

Optimasi *Bacillus subtilis* sebagai Agensia *Bio-coating* untuk Meningkatkan Kualitas dan Viabilitas Benih Jagung Manis (*Zea mays saccharata* Sturt.)

Optimization of *Bacillus subtilis* as Bio-coating Agents to Improve the Quality and Viability of Sweet Corn Seeds (*Zea mays saccharata* Sturt.)

Andre Agusta^{1*}, Mohamad Wega Faisalma², Olsen Pramana³

¹CV. Lihat Kebunku, Kecamatan Bergas, Kabupaten Semarang, 50552, Indonesia

²Fakultas Pertanian dan Bisnis, Universitas Kristen Satya Wacana Jl. Diponegoro 66, Salatiga, 50711, Indonesia

³PT Sulawesi Mining Investment, Kecamatan Bahodopi, Kabupaten Morowali, 94974, Indonesia

*penulis korespondensi: andrgst17@gmail.com

Diterima: 19 Oktober 2023, Disetujui: 28 November 2023, Diterbitkan: 1 Desember 2023

Abstrak. Mutu dan kesehatan benih jagung merupakan salah satu hal yang perlu diperhatikan guna mencapai hasil panen yang maksimal. Usaha mempertahankan mutu dan kesehatan benih tersebut yaitu dengan perlakuan benih atau *seed treatment*. *Bio-coating* merupakan pelapisan benih dengan menambahkan bakteri yang digunakan pada perlakuan simpan benih jagung. Dalam pembuatan *bio-coating* ini, bakteri mengalami proses inaktif pada saat penyimpanan dan akan bereaksi pada benih jagung yang di tanam pada media tanam. *B. subtilis* yang mampu membentuk endospora dan dapat bertahan dalam lingkungan yang kurang baik akan melakukan *cryptobiosis*. Setelah media yang sesuai ditambahkan, spora akan menyerap air, membengkak, dan merangsang benih untuk berkecambah. *B. subtilis* memberikan manfaat tanaman dalam bentuk *phytohormon*, auksin, sitokinin, giberelin, etilen dan asam absisat serta sebagai biokontrol melalui kolonisasi rhizosfer dan rhizoplane yang efektif yang menghambat mikroorganisme yang merugikan dengan memproduksi bakteriosin yang bersifat bakterisida. Faktor-faktor yang mempengaruhi optimasi dan bereaksinya *B. subtilis* sebagai agen *bio-coating* dalam penyimpanan benih jagung yaitu penyimpanan dalam suhu 35°C dan pH kisaran 6.

Kata kunci: *bio-coating*, *B. subtilis*, kualitas dan viabilitas benih jagung, optimasi

Abstract. The quality and health of corn seeds are one of the things to consider in order to obtain maximum yields. The efforts to maintain the quality and health of these seeds, namely by treating seeds or seed treatment. *Bio-coating* is a coating of seeds by adding bacteria that are used in the treatment of storing corn seeds. In making this *bio-coating*, bacteria undergo an inactive process during storage and will react to corn seeds planted on the growing media. *B. subtilis* is capable of forming endospores and can survive in an environment that is not good enough to do *cryptobiosis*. After the appropriate media is added, the spores will absorb water, swell, and stimulate the seeds to germinate. *B. subtilis* provides plant benefits in the form of phytohormone, auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene, and abscisic acid as a biocontrol through effective rhizosphere and rhizoplane colonization which inhibits harmful microorganisms by producing bactericidal bacteriocins. The factors that influence the optimization and reaction of *B. subtilis* as a *bio-coating* agent in storing corn seeds are storage at 35°C and pH range 6.

Keywords: *bio-coating*, *B. subtilis*, quality and viability of corn seeds, optimization

Latar Belakang

Mutu dan kesehatan benih merupakan hal yang harus diperhatikan untuk menghasilkan produksi yang maksimum. Penurunan viabilitas benih merupakan masalah utama dalam kegiatan penyimpanan benih, tak terkecuali pada benih jagung. Benih jagung yang dipakai untuk kegiatan budidaya tanaman harus memiliki mutu benih yang baik, sehingga kualitas benih yang bermutu menjadi suatu faktor utama yang harus menjadi perhatian dalam kegiatan budidaya tanaman (Justice dan Bass, 2002). Mutu benih jagung sendiri dapat dilihat dari penampakkannya sebagaimana kebernasan, warna, dan campuran fisik. Selain mutu fisik, ada juga mutu genetik dan fisiologi. Mutu genetik menyangkut keunggulan varietas dan kemurnian benih. Mutu fisiologi termasuk daya tumbuh benih, kadar air, dan vigor benih (Syukur dan Rifianto, 2013).

Biji jagung termasuk golongan biji orthodox. Jenis biji ini mengikuti *Rule of Thumbs*, sehingga biji ini semakin rendah kadar air dan suhu simpannya, maka semakin panjang pula potensial umurnya. Oleh karenanya, untuk menekan terjadinya

kemunduran benih yang berlangsung secara cepat selama penyimpanan, maka benih tersebut harus disimpan pada kadar air dan suhu yang rendah, kualitas fisiologis benih berhubungan erat dengan keaktifan benih dalam berkecambah yang didalamnya terdapat kerja enzim, proses reaksi biokimia serta respirasi benih, sehingga untuk mempertahankan kualitas benih pada saat masa penyimpanan sebelum ditanam perlu dilakukan perlakuan benih atau *seed treatment* (Sadjad, 1993).

Pelapisan benih atau *coating* merupakan salah satu bentuk *seed treatment* yang sering dilakukan untuk mempertahankan mutu benih. Pelapisan benih dapat memperbaiki mutu benih menjadi lebih baik. *Bio-coating* merupakan suatu proses perlakuan kemajuan teknologi benih dalam menyiapkan benih yang berkualitas serta tahan terhadap serangan patogen yang dapat memberi dampak negatif pada benih, mengurangi resiko dalam tertularnya penyakit yang terkontaminasi, memberi penampilan yang khusus, serta meningkatkan daya simpan benih (Ilyas, 2003). Perlakuan *bio-coating* merupakan salah satu usaha pelapisan

benih menggunakan bakteri probiotik merupakan suatu inovasi yang dapat dikembangkan lebih jauh. Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme yang dapat melakukan hiperparasitisme. Proses itu dapat mencegah pertumbuhan patogen dengan menghasilkan senyawa antibiotik yang dapat menekan pertumbuhan patogen (Zivkovic *et al.*, 2010).

B. subtilis merupakan bakteri yang lebih baik dalam agen hayati teknologi *bio-coating*. Coating benih dengan penambahan *B. subtilis* yang dapat memberi perlindungan serta memberi tekanan pada berbagai mikroorganisme pengganggu dan mampu bertahan pada lingkungan alam yang ekstrim Chen *et al.* (2013). Bakteri *B. subtilis* dikenal sebagai bakteri yang toleran terhadap kondisi ekologi yang merugikan (Liu dan Sinchair, 1993). *B. subtilis* merupakan bakteri yang berperan sebagai bakteri pembentuk endospora yang resisten terhadap kondisi lingkungan yang kurang mendukung. Hasil Endospora tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan selama bakteri inaktif dalam penyimpanan yang dapat dicampurkan dengan bahan pembawa. Bahan pembawa ini dapat

dimanfaatkan spora bakteri sebagai sumber nutrisi saat benih melakukan proses berkecambah sesaat setelah diaplikasin (Sulistiani, 2009).

Sifat *B. subtilis* yang toleran terhadap kondisi lingkungan yang kurang baik menjadi sifat penting bertahanannya pada lapisan *coating* selama periode penyimpanan. Berdasarkan latar belakang tersebut, review ini bertujuan untuk mengetahui peranan bakteri *B. subtilis* dalam pemanfaatannya sebagai *bio-coating* untuk mempertahankan mutu benih jagung manis pada periode penyimpanan dan peranan *B. subtilis* pada perkembangan benih setelah ditanam.

Karakteristik *B. subtilis*

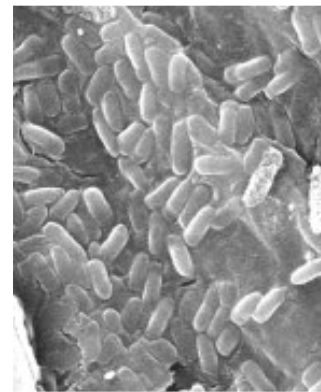
B. subtilis merupakan jenis bakteri yang berbentuk batang dan termasuk gram positif, aktif pada katalase positif, memiliki sifat anaerob fakultatif, dan heterotrof (Soesanto, 2008). Dinding sel bakteri ini merupakan polimer dari glukosa dan asam amino yang tersusun atas peptidoglikan. Sel dapat membentuk pelindung antara lingkungan dan bakteri sel, sehingga sel dapat mempertahankan bentuknya dari

internal sel yang memiliki tekanan turgor tinggi (Schaechter, 2006). *B. subtilis* merupakan bakteri agen hayati yang baik berbeda dari bakteri lain, selain itu bakteri ini mudah ditumbuhkan sehingga dikembangkan biakkan dalam skala industri (Soesanto, 2008).

Sel bakteri *B. subtilis* sendiri berbentuk batang yang memiliki panjang sekitar 0,5-2,5 x 1,2-10 um yang bergerak dengan flagela. Endosporanya berbentuk oval dan memiliki kekebalan pada kondisi lingkungan yang tidak sesuai atau yang merugikan. Bakteri ini memiliki sifat aerobik dan termasuk pada kelompok mesofilik yang dapat bertahan pada suhu 10 - 40°C dan pH $\geq$ 4,5 (Soesanto, 2008). Bakteri ini menghasilkan bakteriosin yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri pesaing yang lain. Selain itu, *B. subtilis* juga menghasilkan protein kompleks yang bersifat antagonis kepada spesies lain. Pendapat ini diperkuat dari hasil penelitian Chen *et al.* (2013) yang telah diuji pada rumah kaca membuktikan bahwa *B. subtilis* merupakan bakteri yang mempunyai sifat yang mampu membendung berbagai jenis patogen tanaman dan memiliki ketahanan

hidup pada lingkungan yang ekstrim. Berikut ini merupakan klasifikasi dari bakteri *B. subtilis*:

Kingdom	: Bakteri
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Order	: <i>Bacillales</i>
Famili	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i> (Holt, 2000)



Gambar 1. Sel *B. subtilis* (p = 40.000x) (Schmiedeknecht, 2008)

Mekanisme Optimasi *B. subtilis* sebagai Bio-coating

Teknologi biocoating pada benih telah dievaluasi sebagai sarana untuk memajukan perkecambahan benih dan berfungsi sebagai pembawa bahan yang bermanfaat juga. Perawatan benih biologis diharapkan menjadi salah satu sektor perawatan benih yang tumbuh paling cepat dalam waktu dekat serta dapat bertahan lama (Sari dkk.,

2013). Bakteri *B. subtilis* saat dilakukan inokulasi langsung terhadap tanaman tidak mengakibatkan indikasi penyakit walaupun pada kondisi tertentu selama pertumbuhan tanaman. Bahkan *B. subtilis* dapat meningkatkan viabilitas benih, merangsang lebih cepat perakaran dan tunas selama pertumbuhan tanaman. Daya proteksi bakteri terhadap tanaman bereaksi ketika tanaman ditanam pada tanah yang terjangkit patogen, misalnya *Fusarium moniliforme*. Hal ini membuktikan bahwa bakteri *B. subtilis* mampu melakukan perlindungan terhadap benih selama penyimpanan hingga benih ditanam dengan cara mengkoloni sekitar perakaran sehingga pertumbuhan tanaman meningkat. Kemampuan bakteri *B. subtilis* di dalam mengkoloni daerah perakaran tanaman hingga sampai masa dua bulan dan kerapatan populasinya relatif seimbang (Soesanto, 2008).

Dalam mekanisme *bio-coating*, *B. subtilis* yang mampu membentuk endospora. akan bercampur dan bersimbiosis dengan media pembawa sebagai material bakteri inaktif. Bahan pembawa ini dimanfaatkan spora bakteri

sebagai sumber nutrisi saat benih melakukan proses berkecambah dalam kondisi lingkungan sesuai, karena spora mudah disiapkan dalam jumlah besar dan akan mempertahankan viabilitas dalam penyimpanan dalam jangka waktu yang lama (Young *et al.*, 1995). Saat bakteri sudah menjadi agen *bio-coating* terhadap benih jagung, bakteri tersebut akan bertahan dalam bentuk tidak aktif sampai kondisinya sesuai untuk perkecambahan dan aktivitas sel (van Elsas *et al.*, 1986). Akan tetapi, sebelum memasuki masa inaktif, *B. subtilis* ini akan menghasilkan zat antibiotik yang potensial sebagai agen biokontrol. Bakteri *B. subtilis* selain memproduksi metabolit sekunder yang dapat menghambat patogen berkembang biak, juga memproduksi hormon pengatur tumbuh, hormon-hormon tersebut terutama metabolit skunder sebagai anti patogen akan bersimbiosis dengan bahan pembawa dan sebagai agen pelindung dari patogen saat benih pada masa simpan dan bakteri dalam kondisi inaktif (Backman *et al.*, 1994). Setelah penyimpanan benih ini, bakteri akan melakukan *cryptobiosis* setelah media yang sesuai ditambahkan, spora akan

menyerap air, membengkak dan merangsang benih untuk berkecambah (Kim *et al.*, 1997b).

Bahan pembawa proses *bio-coating* berfungsi sebagai perekat, sehingga diperlukan bahan pembawa yang optimal untuk digunakan yaitu bahan pembawa yang bersifat koloid dan memiliki kandungan bahan organik yang tinggi, sehingga dapat memberikan nutrisi bagi bakteri yang digunakan. Bahan organik yang dimaksud dalam bahan pembawa tersebut berupa bahan organik yang mudah larut, misalnya karbohidrat, protein dan asam organik, sehingga sifat bahan pembawa merupakan aspek yang sangat mempengaruhi kehidupan mikroba hayati.

Senyawa tersebut merupakan sumber karbon dan sumber energi utama bagi aktivitas agen hayati (Noviana dan Raharjo, 2009). Dari berbagai bahan-bahan pembawa yang dapat dipalikasikan dalam formulasi *bio-coating*, maka bahan pembawa yang efektif dalam pembuatan seed coating pada jagung dengan agen hayati adalah alginat + gambut. Hal tersebut sama dengan hasil penelitian (Madyasari, 2017), bahwa formula alginat 3%, gambut 1%, dan bakteri pembantu *P. diminuta* dan *B. subtilis strain 5/B* merupakan komposisi yang paling berpengaruh nyata dalam meningkatkan kualitas benih. Berikut hasil data penelitian formulasi bahan pembawa pada *coating* benih.

Tabel 1. Pengaruh *coating* benih dengan agen hayati terhadap tinggi tanaman

Perlakuan	Tinggi tanaman (cm)		
	4 MST	8 MST	12 MST
Kontrol negatif	50,6	71,8	98,3
Kontrol positif terkontaminasi Xoo	51,2	72,3	97,6
<i>P. diminuta</i> A6 + <i>B. subtilis</i> 5/B	48,4	70,2	95,2
Alginat 3% + gambut 1% + <i>P. diminuta</i> A6 + <i>B. subtilis</i> 5/B	49,9	72,1	97,4
Arabic gum 3% + gipsum 1% + <i>P. diminuta</i> A6 + <i>B. subtilis</i> 5/B	48,4	71,8	94,9
CMC 1.5% + talc 1% + <i>P. diminuta</i> A6 + <i>B. subtilis</i> 5/B	49,2	70,3	94,5
Bakterisida streptomycin sulfat 4%	47,5	68,7	88,3

Keterangan: MST (minggu setelah tanam)

Sumber: Madyasari (2017)

Berikut beberapa proses biocoating secara garis besar pada benih jagung meliputi beberapa tahapan proses pembuatan, yang pertama yaitu yaitu :

a. Perbanyak Isolat Bakteri

Proses perbanyak isolat bakteri *B. subtilis* bisa dilakukan dengan menggunakan media *potato dextrose agar* (PDA) yang diinkubasi pada suhu 27-30⁰ C selama 48 jam untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal kemudian digoreskan pada cawan petri steril yang berisi media PDA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27-30⁰ C. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara bakteri yang tumbuh pada media PDA diambil menggunakan jarum ose, kemudian dicampur dengan *potato dextrose broth* (PDB). Suspensi bakteri dihomogenkan dengan menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 48 jam.

b. Proses Pelapisan

Proses pelapisan benih dapat dilakukan secara manual maupun otomatis menggunakan alat *rotary coater*. Konsentrasi *arabic gum* 20% dibuat dengan dilarutkan dalam akuades. Benih jagung

dimasukkan kedalam larutan setelah diperoleh larutan yang homogen. Benih diaduk di dalam larutan selama 20 menit sampai merata, kemudian disaring menggunakan saringan berukuran 18 mesh untuk menghilangkan larutan yang tersisa. Benih dikering-anginkan dalam *laminar air flow cabinet* selama 24 jam, kemudian diukur kadar air benih hingga 7–10%.

Peran *B. subtilis* sebagai PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) pada Pertumbuhan Benih Jagung

Setelah benih dengan perlakuan *bio-coating* ditanam dalam tanah, *B. subtilis* yang awalnya bersifat in aktif dan hanya melindungi benih saat menjadi agen *bio-coating* akan memberikan respon dan aktif saat benih berada pada lingkungan yang sesuai. Saat aktif *B. subtilis* akan mengkolonisasi akar tanaman jagung selanjutnya akan memproduksi fitohormon, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen dan asam absisat. *B. subtilis* mampu menghasilkan auksin dan *Indol Acetyl Acid* (IAA) secara in vitro yang berperan berupa stimulasi pertumbuhan tanaman, serta

dapat merangsang pertumbuhan akar lateral jagung, dengan demikian akan mempengaruhi pertumbuhan tanaman secara keseluruhan (Aryantha, 2004).

B. subtilis memiliki kemampuan sebagai decomposer di dalam tanah sehingga akar tanaman akan lebih mudah menyerap unsur hara untuk kegiatan fotosintesis dalam menghasilkan fotosintat yang berperan dalam pertumbuhan tanaman (Fitrianti, 2016). Selain berperan dalam pertumbuhan tanaman jagung, *B. subtilis* juga berperan sebagai bakteriosin, yaitu zat antimikroba polipeptida atau protein yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang bersifat bakterisida yang disebut dengan bakteriosin. Mekanisme bakteriosin sebagai bakterisida yaitu dengan menyisip pada membran sel target sehingga peranan membran sel menjadi tidak stabil yang mengakibatkan sel menjadi lisis. *B. subtilis* umumnya hidup dengan mengkolonisasi perakaran dan rhizosphere dengan membentuk film atau lapisan tipis dengan ketebalan antara 0,4–0,8 mm. Permukaan perakaran tanaman yang dihuni oleh bakteri tersebut menjadi lebih meningkat

dalam penyerapan air dan hara dari dalam tanah (Compant *et al.*, 2005).

Faktor-faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Optimalisasi *Biocoating* oleh *B. subtilis*

B. subtilis merupakan bakteri yang bersifat termofil fakultatif, dimana bakteri dapat tumbuh pada suhu tinggi. Jadi, dalam proses berlangsungnya *biocoating* suhu yang optimum untuk menjaga hidup bakteri, maka penyimpanan ditempatkan pada suhu ruang yang berkisar 35°C. Keunggulan dari bakteri ini yaitu memiliki protein yang mampu beroperasi meskipun pada lingkungan yang ekstrim dimana enzim bisa melakukan denaturasi (Kosim dan Surya, 2009).

B. subtilis merupakan bakteri yang dapat mengkolonisasi di daerah perakaran tanaman. Formulasi *B. subtilis* sendiri tidak selamanya kondisinya baik, formulasi *B. subtilis* juga akan mengalami penurunan daya viabilitas yang dipengaruhi dalam beberapa waktu penyimpanan serta formulasi *B. subtilis* berpengaruh nyata terhadap perbedaan suhu penyimpanan. Berdasarkan kajian yang dilakukan oleh

Muis *et al.* (2014), formulasi *B. subtilis* pada perlakuan penyimpanan suhu dingin (16°C) memiliki angka viabilitas lebih tinggi dibanding pada perlakuan penyimpanan suhu ruang (30°C). Hal tersebut membuktikan bahwa viabilitas bakteri yang diaplikasikan pada benih dipengaruhi oleh lama penyimpanan dan suhu (Tabel 2). Faktor penting lain yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri selain lama penyimpanan, suhu dan juga muatan nutrisi dalam media antara lain agitasi, aerasi, pH.

Formulasi konsentrasi nutrisi sangat dipengaruhi oleh perbedaan suhu dan lama penyimpanan, sehingga konsentrasi nutrisi yang tidak sesuai mempengaruhi pertumbuhan mikroba. Dalam pertumbuhannya *B. Subtilis* membutuhkan Nutrisi yaitu unsur non logam (sulfur, fosfor), unsur logam (Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Na⁺, K⁺, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, dan Fe²⁺), karbon, nitrogen, vitamin, air, energi (Cappuccino, 2014).

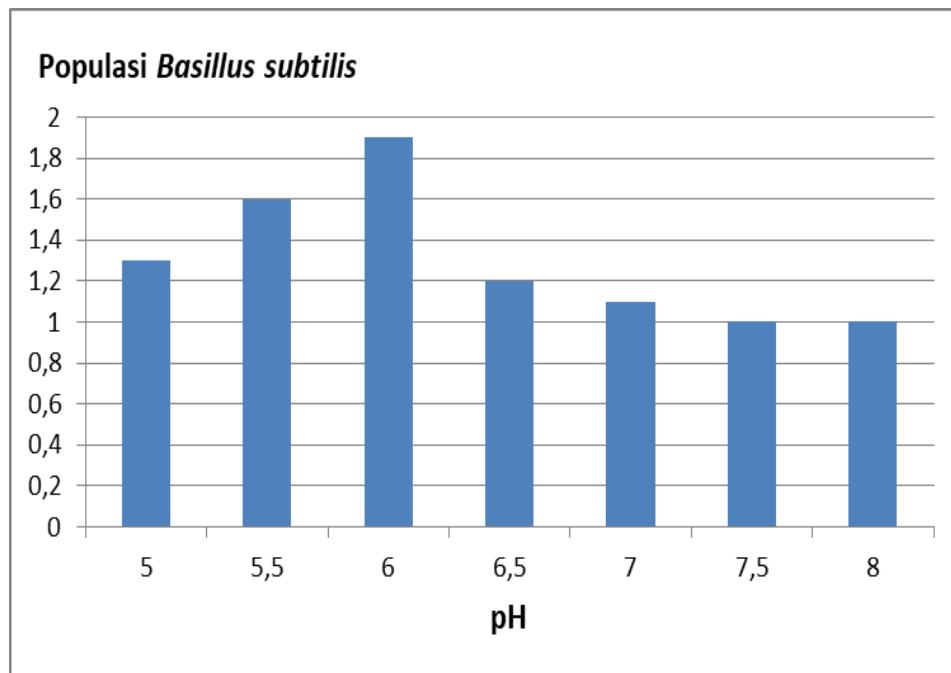
Tabel 2. Data viabilitas koloni *B. subtilis* pada dua kondisi simpan selama 11 bulan

Kondisi	Viabilitas <i>B. subtilis</i> (cfu/ml) pada lama penyimpanan (bulan)					
Simpan	1	2	3	4	5	6
16°C	6.500 x 10 ⁴	296,7 x 10 ⁴	3,87 x 10 ⁴	299 x 10 ⁴	17,51 x 10 ⁴	11,95 x 10 ⁴
30°C	3.000 x 10 ⁴	36,7 x 10 ⁴	1,23 x 10 ⁴	78,1 x 10 ⁴	12,8 x 10 ⁴	2,93 x 10 ⁴

Sumber: Muis *et al* (2014).

Berdasarkan penelitian dari Muis (2006), populasi *B. subtilis* dapat mencapai titik tertinggi saat ditumbuhkan dalam media ekstrak gula cokelat yang ditambah ekstrak ragi dengan kondisi pH 6 (Gambar

2). Pada kondisi tersebut, waktu generasi *B. subtilis* akan meningkat pesat sehingga mencapai titik populasi tertinggi yaitu 28,5 menit pada suhu 40°C (Soesanto, 2008).



Gambar 2. Pengaruh tingkat keasaman (pH) terhadap pertumbuhan *B. subtilis* (Muis, 2006).

Menurut Muis *et al.* (2015) bahan *carrier* atau pembawa yang terbaik yaitu *talk* kemudian bisa juga tepung jagung yang dapat diformulasi dengan *B. subtilis* saat proses *coating*. Bahan-bahan tersebut merupakan materi yang memiliki ukuran partikel yang sangat kecil, mudah tersebar, dan jika dilarutkan dalam air akan mengikat suspensi, sehingga menjadi kental dan mudah berkaitan dengan senyawa bakteri. Dalam pembiakan, bakteri *B. subtilis* dapat ditumbuhkan dengan memanfaatkan limbah organik cair misalnya air kelapa dan

limbah cair pembuatan tahu, akan tetapi media alternatif tersebut perlu ditambahkan sumber karbon, sumber nitrogen, dan unsur mikro, karena bakteri ini bersifat saprofilik. Media tersebut dapat menjadi alternatif biaya yang jauh lebih ekonomis dibanding pembiakan pada media standar laboratorium yang relatif mahal.

Kesimpulan

Dalam mekanisme pelapisan benih jagung oleh bakteri *B. subtilis*, bakteri tersebut akan menghasilkan zat antibiotik

potensial sebagai agen biokontrol yang melindungi dari serangan patogen saat benih pada masa simpan. Saat benih ditanam dan mendapatkan lingkungan yang sesuai, *B. subtilis* yang diaplikasikan sebagai bio-coating ini akan aktif kembali yaitu akan mengkolonisasi akar tanaman jagung selanjutnya akan memproduksi fitohormon, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen dan asam absisat. *B. subtilis* mampu memproduksi auksin dan *Indol Acetyl Acid* (IAA) secara *in vitro* yang berperan dalam menstimulasi pertumbuhan tanaman, merangsang pertumbuhan akar jagung, serta mengurai bahan organik dalam pertumbuhan tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal RL. 1980. *Seed Technology*. New Delhi (IN): Oxford and IBH Publishing co. Bombay Calcuta.
- Aryantha, Pangesti. 2004. Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA dalam Peningkatan Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau pada Kondisi Hidroponik. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 9 (2): 43-46.
- Backman PA, Brannnen PM, Mahaffe WF. 1994. Plant response and disease, p 7-11. In Stephen PM, Bowen GD (eds.). *Improving plant production with rhizosphere bacteria*. Australia: Pruc Third Int Work PGPR South.
- Cappuccino JG, Sherman, N. 2013. *Manual Laboratorium Mikrobiologi*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Fitrianti I. 2016. Uji Konsentrasi Formulasi *Bacillus subtilis* bnt8 terhadap pertumbuhan benih jagung (*Zea mays* L.) secara in vitro. Skripsi Universitas Islam Negeri Alaudin. Makasar.
- Ilyas S. 2003. Teknologi pelapisan benih. Makalah seminar benih *pellet*. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Justice LO, Bass LN. 2002. *Prinsip dan Praktek Penyimpanan Benih*. PT Rajagrafindo. Jakarta.
- Kim J, Cook DM. 1997. Population dynamics of *Bacillus spp.* L324-92 R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RN 10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 87: 559-564.
- Kosim M, Surya RP. 2009. Pengaruh suhu pada protease dari *Bacillus subtilis*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Liu ZL, Sinclair JB. 1993. Colonization of soybean roots by *Bacillus megatrium* B153-2-2. *J. Soil Biol Biochem* 25: 849-855.
- Madyasari I. 2017. Efektivitas Seed Coating dan Biopriming dengan Rizobakteri dalam Mempertahankan Viabilitas Benih Cabai dan Rizobakteri selama Penyimpanan. *J. Hort. Indonesia* 8(3): 192-202.
- Muis A. 2006. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. *Indonesia J. Agric. Sci.* 7(2): 51-56.

- Muis A, Nonci N, Djaenuddin N. 2014. Viabilitas dan uji formulasi bakteri antagonis sebagai biopestisida pengendalian penyakit hawar upih daun *Rhizoctonia solani* dan bercak daun *Bipolaris maydis*. Balai Penelitian Serealia. Maros.
- Muis A, Nonci N, Djaenuddin N. 2015. Evaluasi lima jenis inert carrier dan formulasi *Bacillus subtilis* untuk pengendalian hawar pelepah jagung (*Rhizoctonia solani* Kuhn). J. HPT Tropika 15 (2): 164–169.
- Noviana L, Raharjo B. 2009. Viabilitas rhizobakteri *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.3 pada media pembawa tanah gambut disubstitusi dengan padatan limbah cair industri rokok. Bioma 11: 30-39.
- Sadjad S. 1993. *Dari Benih kepada Benih*. PT Gramedia Widiasarana Indonesia. Jakarta.
- Sari M, Widajati E, Asih PR. 2013. Seed coating sebagai pengganti fungsi polong pada penyimpanan benih kacang tanah. J. Agron. Indonesia, 41, 215-220.
- Soesanto L. 2008. Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Sulistiani. 2009. Formulasi spora *Bacillus subtilis* sebagai agens hayati dan PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) pada berbagai bahan pembawa. Skripsi. Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Soenartiningih M, Pabbage S, Djaenuddin N. 2011. Penggunaan inokulum antagonis (*Trichoderma* dan *Gliocladium*) dalam menekan penyakit busuk pelepah pada jagung. Prosiding Seminar Nasional Serealia. Maros.
- Sarief ES. 1985. *Kesuburan dan Pemupukan Tanah Pertanian*. Pustaka Buana. Bandung.
- van Elsas JD, Dijkstra AF, Govaert JM, van Veen JA. 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two sites of different textures in microplots. FEMS Microbiology, Ecology 38: 151-160.
- Young CS, Lethbridge G, Shaw LJ. 1995. Burns Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in non-planted and rhizosphere soil. Soil Biology and Biochemistry 1017-1026.
- Zivkovic S, Stojanovic S, Ivanovic Z, Garrilovic V. 2010. Screening to anthagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Arc. Biol. Sci. Belgrade 62: 611- 623.