfsii* Sacc. adalah fungi fitopatogen yang tersebar luas di alam. Fungi ini dapat menginfeksi tanaman pangan, bahan pangan mentah dan produk olahan, sehingga mengakibatkan kerugian ekonomi dan juga keamanan pangan. Oleh karena itu fungi ini perlu dikendalikan. Salah satu opsi pengendalian yang ramah lingkungan adalah dengan menggunakan mikroorganisme antagonis (Zhao et al., 2011). Beberapa mikroorganisme dilaporkan memiliki aktivitas antagonis dan dapat menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan (Rautela et al., 2014). Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang banyak dilaporkan memiliki aktivitas antagonis terhadap fungi fitopatogen (Dalal & Kulkarni, 2013). Salah satu genus bakteri yang ditemukan sebagai endofit adalah *Bacillus*. Genus ini diketahui memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa antimikroba yang kuat (Li et al., 2014) dan dapat dimanfaatkan dalam perlindungan tanaman (Chung et al., 2008; Hadiwiyono & Widono, 2012). Salah satu anggota genus *Bacillus* yang banyak dilaporkan sebagai bakteri endofit adalah *B. subtilis*. Spesies ini dapat menghasilkan senyawa antifungi dengan spektrum yang luas, sehingga potensial dikembangkan sebagai pengendali fitopatogen (Ahmad et al., 2019; Awan & Shoaib, 2019). *B. subtilis* CAF3 merupakan salah satu strain bakteri endofit yang

*Corresponding author.

E-mail addresses: syukria.ikhsan.zam@uin-suska.ac.id (Syukria Ikhsan Zam)

berhasil diisolasi dari daun *Citrus aurantifolia* Swingle. Bakteri ini memiliki aktivitas antifungi terhadap *A.rolfsii* (Zam et al., 2019; Ahmad et al., 2019). Penemuan dan pengembangan senyawa antifungi fitopatogen sangat penting untuk diteliti, agar diperoleh senyawa yang sangat efektif dan memiliki toksisitas yang rendah terhadap manusia dan ramah lingkungan (Thomashow, Bonsall, & Weller, 2008). Hal tersebut dapat dicapai dengan melakukan optimasi dalam proses fermentasi yang meliputi: pemilihan media, konsentrasi inokulum, pH awal medium dan agitasi. Proses optimasi fermentasi dan identifikasi senyawa antifungi oleh strains ini belum pernah dilaporkan, sehingga perlu diteliti. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dalam proses fermentasi karena masih menggunakan labu kocok. Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat dilanjutkan dengan melakukan optimasi proses fermentasi dengan menggunakan fermentor untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal.

2. METODE

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sterilisasi alat dan bahan. Bahan dan alat tahan panas disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Peralatan yang tidak tahan panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol 90%, sedangkan untuk bahan cair hasil fermentasi disterilisasi dengan menggunakan membran filter 0,2 µm. Pembuatan sumber inokulum dilakukan dengan mengadaptasikan isolat pada medium *tryptic soy broth* (TSB). Adaptasi dilakukan dengan cara menginokulasikan satu Ose biakan murni isolat *B. subtilis* CAF3 dari medium *tryptic soy agar* (TSA) miring ke dalam Labu Erlenmeyer berisi 10 mL medium TSB, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 27°C dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam. Hasil adaptasi selanjutnya diinokulasikan sebanyak 5% (v/v) dengan jumlah sel 10⁶ CFU/mL ke dalam Labu Erlenmeyer berisi medium TSB dan diinkubasikan pada suhu 27°C dengan agitasi 120 rpm selama 10 jam dan selanjutnya digunakan dalam tahapan optimasi.

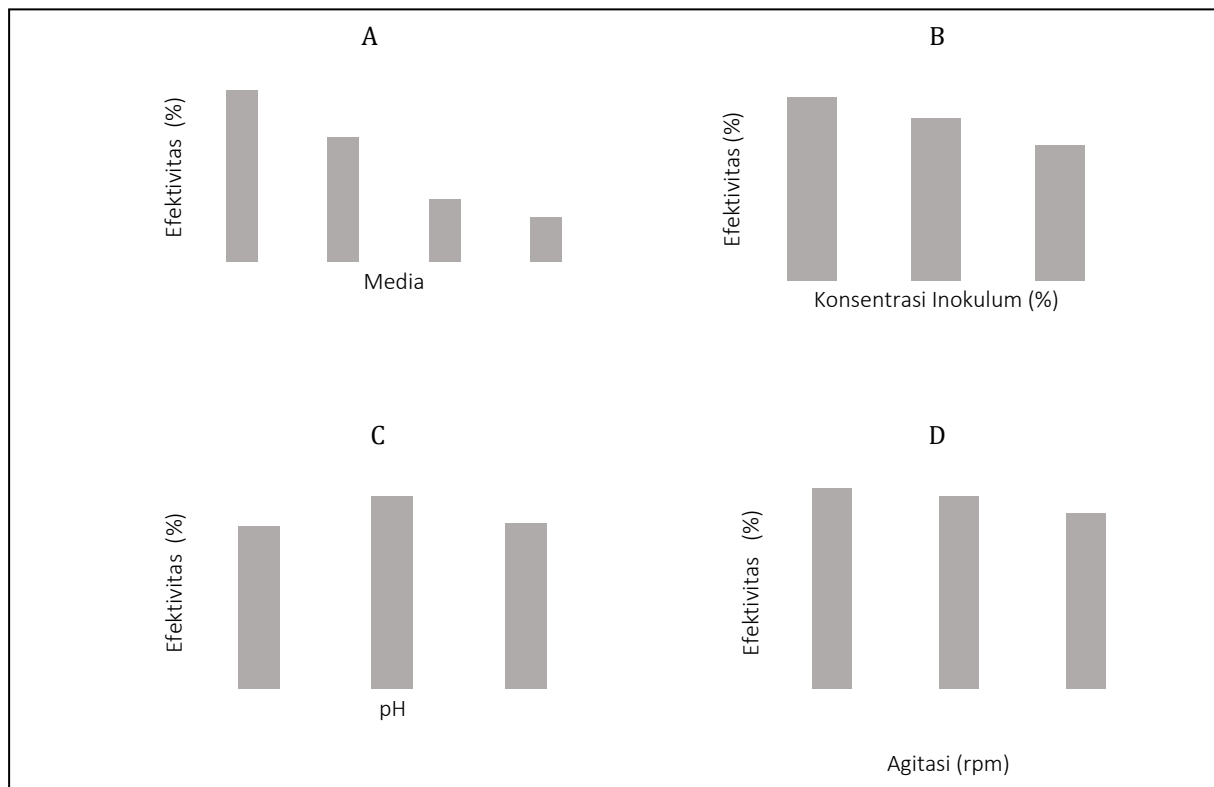
Optimasi proses fermentasi dilakukan secara bertingkat. Optimasi yang dilakukan meliputi: 1) Pemilihan media. Media yang digunakan, yaitu: TSB, Luria-Berthani (LB), glukosa tepung kedelai (GTK) dan rendaman jagung (RJ) steril dengan pH 7,0. Proses fermentasi dimulai dengan menginokulasikan 5% (v/v) inokulum dengan jumlah sel 10⁶ CFU/mL ke dalam labu Erlenmeyer berisi media yang akan digunakan dalam proses fermentasi dan diinkubasikan pada suhu 27°C dengan agitasi 120 rpm; 2) Konsentrasi inokulum. Optimasi dilakukan dengan menggunakan inokulum dengan konsentrasi 5, 10 dan 15%. Masing-masing konsentrasi dengan jumlah sel 10⁶ CFU/mL ditambahkan ke dalam Labu Erlenmeyer yang berisi media TSB steril dengan pH 7,0, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 27°C dengan agitasi 120 rpm; 3) pH awal media. pH awal media TSB diatur pada nilai 6,0; 7,0 dan 8,0. Penurunan nilai pH dilakukan dengan penambahan HCl 0,1M, sedangkan peningkatan nilai pH dilakukan dengan penambahan NaOH 0,1M. Labu Erlenmeyer yang berisi media TSB steril dengan pH yang telah ditetapkan, selanjutnya diinokulasikan dengan inokulum sebanyak 5% (v/v) dengan jumlah sel 10⁶ CFU/mL dan diinkubasikan pada suhu 27°C dengan agitasi 120 rpm; dan 4) Agitasi. Proses optimasi agitasi dilakukan dengan cara menginokulasikan inokulum ke dalam Labu Erlenmeyer yang berisi medium TSB dengan pH 7,0 sebanyak 5% (v/v) dengan jumlah sel 10⁶ CFU/mL. Masing-masing medium yang telah berisi inokulum *B. subtilis* CAF3 tersebut kemudian diinkubasikan pada agitasi yang berbeda (110, 120 dan 130 rpm) pada suhu 27°C. Pada setiap tahapan optimasi dilakukan pengukuran efektivitas hambatan filtrat hasil fermentasi terhadap *A. rolfsii*. Pengukuran efektivitas hambatan filtrat hasil fermentasi terhadap *A. rolfsii* menggunakan *food poisoning technique* (Kambar, Manasa, Vivek, & TR, 2014) dengan konsentrasi filtrat 5% (v/v) di dalam PDA. (Nor Irham Nor Azan et al., 2020).

Hasil fermentasi selanjutnya diekstraksi. Ekstraksi senyawa dilakukan dengan merujuk (de Melo et al. (2009) yang dimodifikasi. Hasil fermentasi disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 45 menit dan supernatan yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi bertingkat dengan heksana, diklorometan dan etil asetat (1:1) menggunakan labu pemisah dan diulang sebanyak tiga kali. Masing-masing fraksi organik diambil dan dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat dan dievaporasikan dengan *rotary evaporator*. Hasil ekstraksi yang telah kering kemudian ditimbang dan diuji bioaktivitasnya terhadap *A. rolfsii* menggunakan *food poisoning technique* (Kambar et al., 2014) dengan konsentrasi ekstrak 0,1% (v/v) di dalam PDA. Ekstrak yang memiliki efektivitas tertinggi selanjutnya diidentifikasi dengan LC-MS. Ekstrak dari fraksi etil asetat diidentifikasi dengan LC-MS. LC-MS yang digunakan adalah *Mariner Biospectrometry* yang dilengkapi dengan pompa biner. HPLC dihubungkan dengan *Q-tof mass spectrometer* dan dilengkapi dengan sumber ESI. Mode *fullscan* dari 100 sampai 1200 *m/z* dilakukan pada suhu 140°C. Kolom HPLC yang digunakan untuk analisis adalah Phenomenex 5µ C8, 150 × 2 mm. Pelarut yang digunakan adalah metanol 80% dengan 0,3% asam format. Pelarut dihantarkan dengan laju alir 0,2 mL/min. Pelarut berjalan dengan elusi isokratik.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

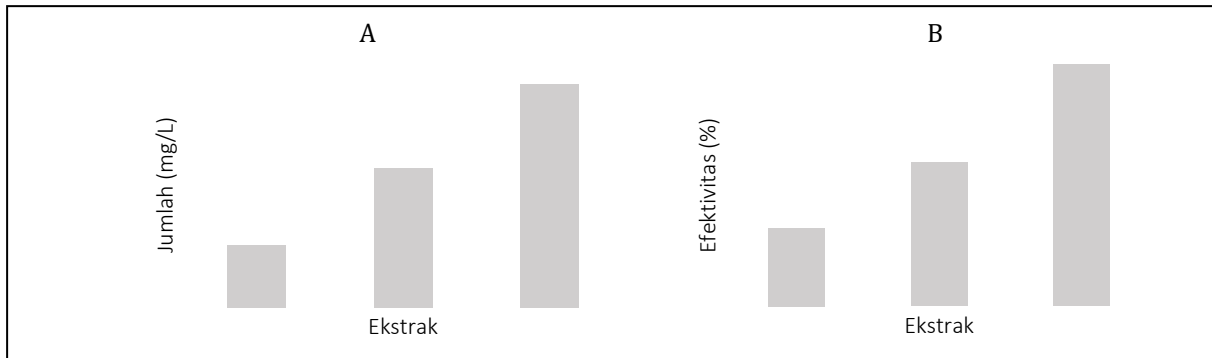
Hasil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium fermentasi, konsentrasi inokulum, pH awal medium dan agitasi berpengaruh terhadap produksi senyawa antifungi. Hal tersebut diperlihatkan oleh data efektivitas hambatan terhadap *A. rolfsii* dari filtrat yang diujikan. Efektivitas hambatan filtrat hasil fermentasi *B. subtilis* CAF3 terhadap *A. rolfsii* pada pemilihan media berkisar antara 23,53–90,59%, dapat dilihat pada **Gambar 1A**. Efektivitas hambatan tertinggi diperoleh pada medium TSB sebesar 90,59%, diikuti oleh medium LB sebesar 65,88%, medium GTK sebesar 32,93% medium RJ sebesar 23,53%. Hasil optimasi konsentrasi inokulum menunjukkan bahwa, peningkatan konsentrasi menurunkan efektivitas hambatan filtrat hasil fermentasi terhadap pertumbuhan *A. rolfsii*. Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi inokulum 5% memiliki efektivitas hambatan sebesar 90,59%, konsentrasi inokulum 10% memiliki efektivitas hambatan sebesar 80,00% dan konsentrasi 15% memiliki efektivitas hambatan sebesar 66,71%. Hasil ini dapat dilihat pada **Gambar 1B**. Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa pH awal medium mempengaruhi efektivitas hambatan filtrat hasil fermentasi. Hal tersebut diperlihatkan oleh efektivitas hambatan pada pH 7 sebesar 90,59; diikuti oleh pH 8 sebesar 77,65% dan pH 6 sebesar 76,47%, dapat dilihat pada **Gambar 1C**. Produksi senyawa antifungi terhadap *A. rolfsii* oleh *B. subtilis* CAF3 juga dipengaruhi oleh agitasi. Hal ini terlihat bahwa agitasi 110 rpm memberikan efektivitas hambatan tertinggi sebesar 94,12%; diikuti oleh agitasi 120 rpm sebesar 90,54% dan agitasi 130 rpm sebesar 82,35%, dapat dilihat pada **Gambar 1D**.



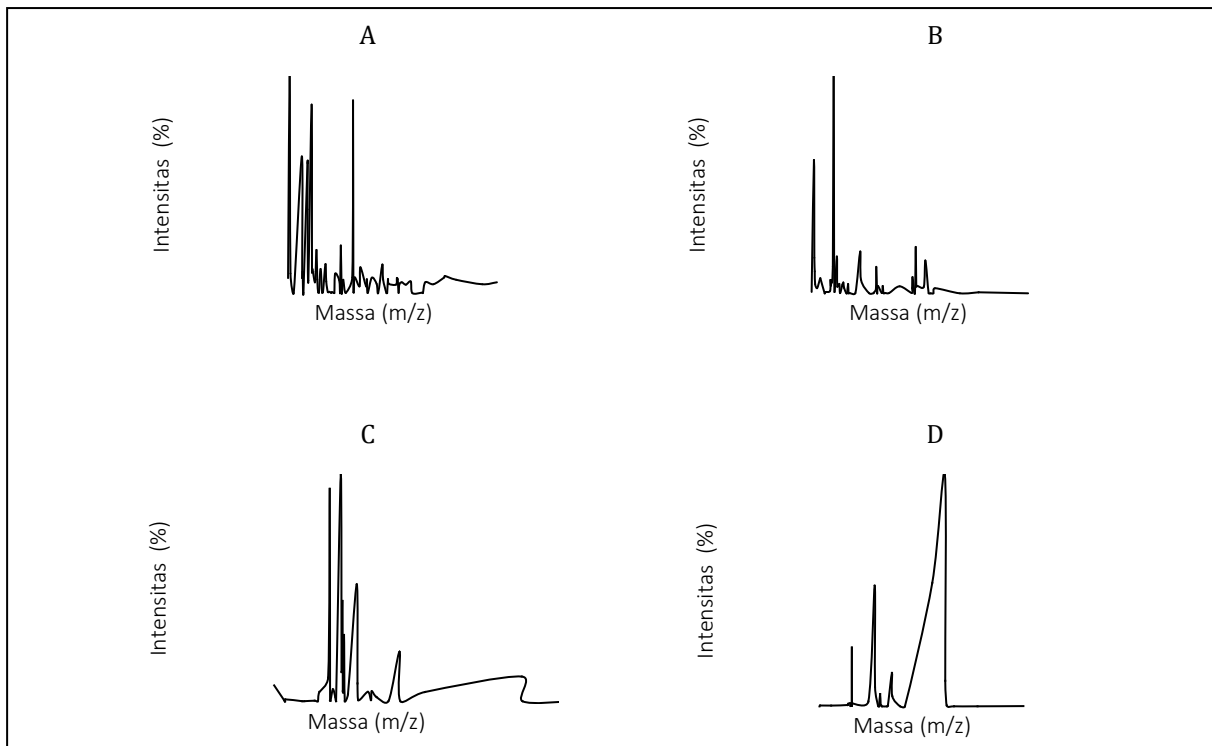
Gambar 1. Efektivitas Hambatan Terhadap Pertumbuhan *A. rolfsii* pada Optimasi Proses Fermentasi. a. Pemilihan Media; b. Konsentrasi Inokulum; c. pH Awal Media; d. Agitasi

Untuk Ekstrak etil asetat memiliki jumlah ekstrak terbanyak, diikuti oleh ekstrak diklorometan dan ekstrak n-heksana berturut-turut yaitu 228 mg/L, 142 mg/L dan 64 mg/L, hasil ini dapat dilihat pada **Gambar 2A**. Hasil uji bioaktivitas menunjukkan ekstrak etil asetat memiliki bioaktivitas tertinggi terhadap *A. rolfsii* sebesar 100%, diikuti oleh ekstrak diklorometan sebesar 59,50% dan ekstrak n-heksana sebesar 32,40%, Hasil ini dapat dilihat pada **Gambar 2B**.



Gambar 2. Ekstrak Hasil Fermentasi dengan Menggunakan Pelarut Heksana, Diklorometan dan Etil Asetat. a. Jumlah Ekstrak yang Diperoleh; b. Efektivitas Hambatan

Hasil LC-MS menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki empat senyawa. Spektre ESI memperlihatkan senyawa yang dihasilkan memiliki berat yang berbeda, dapat dilihat pada Gambar 3. Senyawa T1.86 memiliki berat senyawa 392 m/z dengan konsentrasi 58 ng/mL, hasil ini dapat dilihat pada Gambar 3A, senyawa T2.24 memiliki berat senyawa 261,59 m/z dengan konsentrasi 52 ng/mL dapat dilihat pada Gambar 3B, senyawa T2.67 memiliki berat senyawa 436,04 m/z dengan konsentrasi 82 ng/mL tersedia pada Gambar 3C dan senyawa T3.28 memiliki berat senyawa 282,23 m/z dengan konsentrasi 38 ng/mL dapat dilihat pada Gambar 3D.



Gambar 3. Spektre ESI LC-MS. a. Spektre ESI T1.86; b. Spektre ESI T2.24; c. Spektre ESI T2.67; dan e. Spektre ESI T3.28.

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium mempengaruhi produksi senyawa metabolit antifungi. Peningkatan produksi senyawa metabolit antifungi ditunjukkan oleh efektivitas hambatan hasil fermentasi terhadap *A. rolfsii*. Semakin banyak senyawa metabolit antifungi yang dihasilkan, maka akan semakin tinggi efektivitas hambatannya. Kesesuaian komposisi medium fermentasi berperan dalam memenuhi kebutuhan dasar biomassa dan produksi metabolit (Costa et al., 2002; Peighami-Ashnaeli et al., 2009; Tahir et al., 2012; Yáñez-mendizábal et al. 2012). Hasil penelitian ini juga menunjukkan setiap strain *B. subtilis* memiliki medium fermentasi optimum yang berbeda. *B. subtilis* AAF2 memperoleh efektivitas hambatan tertinggi terhadap *A. rolfsii* dengan menggunakan medium rendaman jagung

(Djamaan et al., 2018), sedangkan *B. subtilis* CAF3 memiliki efektifitas habatan tertinggi pada medium TSB. Faktor lain yang berperan dalam fermentasi senyawa antifungi adalah konsentrasi inokulum (Zhang et al., 2021). Proses fermentasi bakteri akan optimal pada rentang konsentrasi 2 – 10% (Stanbury et al., 2016). Pada umumnya konsentrasi inokulum 5% merupakan konsentrasi inokulum optimum dalam proses fermentasi senyawa antifungi (de Calvalho et al., 2010). Hasil yang diperoleh juga sama dengan penelitian lainnya. pH awal medium sangat mempengaruhi produksi senyawa antifungi, sehingga mempengaruhi efektifitas hambatan hasil fermentasi (Huang et al., 2014). Strain ini memiliki pH awal media optimum yang sama dengan strain *B. subtilis* lainnya (Islam et al., 2012; Zhao et al., 2016; Putri et al., 2021). Beberapa peneliti melaporkan *B. subtilis* memiliki aktivitas antifungi optimum pada pH awal media dengan rentang 6,5 – 7,5 (Oyedele & Ogunbanwo, 2014), 6 – 8 (Sidorova et al., 2020), dan 11 (Nalisha et al., 2006). Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap strain memiliki pH awal media optimum yang berbeda dalam produksi senyawa antifungi.

Hasil optimasi agitasi sangat mempengaruhi keberhasilan proses fermentasi (Tian et al., 2016), karena agitasi berperan dalam difusi oksigen dan kontak bakteri dengan substrat. *B. subtilis* CAF3 memiliki agitasi optimum yang lebih rendah dibandingkan *B. subtilis* B29 (Li et al., 2009) dan *B. subtilis* CPA-8 (Yáñez-mendizábal et al., 2012) dengan agitasi 150 rpm, *B. subtilis* 20B dengan agitasi 160 rpm (Joshi, Bharucha, & Desai, 2008), dan *B. subtilis* EIR-J dengan agitasi 200 rpm (Wang et al., 2016) dalam menghasilkan senyawa antifungi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa proses optimasi fermentasi perlu dilakukan, karena setiap strain memiliki kondisi yang optimum yang berbeda-beda. Ekstrak yang dihasilkan *B. subtilis* CAF3 lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak yang dihasilkan oleh *B. pumilus* MAIIM4A (de Melo et al., 2009), begitu juga dengan ekstrak yang dihasilkan oleh tumbuhan (Hanson, 2003). Pada umumnya ekstrak etil asetat memiliki jumlah dan bioaktivitas yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak lainnya (Bhoonobong et al., 2012; Battu & Reddy, 2009). Karena jumlah ekstrak dan bioaktivitasnya tinggi, maka banyak peneliti yang hanya menggunakan etil asetat dalam proses ekstraksi (Handayani et al., 2015; Kaaria et al., 2012; Niyaz, 2012). Hasil MS memperlihatkan senyawa yang dihasilkan oleh *B. subtilis* CAF3 berbeda dengan senyawa yang umum dihasilkan oleh species ini. Pada umumnya *B. subtilis* menghasilkan surfaktan dengan berat 994 – 1.062 m/z (Wu, Park, & Ahn, 2013), iturin dengan berat 1.028 – 1.109 m/z dan fengisin 1.421 – 1.566 m/z (He et al., 2017; Wu et al., 2013; Zhao et al., 2016), basilomisin dengan berat (He et al., 2017), dan subtilisin dengan berat 3.399 – 3.473 m/z (Wu et al., 2013). Hasil penelusuran yang dilakukan pada database menunjukkan senyawa yang dihasilkan adalah senyawa baru, sehingga perlu diidentifikasi lebih lanjut.

4. SIMPULAN

Fermentasi senyawa antifungi oleh *B. subtilis* CAF3 terhadap *A. rolfsii* optimum pada medium TSB, konsentrasi inokulum 5%, pH awal media 7 dan agitasi 110 rpm. Senyawa yang dihasilkan oleh strain ini merupakan senyawa yang berbeda dengan senyawa yang umum dihasilkan oleh *B. subtilis*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A. M., Attia, A. G., Mohamed, M. S., & Elsayed, H. E. (2019). Fermentation , formulation and evaluation of PGPR Bacillus subtilis isolate as a bioagent for reducing occurrence of peanut soil-borne diseases. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9), 2080–2092. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62578-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62578-5).
- Ahmadzadeh, M., & Behboudi, K. (2009). Interaction Of Different Media On Production And Biocontrol Efficacy Of Pseudomonas Fluorescens P-35 And Bacillus Subtilis B-3 Against Grey Mould Of Apple, 91, 65–70.
- Awan, Z. A., & Shoaib, A. (2019). Current Plant Biology Combating early blight infection by employing Bacillus subtilis in combination with plant fertilizers. *Current Plant Biology*, 20(September), 100125. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100125>.
- Bacillus licheniformis. (2012), 01(04), 498–510.
- Battu, P., & Reddy, M. (2009). Isolation of secondary metabolites from Pseudomonas fluorescens and its Characterization. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2(1), 26–29.
- Bhoonobong, A., Sawadsitang, S., & Sodngam, S. (2012). Characterization of Endophytic Bacteria , Bacillus Amylolyquefaciens for Antimicrobial Agents Production. *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmenta*, 40, 6–11.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J. S., Lakshman, D. K., Lydon, J., Kim, S., & Roberts, D. P. (2008). Isolation and partial characterization of Bacillus subtilis ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper, 115–123. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1520-4>.

- Dalal, J., & Kulkarni, N. (2013). Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials of Indigenous Endophytic Bacteria of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill), 1(2), 62–69.
- de Melo, F. M. P., Fiore, M. F., de Moraes, L. A. B., Silva-Stenico, M. E., Scramin, S., Teixeira, M. de A., & de Melo, I. S. (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Scientia Agricola*, 66(5), 583–592. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162009000500002>.
- Farizan, N. (2006). Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*, 2(2), 19–23.
- Hadiwiyono, H., & Widono, S. (2012). Endophytic *Bacillus* : the potentiality of antagonism to wilt pathogen and promoting growth to micro-plantlet of banana in vitro. *Biomirror*, 3(June), 1–4.
- Handayani, D., Sandrawaty, N., Murniati, M., & Regina, R. (2015). Screening of endophytic bacteria isolated from marine sponge *Haliclona fascigera* for inhibition against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(9), 139–142. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50926>.
- Hanson, J. (2003). Tutorial Chemistry Texts -- Natural Products: The Secondary Metabolites, 154.
- He, C. P., Fan, L. Y., Wu, W. H., Liang, Y. Q., Li, R., Tang, W., ... Zheng, F. C. (2017). Identification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* CzK1 isolated from the aerial roots of rubber trees. *Genetics and Molecular Research*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.4238/gmr16018710>.
- Huang, J., Wei, Z., Tan, S., Mei, X., Shen, Q., & Xu, Y. (2014). Suppression of Bacterial Wilt of Tomato by Bioorganic Fertilizer Made from the Antibacterial Compound Producing Strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62.
- Islam, R., Jeong, Y. T., Lee, Y. S., & Song, C. H. (2012). Isolation and identification of Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 Inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 59–66. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.059>.
- Joshi, S., Bharucha, C., & Desai, A. J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, 99(11), 4603–4608. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.030>.
- Kaaria, P., Matiru, V., & Ndungu, M. (2012). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic bacteria from selected indigenous Kenyan plants. *African Journal of Microbiology Research*, 6(45), 7253–7258. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.785>
- Kambar, Y., Manasa, M., Vivek, M., & TR, P. K. (2014). Inhibitory Effect of Some Plants of Western Ghats of Karnataka against. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(2), 76–82.
- Lacerda, A., De Carvalho, U., Henrique, F., Corrêa De Oliveira, P., De Lima, R., Mariano, R., ... Souto-Maior, A. M. (2010). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Growth, Sporulation and Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Arch. Biol. Technol. V*, 53353(3), 643–652.
- Li, J., Yang, Q., Zhao, L. H., Zhang, S. M., Wang, Y. X., & Zhao, X. Y. (2009). Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 10(4), 264–272. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820341>.
- Mao, X. L. J. Y. Z. (2014). Enhancement of Biocontrol Activities and Cyclic Lipopeptides Production by Chemical Mutagenesis of *Bacillus subtilis* XF-1 , a Biocontrol Agent of *Plasmodiophora brassicae* and *Fusarium solani*. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0471-y>.
- Niyaz, A. (2012). Isolation and identification of secondary metabolites producing organisms from marine sponge. *Discovery*, 1(1), 14–17.
- Nor Irham Nor Azan, M., Kamal, P. N. S. M. M., Rasmadi, M. A. A., Adzhar, M. H., Zakaria, M. A., Taufek, A. S. A., ... Alikasturi, A. S. (2020). Production of biodiesel from palm oil refinery pilot plant waste using Ni/CaO (ES) catalyst. *Materials Today: Proceedings*, 31, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.012>.
- Omowumi, A., & Samuel, T. (2014). Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil, 8(18), 1841–1849. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6162>.
- Putri, R. E., Mubarik, N. R., Ambarsari, L., & Wahyudi, A. T. (2021). Antagonistic activity of glucanolytic bacteria *Bacillus subtilis* W3.15 against *Fusarium oxysporum* and its enzyme characterization. *Biodiversitas*, 22(9), 4067–4077. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220956>.
- Rautela, R., Kumar, A., & Abha, S. (2014). Lipopeptides from *Bacillus* strain AR2 inhibits biofilm formation by *Candida albicans*. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0135-2>.
- Sidorova, T. M., Asaturova, A. M., Homyak, A. I., Zhevnova, N. A., Shternshis, M. V., & Tomashevich, N. S. (2020). Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1879–1885. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.002>.

- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). Principles of Fermentation Technology: Third Edition. *Principles of Fermentation Technology: Third Edition*, 1–803.
- Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., & Weller, D. M. (2008). Detection of Antibiotics Produced by Soil and Rhizosphere Microbes In Situ, 23–36.
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X., & Chen, W. (2016). Effect of nitrogen , carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *EJBT*, 19, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.11.005>.
- Uaac, A. A. F., Djamaan, A., Agustien, A., Zam, S. I., Jannah, M., Lalfari, R. S., ... Suci, R. P. (2018). Research Article, 9(8), 21–26. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.098158>.
- Usall, J., Atare, E., Vin, I., Costa, E., & Teixido, N. (2002). The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2, 117–120.
- Wang, N. N., Yan, X., Gao, X. N., Niu, H. J., Kang, Z. S., & Huang, L. L. (2016). Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2024-5>.
- Wu, W. J., Park, S. M., & Ahn, B. Y. (2013). Isolation and characterization of an antimicrobial substance from *Bacillus subtilis* BY08 antagonistic to *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Biotechnology*, 22(2), 433–440. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0098-5>.
- Yáñez-mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products, 60, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>.
- Zam, S. I., Agustien, A., Djamaan, A., & Mustafa, I. (2019). The Diversity of Endophytic Bacteria from the Traditional Medicinal Plants Leaves that Have Anti-phytopathogens Activity, 9(1), 53–63. <https://doi.org/10.11594/jtfs.09.01.08>.
- Zhang, Y., Wang, X., Liang, S., Shi, Y., Chen, X., Liu, J., & Wang, A. (2021). Fermentation optimization, fungistatic effects and tomato growth promotion of four biocontrol bacterial strains. *Agriculture (Switzerland)*, 11(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070686>.
- Zhao, Q., Dong, C., Yang, X., Mei, X., Ran, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2011). Biocontrol of *Fusarium* wilt disease for *Cucumis melo* melon using bio-organic fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 47(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.09.010>.
- Zhao, Q., Mei, X., Xu, Y., & Engineering, N. (2016). Isolation and Identification of Antifungal Compounds Produced by *Bacillus* Y-IVI for Suppressing *Fusarium* Wilt of Muskmelon, 52(3), 167–175. <https://doi.org/10.17221/70/2015-PPS>.