

## Aktivitas Anticendawan *Bacillus cereus* 11UJ terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Pyricularia oryzae*

### Antifungal Activity of *Bacillus cereus* 11UJ against *Rhizoctonia solani* and *Pyricularia oryzae*

Yadi Suryadi\*, I Made Samudra, Tri Puji Priyatno,  
Dwi Ningsih Susilowati, Puji Lestari, Sutoro

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor 16111

#### ABSTRAK

Metabolit sekunder asal mikroba merupakan sumber senyawa penting untuk pengembangan senyawa anticendawan pada strategi pengendalian penyakit. Penelitian ini bertujuan menguji kemampuan produksi metabolit sekunder bakteri antagonis rizosfer *Bacillus cereus* 11UJ terhadap cendawan patogen padi *Rhizoctonia solani* dan *Pyricularia oryzae*. Efek antagonis ekstrak kasar *B. cereus* 11UJ diuji dengan metode cakram kertas saring steril pada medium PDA. Ekstrak bakteri dengan pelarut etil asetat menunjukkan aktivitas anticendawan yang lebih baik terhadap *P. oryzae* dibandingkan dengan *R. solani*. Efek penghambatan filtrat membuktikan potensi *B. cereus* 11UJ untuk aktivitas anticendawan. Analisis pirolisis gas kromatografi spektrometri massa menunjukkan bahwa *B. cereus* 11UJ menghasilkan 3 senyawa utama, yaitu 9,19-cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)-(CAS) cycloartanyl acetate (13.14%); 4-(2',2'-dimethyl-6'-methyliden-1'-cyclohexyliden)-3-methyl-2-butanone (9.72%); dan stigmast-5-en-3-ol, oleat (9.09%) yang diduga berpotensi menekan pertumbuhan patogen.

Kata kunci: antagonis, gas kromatografi spektrometri massa, metabolit sekunder, patogen padi

#### ABSTRACT

Microbial secondary metabolites is an important resource for antifungal development in disease control strategy. The objective of this study was to screen *Bacillus cereus* 11UJ, an antagonistic rhizosphere bacteria for potential secondary metabolite production against rice fungal pathogens, i.e. *Rhizoctonia solani* and *Pyricularia oryzae*. The antagonistic effect of crude extract was evaluated using sterile filter paper discs on PDA medium. The ethyl acetate extracts of the bacterium showed a better antifungal activity to *P. oryzae* than those of *R. solani*. The inhibitory effect of the filtrate proved the potency of the isolates to produce antifungal. Analysis of pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry showed that *B. cereus* 11UJ produces 3 major compounds i.e; 9,19-cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)-(CAS) cycloartanyl acetate (13.14%); 4-(2',2'-dimethyl-6'-methyliden-1'-cyclohexyliden)-3-methyl-2-butanone (9.72%); and stigmast-5-en-3-ol oleat (9.09%) which suggested to play an important role in the suppression of rice fungal pathogens.

Key words: antagonists, gas chromatography mass spectrometry, rice pathogens, secondary metabolites

\*Alamat penulis korespondensi: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111  
Tel: 0251-8338820, Faks: 0251-8338820, Surel: yshid@yahoo.co.uk

## PENDAHULUAN

Penyakit penting pada padi di antaranya ialah penyakit hawar pelepah daun dan blas yang disebabkan berturut-turut oleh *Rhizoctonia solani* dan *Pyricularia oryzae*. Kedua cendawan patogen ini mempunyai banyak galur sehingga sangat sulit dikendalikan. Penggunaan pestisida untuk mencegah serangan penyakit pada tanaman sampai sekarang masih banyak digunakan. Beberapa bahan pestisida bersifat persisten dan tidak mudah diurai oleh mikroorganisme sehingga dapat mengakibatkan pencemaran lingkungan dan gangguan kesehatan manusia. Salah satu alternatif pengendalian yang ramah lingkungan ialah pemakaian agens hayati.

Saat ini galur bakteri *Pseudomonas* spp. dan cendawan *Trichoderma* spp. antagonis banyak mendapat perhatian (Kang 2012; Gomathi *et al.* 2013). Kedua mikrob tersebut dilaporkan mampu menghasilkan senyawa yang tidak menguap maupun senyawa yang mudah menguap dan menunjukkan aktivitas penghambatan kuat terhadap cendawan patogen tanaman. Galur *Bacillus* sp. (Jing dan Qian 2007) dan *B. subtilis* (Muskhazli *et al.* 2007) juga dilaporkan menghasilkan senyawa terlarut yang tidak menguap serta memiliki aktivitas anticendawan yang tinggi. Bakteri ini juga dapat berperan dalam menekan beberapa cendawan patogen seperti *Rhizoctonia* dan *Fusarium* (El-hamshary dan Khatib 2008; Soria *et al.* 2012; Sadrati *et al.* 2013; Wen *et al.* 2011). Spora bakteri dari beberapa jenis *Bacillus* sp. (*B. cereus*, *B. clausii*, dan *B. pumilus*) yang telah dikarakterisasi banyak dimanfaatkan untuk uji aktivitas anticendawan (Płaza *et al.* 2012).

*Bacillus cereus* 11UJ yang diisolasi dari tanah rizosfer tanaman tebu di daerah Jember dilaporkan dapat mengatalisis kitin yang terdapat pada dinding sel cendawan (Suryadi *et al.* 2013). Produksi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan *B. cereus* yang telah diuji secara *in vitro* terhadap cendawan patogen kemungkinan dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan anticendawan (Romeiro *et al.* 2010). Hasil penelitian Fiddaman dan Rossall (1994) menemukan senyawa mudah

menguap yang dihasilkan oleh bakteri *B. subtilis* dapat menghambat pertumbuhan dan perkecambahan spora cendawan patogen sehingga dapat menjadi agens pengendali hayati terhadap beberapa penyakit cendawan tular tanah.

Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas anticendawan yang dihasilkan *B. cereus* 11UJ terhadap *R. solani* dan *P. oryzae*, serta senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya.

## BAHAN DAN METODE

### Peremajaan dan Kultur Bakteri *Bacillus cereus* 11 UJ

*Bacillus cereus* 11UJ yang digunakan berasal dari koleksi Biogen-Culture Collection, Bogor. Cendawan *R. solani* dan *P. oryzae* asal tanaman padi digunakan sebagai cendawan uji. *B. cereus* 11UJ diremajakan pada medium agar-agar nutrien (AN) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar (22 °C) selama 1 minggu. Selanjutnya biakan diperbanyak dalam 200 mL medium nutrien cair (*nutrient broth*). Suspensi dikocok menggunakan *orbital shaker* (SI 50, USA), kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam 4 mL tabung ulir. Biakan bakteri diinkubasi selama 24–48 jam dalam alat kocok (IKA, KS 200) dengan kecepatan 120 rpm, selanjutnya suspensi bakteri dikumpulkan dalam erlenmeyer 250 mL untuk dilakukan fraksinasi.

### Fraksinasi Senyawa Anticendawan dengan Evaporator

Suspensi bakteri diekstraksi dalam bentuk fase cair menggunakan pelarut etil asetat untuk memperoleh metabolitnya. Medium cair berisi *B. cereus* 11UJ disentrifugasi menggunakan Himac CR21F (Hitachi) dengan kecepatan 10 000 × g pada suhu 4 °C selama 20 menit. Supernatan disaring menggunakan filter steril (0.45 µm). Supernatan kemudian diekstrak kembali dengan larutan etil asetat dengan perbandingan supernatan dan pelarut 1:1 sehingga terjadi fraksinasi antara fraksi etil asetat dan fraksi air. Eluat (fraksi air yang terlarut dalam medium dari proses inkubasi)

kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* (EYELA, Tokyo Ltd) pada suhu 50 °C hingga konsentrasi berkurang 10% dari volume awal, pH diatur hingga 3.6 dengan HCl 1N, lalu fraksi air diekstrak kembali sebanyak 3 kali dengan perbandingan supernatan dan pelarut etil asetat 1:1. Selanjutnya fraksi air diambil dan diuapkan kembali di atas *hot plate* dengan suhu 50 °C sampai didapat hasil ekstrak kasar.

### Uji Aktivitas Senyawa Metabolit *B. cereus* 11UJ terhadap *R. solani* dan *P. oryzae*

Uji antagonis senyawa metabolit asal *B. cereus* 11UJ terhadap cendawan dilakukan berdasarkan metode difusi sumur. Hasil ekstrak kasar sebanyak 1 mg dilarutkan dalam larutan 0.1% Tween 20 dan diencerkan dengan konsentrasi 1000, 500, 250, dan 100 ppm. Ekstrak metabolit tersebut masing-masing diuji dalam medium agar-agar dekstrosa kentang yang sudah disiapkan, kecuali untuk kontrol tidak diinokulasi metabolit (hanya air steril). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Bakteri *B. cereus* 11UJ diuji tantang dengan *R. solani* dan *P. oryzae* dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 5–7 hari. Daya anticendawan diamati setelah terlihat adanya aktivitas terhadap *R. solani* dan *P. oryzae*, dan zona hambat diamati pada 7 hari setelah inkubasi. Daya hambat diukur sebagai berikut: 1, sangat kuat (zona hambat > 2.0 cm); 2, kuat (zona hambat 1.1–2.0 cm); 3, sedang (zona hambat 0.51–1.0 cm); 4, lemah (zona hambat 0–0.5 cm).

### Identifikasi Senyawa Metabolit Asal *B. cereus* 11UJ Menggunakan GC-MS

Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi metabolit asal *B. cereus* 11UJ yang dipisahkan menggunakan etil asetat, kemudian dianalisis dengan GC-MS. Identifikasi senyawa menggunakan metode pirolisis GC-MS mengikuti Narayana *et al.* (2008). Contoh yang diambil dimasukkan ke dalam ruang kuarsa dalam unit pirolisis yang kemudian dipanaskan dalam lingkungan bebas oksigen pada suhu yang sudah ditentukan sebelumnya. Campuran

senyawa hasil ekstraksi kemudian dimasukkan dalam kolom GC-MS Shimadzu Type GCMS-QP2010 dengan kondisi GC-MS untuk analisis sebagai berikut: Gas: Helium; *Detector*: FID; *Column*: *Capiler type phase Rtx-5MS* (60 m; 0.25 mm); *ID Column temperature*: 50 °C; *Inlet press* (kPa): 100; *Column flow* (mL min<sup>-1</sup>): 0.85; *Split ratio*: 112.3; *SPL temperature*: 280 °C; *MS Interface*: 280 °C. Spektrometer massa dioperasikan dalam mode ionisasi elektron pada 70 eV dengan suhu 200 °C. Spektrum massa kemudian dibandingkan dengan basis data *Mass Spectrometry*.

## HASIL

### Aktivitas Anticendawan Metabolit *B. cereus* 11UJ terhadap *R. solani* dan *P. oryzae*

Dari proses ekstraksi dan evaporasi diperoleh larutan ekstrak yang lebih pekat dan murni. Hasil uji aktivitas anticendawan terhadap cendawan patogen padi menunjukkan bahwa ekstrak *B. cereus* 11UJ dapat menekan pertumbuhan *P. oryzae* (Gambar 1). Produksi metabolit sekunder *B. cereus* 11UJ dapat mengurangi pertumbuhan miselium *P. oryzae*. Senyawa metabolit menurunkan panjang miselium dan koloni cendawan sesuai perlakuan konsentrasi metabolit dengan kisaran daya hambat 0.3–1.4 cm.

Penghambatan terhadap *P. oryzae* oleh metabolit *B. cereus* 11UJ lebih efektif dibandingkan dengan penghambatannya terhadap *R. solani* 7 hari setelah inkubasi. Metabolit bakteri tidak sepenuhnya mematikan *P. oryzae*, tetapi memiliki efek yang jelas dalam menghambat pertumbuhan miselium cendawan (Tabel 1). Zona hambat yang dihasilkan oleh *B. cereus* terhadap *P. oryzae* termasuk dalam kategori daya hambat kuat (1.1–2.0 cm) pada masing-masing perlakuan 250, 500, dan 1000 ppm, sedangkan zona hambat yang dihasilkan oleh *R. solani* dapat dikategorikan ke dalam zona hambat lemah (< 0.5 cm).

### Fraksi Metabolit Sekunder Asal *B. cereus* 11 UJ

Senyawa yang terdeteksi melalui GC-MS, termasuk golongan alkohol (etanol),

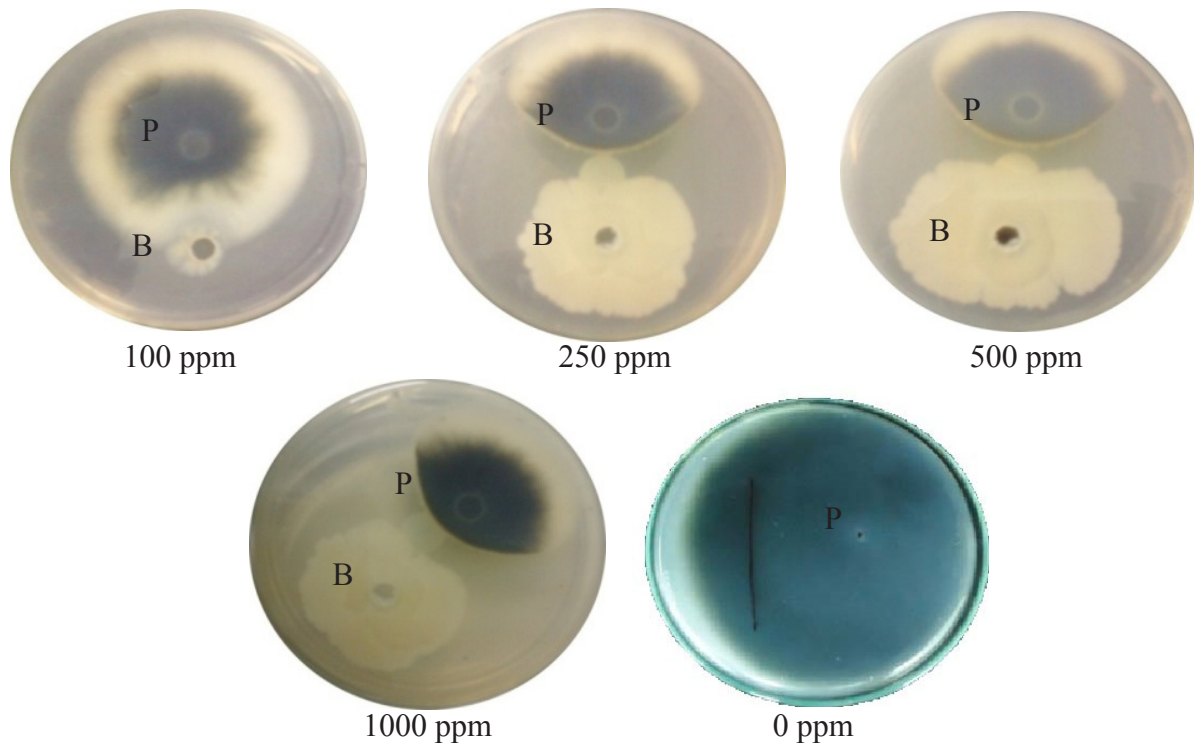
asam asetat, nonane, asam palmitat, dan keton (Gambar 2). Ekstrak *B. cereus* 11UJ yang diuji menunjukkan 30 puncak, tetapi hanya 3 senyawa dengan konsentrasi tertinggi yang terdeteksi dalam ekstrak, yaitu senyawa 9,19-*cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)-(CAS) cycloartanyl acetate; 4-(2',2'-dimethyl - 6' - methyliden - 1' - cyclohexyliden) -3 - methyl -2- butanone; dan stigmast-5-en-3-ol, oleat* (Gambar 2; Tabel 2).

**PEMBAHASAN**

Aktivitas anticendawan *B. cereus* 11UJ yang mudah menguap pada cawan petri menghambat pertumbuhan miselium cendawan

yang berbeda-beda sesuai dengan konsentrasi metabolit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *B. cereus* 11UJ mempunyai aktivitas anticendawan agak lemah terhadap *R. solani* yang ditandai rendahnya daerah hambatan. Pada perlakuan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona hambat, berarti bahwa pelarut tidak mempengaruhi aktivitas anticendawan sehingga diduga aktivitas hanya berasal dari metabolit yang diuji.

Ekstrak metabolit *B. cereus* 11UJ dengan konsentrasi 1000 ppm menghasilkan zona hambat paling besar dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Semakin rendah konsentrasi, semakin rendah pula zona hambat yang dihasilkan. Hal ini sama dengan



Gambar 1 Bioasai beberapa konsentrasi ekstrak kasar metabolit *Bacillus cereus* 11UJ (B) terhadap *Pyricularia oryzae* (P).

Tabel 1 Hasil uji aktivitas metabolit *Bacillus cereus* 11UJ terhadap *Pyricularia oryzae* dan *Rhizoctonia solani*

Metabolit <i>B. cereus</i> 11UJ (ppm)	Rerata diameter penghambatan (cm)	
	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
1000	1.40 ± 0.14	0.75 ± 0.04
500	1.37 ± 0.04	0.25 ± 0.07
250	1.05 ± 0.07	0.17 ± 0.04
100	0.26 ± 0.04	0.10 ± 0.01
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

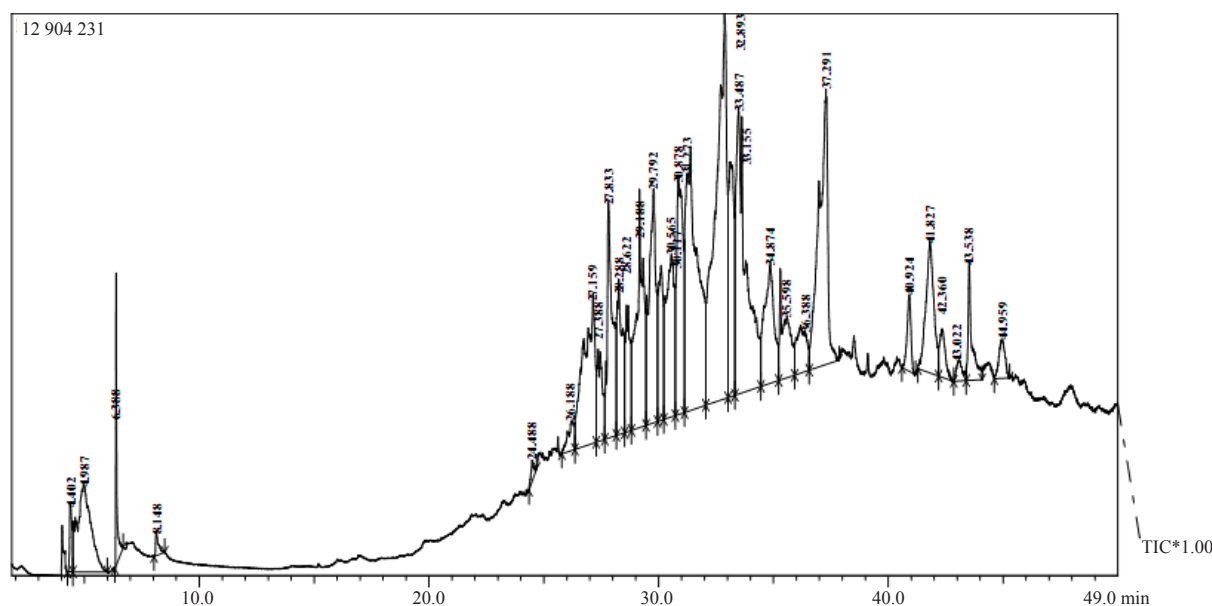


pendapat peneliti sebelumnya (Widiyati 2006). Pada penelitian yang dilakukan sebelumnya terhadap senyawa metabolit murni yang diperoleh dari filtrat *Pseudomonas brassicacearum* YC5420 dilaporkan bahwa besar zona hambat pada cendawan patogen berbeda-beda (Chung *et al.* 2008). Besarnya zona hambat yang dihasilkan kemungkinan berhubungan dengan aktivitas antimikrob. Dilaporkan oleh Dutta *et al.* (2013), bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikrob di antaranya perbedaan pH lingkungan, stabilitas zat aktif, besarnya inokulum, masa inkubasi dan aktivitas metabolik bakteri.

Berdasarkan pada daya hambat yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. terhadap cendawan *R. solani*, Yuliar (2008) menyatakan bahwa *Bacillus* sp. berpotensi sebagai agens pengendali hayati *R. solani*. Bakteri *B. cereus*

mampu mensintesis protein yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman tomat terhadap cendawan *Corynespora casicola* (Romeiro *et al.* 2010). Kemampuan daya hambat yang dihasilkan oleh spesies *Bacillus* terhadap bakteri patogen pangan dilaporkan pula oleh Lisboa *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa kultur supernatan *B. amyloliquefaciens* menunjukkan penghambatan pertumbuhan terhadap beberapa jenis bakteri seperti *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens* dan *Pasteurella haemolytica*. Penelitian yang dilakukan oleh El-hamshary dan Khattab (2008) melaporkan bakteri *B. subtilis* dan *B. cereus* mempunyai aktivitas anticendawan yang tinggi terhadap cendawan patogen *Fusarium solani*.

*Cyclolanostan* merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *B. cereus* 11UJ dengan kadar tertinggi.



Gambar 2 Kromatogram ekstrak metabolit *Bacillus cereus* 11UJ.

Tabel 2 Tiga senyawa metabolit sekunder dengan kadar tertinggi dalam ekstrak *Bacillus cereus* 11UJ

Senyawa	Kadar (%)	Waktu retensi (menit)	Berat molekul (g mol <sup>-1</sup> )
9,19-cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)- (CAS) cycloartanyl acetate	13.14	32.893	470
4-(2',2'-dimethyl-6'-methyliden-1'-cyclohexyliden)-3-methyl-2-butanone	9.72	31.273	206
stigmast-5-en-3-ol, oleat	9.09	33.487	679

Lanostan merupakan turunan dari senyawa triterpena (steroid) (Escurriol *et al.* 2009). Sejumlah terpen atau terpenoid dilaporkan aktif melawan cendawan dan serangga. Beberapa senyawa turunan triterpena telah dijadikan sebagai anticendawan, tetapi mekanisme aksi terpen tidak sepenuhnya diketahui, namun diduga menyebabkan gangguan membran oleh sifat lipofil (Ghosh *et al.* 2013). *Dimethyl-6'-methyliden-1'-cyclohexyliden)-3-methyl-2-butanone* merupakan kelompok monoterpenoid (flavonoid) dari jalur asetat mevalonat dan juga bersifat anticendawan. *Stigmast-5-en-3-ol, oleat* merupakan senyawa turunan sterol dan metabolit sekunder yang dihasilkan dari ekstrak bakteri *B. cereus*. Senyawa ini digolongkan dalam kelompok fitoaleksin, oleh karena itu stigmasterol dapat bersifat sebagai anticendawan. Senyawa stigmasterol dapat bersifat anticendawan terhadap *Malazesia furfureus*, *Candida albicans* dan *Aspergillus niger* (Ridhay *et al.* (2012).

Senyawa n-decanal mudah menguap dari *B. amyloqueafaciens* NJN-6 dilaporkan dapat menghambat *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Yuan *et al.* 2012), sementara alkil alkohol dapat meningkatkan populasi bakteri dan 2,3-butadienol memacu pertumbuhan tanaman (Dutta *et al.* 2013). Jika besarnya konsentrasi *stigmast-5-en-3-ol, oleat* dalam ekstrak yang dihasilkan oleh *B. cereus* terakumulasi kemungkinan besar dapat menyebabkan penumpukan sterol dalam cendawan. Pernyataan tersebut diungkapkan oleh Lazzarino *et al.* (2011), bahwa akumulasi sterol yang mengalami metilasi menyebabkan terjadinya perubahan sejumlah fungsi sel yang berhubungan dengan permeabilitas membran.

Senyawa benzena dan benzothiazoles fenol dan 2,3,6-trimetil-fenol asal metabolit sekunder *B. amyloliqueafaciens* NJN-6 dilaporkan mempunyai aktivitas anticendawan terhadap *F. oxysporum*. Secara *in vitro* senyawa alkohol aldehida, ester, eter, dan naftil pada konsentrasi 200  $\mu$ L hampir sepenuhnya menghambat *F. oxysporum*, sedangkan keton diproduksi pada tingkat tinggi (Yuan

*et al.* 2012). Pada penelitian ini senyawa keton (4-(2',2'-dimethyl-6'-methyliden-1'-cyclohexyliden)-3-methyl-2-butanone) yang diproduksi oleh *B. cereus* 11UJ kadarnya juga ditemukan cukup tinggi. Sementara berdasarkan analisis menggunakan GC-MS yang dilakukan oleh Dutta *et al.* (2013) terhadap *B. cereus*, juga diperoleh 3 jenis senyawa organik. Tiga jenis senyawa tersebut adalah senyawa golongan sulfida (disulfida dan dimetil), golongan aldehida (nonanal atau decanal), dan satu senyawa asam (1,2 benzenedicarboxylic acid).

Dari hasil analisis GC-MS, diketahui sterol memiliki puncak paling tinggi dan diduga menunjukkan efek anticendawan yang kuat terhadap cendawan patogen. Hasil percobaan ini menyarankan bahwa mekanisme pengendalian hayati yang dihasilkan oleh *B. cereus* 11UJ terhadap *P. oryzae* dan *R. solani* diduga disebabkan senyawa metabolit sekunder tersebut. Kegiatan uji antagonis berupa penghambatan pertumbuhan miselium kedua patogen hasilnya berguna untuk memahami tentang mekanisme biokontrol *B. cereus* 11UJ terhadap *P. oryzae* dan *R. solani*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan karakteristik masing-masing senyawa utama anticendawan yang dihasilkan oleh bakteri *B. cereus* 11UJ terhadap *R. solani* dan *P. oryzae* melalui analisis lainnya seperti kromatografi lapis tipis (KLT), bioautografi dan *nuclear magnetic resonance* (NMR).

Metabolit sekunder yang dihasilkan dari ekstrak bakteri *B. cereus* 11UJ dapat menghambat pertumbuhan cendawan *R. solani* dan *P. oryzae* yang cukup baik pada konsentrasi 1000 ppm, serta dapat diketahui bahwa aktivitas anticendawan yang dihasilkan lebih efektif menghambat pertumbuhan *P. oryzae*. Hasil analisis senyawa menggunakan GC-MS menunjukkan 3 senyawa dengan kadar tinggi, yaitu 9,19-cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)-(CAS) *cycloartanyl acetate* (13.14%); 4-(2',2'-dimethyl-6'-methyliden-1'-cyclohexyliden)-3-methyl-2-butanone (9.72%); dan *stigmast-5-en-3-ol, oleat* (9.09%).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA APBN 2013-BB Biogen atas nama Sutoro dengan No kode Projek:1798.009.011. Penulis mengucapkan terima kasih kepada teknisi Lab Mikrobiologi BB Biogen dan Siti Sadiyah yang telah membantu kelancaran penelitian ini. Penulis juga mengucapkan penghargaan kepada Ika Mariska atas diskusi, koreksi, dan saran yang bermanfaat pada penafsiran analisis metabolit sekunder.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chung BS, Aslam Z, Kim SW, Kim GG, Kang HS, Ahn JW, Chung YR. 2008. A bacterial endophyte *Pseudomonas brassicacearum* YC5480 isolated from the root of *Artemisia* sp producing antifungal and phytotoxic compounds. *Plant Pathol J.* 24(4):461–468. DOI: <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.4.461>.
- Dutta S, Rani TS, Podile AR. 2013. Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *J PlosOne.* 8(10):e78369. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078369>.
- El-hamshary OIM, Khattab AA. 2008. Evaluation of antimicrobial activity of *B. subtilis* and *B. cereus* and their fusant against *Fusarium solani*. *Res J Cell Mol Biol.* 2(2):24–29.
- Escurriol V, Cofan M, Serra M, Bullo M, Basora J, Salvado JS, Corella D, Zazpe I, Gonzalez MAM, Gutierrez VR, Estruch R, Ros E. 2009. Serum sterol responses to increasing plant sterol intake from natural foods in the Mediterranean diet. *Eur J Nutr.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-009-0024-z>.
- Farag MA, Ryu CM, Sumner LW, Pare PW. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry.* 67:2262–2268. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.021>.
- Fiddaman PJ, Rossall S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol.* 76:395–405. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x>.
- Ghosh P, Mandal A, Rasul MG. 2013. A new bioactive ursane-type triterpenoid from *Croton bonplandianum* Bail. *J Chem Sci.* 125(2):359–364. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12039-013-0387-9>.
- Gomathi S, Ambikapathy V, Panneerselvam A. 2013. Separation of bioactive compounds from *T. viride* isolated from chilli field soil by using gas chromatography-mass spectrum, FTIR and UV. *J Antimicrobials Photon.* 128:141–146.
- Jing L, Qian Y. 2007. Purification and properties of antifungal protein produced by *Bacillus subtilis* B29. Di dalam: *The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*; 2007 Nov 1–3; Khon Kaen University, Nong Khai, Thailand. Nong Khai (TH): [King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Khon Kaen University]. 37. O-27.
- Kang BR. 2012. Biocontrol of tomato Fusarium wilt by a novel genotype of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* sp. NJ 134. *Plant Pathol J.* 28(1):93–100. DOI: <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.10.2011.0202>.
- Lazzarino G, Amorini AM, Di Pietro V, Tavazzi B. 2011. HPLC analysis for the clinical-biochemical diagnosis of inborn errors of metabolism of purines and pyrimidines. *Methods Mol Biol.* 708:99–117. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7_5).
- Lisboa MP, Bonatto D, Bizani D, Henriques JAP, Brandelli A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *B. amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Inter Microbiol.* 9:111–118.
- Muskhazli M, Leong PP, Nor Azwady AA, Nalisha I, Nor Farizan T, Siraj SS, Faridah

- QZ. 2007. Studies on the activity of soluble non-volatiles antifungal secreted by *B. subtilis*. Malays Appl Biol. 3(2):7–13.
- Narayana KJP, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y, Krishna P. 2008. Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 277. Polish J Microbiol. 57(1):35–39.
- Plaza GA, Król E, Páociniczak MP, Seget ZP, Brigmon LR. 2012. Study of antifungal activity of *Bacillus* species cultured on agro-industrial wastes. Acta Sci Pol Hortorum Cultus. 11(5):169–182.
- Ridhay A, Noor A, Soekamto NH, Harlim T. 2012. A stigmasterol glycoside from the root wood of *Melochia umbellata* (Houtt) stapf var. *degrabrata* K. Indonesian J Chem. 12 (1):100–103.
- Romeiro RS, Filho FL, Macagnan D, Garcia FAO, Silva HSA. 2010. Evidence that the biocontrol agent *B. cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora casiiicola*. Trop Plant Pathol. 35(1):11–15.
- Sadrati N, Daoud H, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S. 2013. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). J Plant Protec Res. 53(2):128–136.
- Soria S, Alonso R, Battucci L. 2012. Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. Chilean J Agric Res. 72(2):281–284.
- Suryadi Y, Priyatno TP, Susilowati DN, Samudra IM, Yudistira N, Purwakusumah ED. 2013. Isolasi dan karakterisasi kitinase asal *B. cereus* 11UJ. J Biol Indones. 9(1):51–62.
- Wen CY, Yin ZG, Wang KX, Chen JG, Shen SS. 2011. Purification and structural analysis of surfactin produced by endophytic *B. subtilis* EB 505 and its antagonistic activity against *R. cerealis*. Plant Pathol J. 27(4):342–348. DOI: <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.4.342>.
- Widiyati E. 2006. Penentuan adanya senyawa triterpenoid dan uji aktivitas biologis pada beberapa spesies tanaman obat tradisional masyarakat pedesaan Bengkulu. J Gradien. 2(1):116–122.
- Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Appl Environ Microbiol. 78(16):5942–5944. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01357-12>.
- Yuliar. 2008. Skrining bioantagonistik bakteri untuk agen biokontrol *Rhizoctonia solani* dan kemampuannya dalam menghasilkan surfaktin. Biodiversitas. 9:83–86. DOI: <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d090201>.