

KETAHANAN BAKTERI PSIKROTROFIK DARI PRODUK PERIKANAN SEGAR TERHADAP BAKTERIOSIN

(Resistance of Psychrotrophic Bacteria from Fresh Fishery Products Against Bacteriocins)

Amir Husni^{*)}, Iwan Y.B. Lelana^{*)}, dan Endang S. Rahayu^{**)}

ABSTRACT

Fresh fishery products are highly perishable and susceptible to spoilage caused by rapid growth and activity of bacteria. Psychrotrophic bacteria are the major microorganisms responsible for spoilage when these products stored in ice or under refrigeration. The purposes of this study were to isolate psychrotrophic bacteria from fresh fishery products and to evaluate its resistance to bacteriocins.

Fresh fishery products (kembung fish, shrimp, shellfish) samples were obtained from Demangan and Kranggan traditional market. Colony count methods were used to enumerate bacteria, whereas isolation and identification of bacteria was performed by the identification method of Lahlallec and Colin (1995). The identification conducted were covering Gram staining and cell morphological examination (cell form), motility, presence or absence of an oxidise, mode of glucose utilization, and capacity for glucose or lactose fermentation, H₂S production, and gas production. The resistance assays by bacteriocin were carried out using agar diffusion method.

Seventeen isolates were found and they were classified as *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, and *Flavobacterium/ Cytophaga*. The results show that psychrotrophic bacteria resistance to supernatant of lactic acid bacteria and nisin.

Key words: Fresh fishery products, psychrotrophic bacteria, bacteriocins

PENDAHULUAN

Produk-produk perikanan segar merupakan bahan pangan yang sangat mudah mengalami kerusakan. Kerusakan ini dapat terjadi secara biokimiawi maupun secara mikrobiologis. Oleh karena itu perlu dilakukan usaha untuk meningkatkan daya simpan dan daya awet hasil perikanan melalui proses pengolahan dan pengawetan, salah satunya dengan penyimpanan dingin.

Penggunaan suhu rendah selain dapat menghambat aktivitas mikrobia dan enzim juga dapat mempertahankan sifat asli ikan segar. Namun, penyimpanan dingin masih memiliki keterbatasan yaitu umur simpan ikan yang relatif pendek. Penyebab utama kerusakan ikan selama penyimpanan dingin adalah adanya aktivitas dan pertumbuhan bakteri psikrotrofik. Adanya bakteri psikrotrofik dalam jumlah besar, dapat menyebabkan timbulnya berbagai macam bau dan kerusakan fisik pangan. Oleh karena itu perlu diupayakan pengendaliannya untuk meningkatkan daya simpan hasil perikanan segar selama penyimpanan dingin.

Bakteriosin merupakan agensia biopreservasi yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dan banyak digunakan dalam pengawetan makanan khususnya makanan yang disimpan dingin dan dikemas vakum (Ray, 1996), karena komponen ini aman sebab dihasilkan oleh bakteri yang

non-patogen dan tidak memberikan efek karsinogenik (Eckner, 1992). Namun sejauh mana bakteriosin dapat menghambat bakteri psikrotrofik pada perikanan belum diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai ketahanan bakteri psikrotrofik yang diisolasi dari produk perikanan terhadap bakteriosin.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri psikrotrofik dari produk perikanan segar dan mengetahui ketahanannya terhadap bakteriosin.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Bahan penelitian berupa sampel produk perikanan (ikan kembung, udang dan kerang) dalam keadaan masih segar, diambil dari pasar Demangan dan pasar Kranggan, Yogyakarta

Metode

Untuk mempertahankan tingkat kesegaran sampel, selama masa pengangkutan dari pasar ke laboratorium, sampel dimasukkan ke dalam *container* terbuat dari bahan styrofoam dan didinginkan dengan menggunakan es batu.

Pada fase penyiapan sampel, sampel dimasukkan ke dalam kantong yang steril kemudian digerus/ditumbuk menggunakan mortar porselin yang telah disterilkan, kemudian sampel disimpan dalam ruangan pendingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Penggerusan/penumbukan dilakukan dalam kondisi aseptis. Analisis dilakukan kurang dari 24 jam dari saat pengambilan ikan. Selanjutnya, analisis dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut :

A. Isolasi Bakteri Psikrotrofik

Isolasi bakteri dari produk perikanan segar dilakukan menggunakan metode *spread plate*, yaitu 25 gram bahan dimasukkan ke dalam larutan 0,1 % air pepton steril sebanyak 225 ml dan diblender, kemudian dilakukan seri pengenceran sampai dengan 10^{-6} , dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml dan disebar pada media *Tryptone Soya Agar (TSA)*. Setelah diinkubasi pada suhu 4°C selama 10 hari, koloni yang tumbuh dimurnikan sebanyak 3-4 kali menggunakan metode *streak plate* pada TSA yang diinkubasi 10 hari pada 4°C . Apabila dihasilkan koloni yang tidak seragam maka tiap-tiap koloni dimurnikan kembali dengan metode yang sama sampai dihasilkan koloni yang seragam. Koloni dengan kenampakan yang seragam merupakan kultur murni. Pengecekan terhadap kultur murni juga dilakukan menggunakan mikroskop.

^{*)} Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta

^{**)} Fakultas Teknologi Pertanian UGM, Yogyakarta

B. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri yang dilakukan meliputi pengamatan morfologi (bentuk sel), pengecatan Gram, motilitas, ada tidaknya oksidase, tipe fermentasi dan uji penggunaan gula (Lahallec dan Colin, 1995).

C. Uji Ketahanan Bakteri Psikrotrofik Terhadap Kultur Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin dan Nisin

1. Uji ketahanan bakteri psikrotrofik terhadap kultur bakteri asam laktat penghasil bakteriosin

Uji ini dilakukan untuk mengetahui ketahanan bakteri psikrotrofik terhadap beberapa bakteri asam laktat yang diduga sebagai penghasil bakteriosin dan mendapatkan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin yang paling potensial penghambatannya terhadap bakteri psikrotrofik.

Isolat bakteri asam laktat yang diduga menghasilkan bakteriosin yang digunakan adalah *Lactobacillus* BR-4B, *Lactobacillus* BR-10, *Streptococcus/Enterococcus* BR-27, *Pediococcus acidilactici* BRP-3B, Mcod-8, *Pediococcus* BRPS-34, *Pediococcus* BRP-34 dan *L. sake* BR-706 yang diperoleh dari Prof. Bibek Ray, University of Wyoming, USA.

Dalam pengujian ini dilakukan dengan metode langsung *overlay* dengan cara sebagai berikut: (1) Isolat bakteri psikrotrofik ditumbuhkan pada media cair NB (*nutrient broth*) selama 24 jam. (2) Disiapkan 10 ml media tripton glukosa yeast-ekstrak (TGE) agar dalam cawan Petri steril. (3) Isolat bakteri psikrotrofik umur 24 jam sebanyak 40 µl dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi 5 ml NB agar lunak suhu 40°C lalu dihomogenkan menggunakan vortek kemudian dituang ke dalam cawan Petri steril yang berisi 10 ml media TGE agar keras lalu didinginkan dalam ruang pendingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) dengan tujuan supaya media cepat mengeras dan bakteri tidak segera melakukan aktivitas pertumbuhan. (4) Setelah didinginkan selama 1 jam, TGE agar keras selanjutnya diinokulasi (dengan tusukan) dengan kultur bakteri asam laktat penghasil bakteriosin lalu disimpan dalam ruang pendingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) selama 1 jam (dengan harapan awal aktivitas pertumbuhan semua bakteri dapat berlangsung secara bersama) kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Zone jernih (tidak adanya pertumbuhan bakteri) di sekitar tusukan bakteri asam laktat menunjukkan adanya penghambatan terhadap bakteri psikrotrofik oleh bakteri asam laktat. Dalam penelitian ini juga dilakukan uji penghambatan bakteri asam laktat terhadap bakteri indikator *Enterococcus faecalis* MI yang rentan terhadap bakteriosin.

2. Uji ketahanan bakteri psikrotrofik terhadap supernatan bakteri asam laktat dan nisin

Metode yang digunakan untuk uji ketahanan bakteri psikrotrofik terhadap supernatan bakteri asam laktat dan nisin adalah metode difusi agar (Ray, 1996). Uji ini dilakukan dengan menggunakan supernatan netral bakteri asam laktat penghasil bakteriosin yang paling potensial dan nisin (SIGMA). Cara untuk mempersiapkan supernatan netral adalah: isolat bakteri asam laktat

penghasil bakteriosin ditumbuhkan pada media cair TGE selama 18 jam. Selanjutnya massa sel dipisahkan dengan sentrifugasi 3.500 rpm selama 20 menit lalu supernatan yang diperoleh dinetralkan (pH 6,5 - 7) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit.

Supernatan yang telah dinetralkan dan dipanaskan diuji aktifitas penghambatannya terhadap sejumlah bakteri indikator (*Lactobacillus plantarum* NCDO 95, *Pediococcus acidilactici* LB 34) yang diperoleh dari Prof. Bibek Ray, University of Wyoming, USA dan bakteri psikrotrofik. Pengujian dilakukan dengan langkah sebagai berikut: (1) Isolat bakteri psikrotrofik ditumbuhkan pada media cair NB (*nutrient broth*) selama 24 jam. (2) Disiapkan 10 ml media TSA dalam cawan Petri steril. (3) Isolat bakteri psikrotrofik sebanyak 40 µl dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang masing-masing berisi 5 ml NB agar lunak suhu 40°C lalu dihomogenkan menggunakan vortek kemudian dituang ke dalam cawan Petri steril yang berisi 10 ml media TSA lalu didinginkan dalam ruang pendingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). (4) Setelah didinginkan selama 1 jam, kemudian diberi supernatan sebanyak 5 µL untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Zone jernih (tidak adanya pertumbuhan bakteri) pada tetesan supernatan menunjukkan adanya penghambatan terhadap bakteri psikrotrofik oleh supernatan tersebut. Untuk uji aktifitas penghambatan terhadap sejumlah bakteri indikator dilakukan dengan langkah yang sama namun media yang digunakan adalah media TGE. Cara pengujian supernatan ini juga dilakukan untuk nisin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Bakteri Psikrotrofik

Untuk mendapatkan isolat bakteri psikrotrofik dilakukan isolasi bakteri psikrotrofik dari produk perikanan segar. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi bakteri dari 3 jenis produk perikanan segar, yaitu: ikan kembung, udang, dan kerang. Dari hasil isolasi diperoleh 17 isolat, yaitu 5 isolat dari ikan kembung, 8 isolat dari kerang, dan 4 isolat dari udang. Dari isolat-isolat yang diperoleh tersebut kemudian dilakukan identifikasi. Identifikasi bertujuan untuk menentukan genus bakteri psikrotrofik yang diperoleh dari isolasi dengan metode Lahallec dan Colin (1995). Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari 17 isolat bakteri psikrotrofik yang diperoleh dan setelah dilakukan identifikasi dapat dikelompokkan ke dalam 3 genus (Lahallec dan Colin, 1995). Genus *Pseudomonas* merupakan genus yang paling banyak (9 isolat), kemudian diikuti *Xanthomonas* (5 isolat), dan *Flavobacterium/Cytophaga* (3 isolat). *Pseudomonas* merupakan genus yang paling cepat menyebabkan pembusukan pada udang yang disimpan pada suhu 0°C dan 5°C. Pada suhu penyimpanan tersebut udang hanya mempunyai daya simpan masing-masing selama 24 hari dan 12 hari (Cox dan Lovell, 1973). Campbell dan Williams (1952) melaporkan bahwa *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* dan *Flavobacterium* merupakan kelompok yang paling dominan pada udang segar. Selama penyimpanan 16 hari, *Micrococcus* dan *Flavobacterium* mengalami penurunan, namun *Achromobacter* jumlahnya mulai meningkat. Pola yang sama juga terjadi pada udang putih, coklat, dan pink.

Table 1. Characteristics of psychrotrophic bacteria from fresh fishery products

Isolate	Source	Gram	Cell form	Motility	Oxidase	O/F	Sugar Fermentation	Genus
K-1	Shellfish	-	Rod	Motil	+	O	A/K	<i>Pseudomonas</i>
K-2	Shellfish	-	Rod	Motil	+	O	A/K	<i>Pseudomonas</i>
K-3	Shellfish	-	Rod	Motil	+	O	A/K	<i>Pseudomonas</i>
K-4	Shellfish	-	Rod	Motil	-	Alk	K/K	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>
K-5	Shellfish	-	Rod	Motil	-	Alk	K/A	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>
K-6	Shellfish	-	Rod	Motil	+	O	K/K	<i>Pseudomonas</i>
K-7	Shellfish	-	Rod	Motil	+	O	K/K	<i>Pseudomonas</i>
K-8	Shellfish	-	Rod	Motil	-	O	K/K	<i>Xanthomonas</i>
I-1	Kembung fish	-	Rod	Motil	-	O	K/K	<i>Xanthomonas</i>
I-2	Kembung fish	-	Rod	Motil	-	O	K/K	<i>Xanthomonas</i>
I-3	Kembung fish	-	Rod	Motil	+	O	K/K	<i>Pseudomonas</i>
I-4	Kembung fish	-	Rod	Motil	+	O	K/K	<i>Pseudomonas</i>
I-5	Kembung fish	-	Rod	Motil	-	O	K/A	<i>Xanthomonas</i>
U-1	Shrimp	-	Rod	Motil	+	O	K/K	<i>Pseudomonas</i>
U-2	Shrimp	-	Rod	Motil	-	Alk	K/A	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>
U-3	Shrimp	-	Rod	Motil	-	O	A/A	<i>Xanthomonas</i>
U-4	Shrimp	-	Rod	Motil	+	O	K/K	<i>Pseudomonas</i>

Note: O = Oksidative, Alk. = Alkaline, F= Fermentative
 K/A = Only glucose can be fermented
 A/A = Glucose and lactose or sucrose can be fermented
 A/K = Lactose and sucrose can be fermented
 K/K = Glucose and lactose or sucrose can not be fermented

Jumlah dan jenis mikrobia yang ditemukan pada ikan yang baru ditangkap dipengaruhi oleh lokasi geografis, musim, dan cara pemanenan. Mikroflora ikan juga berhubungan dengan lingkungan dimana ikan dipanen. *Aeromonas* dan *Vibrio* merupakan bakteri yang sering menimbulkan penyakit pada ikan budidaya. Secara umum daging ikan sehat yang baru ditangkap adalah steril (Hayes, 1995). Dengan demikian apabila di suatu lokasi budidaya terdapat serangan bakteri tersebut, maka penanganan pascapanen ikan harus diperhatikan.

B. Ketahanan Bakteri Psikrotrofik Terhadap Kultur Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin dan Nisin

Uji ketahanan bakteri psikrotrofik terhadap bakteri asam laktat penghasil bakteriosin yang dilakukan meliputi kultur bakteri asam laktat dan supernatannya. Hasil uji penghambatan bakteri psikrotrofik terhadap kultur bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dapat dilihat pada Tabel 2, sedang hasil uji penghambatan bakteri psikrotrofik terhadap supernatan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dan nisin dapat dilihat pada Tabel 3.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa tidak semua isolat bakteri asam laktat penghasil bakteriosin berpotensi menghambat bakteri psikrotrofik. Isolat bakteri asam laktat yang berpotensi menghambat semua isolat bakteri psikrotrofik dari produk perikanan segar adalah Mcod-8, BRP-3B, dan BRP-34. BRP-3B maupun BRP-34

keduanya merupakan bakteri asam laktat kelompok *Pediococcus*. Oleh karena itu dalam penelitian selanjutnya yang digunakan adalah Mcod-8 dan BRP-34.

Table 2. Inhibition of *Enterococcus faecalis* MI and isolate of psychrotrophic bacteria by isolate of lactic acid bacteria (LAB)

Isolate of LAB	<i>Enterococcus faecalis</i> MI	Isolate of psychrotrophic bacteria		
		K-1	K-2	K-3
BR-4B	-	+	+	+
BR-10	-	-	+	+
BR-27	-	+	+	+
BRP-3B	+	+	+	+
Mcod-8	+	+	+	+
BRPS-34	+	+	-	+
BRP-34	+	+	+	+
BR-706	-	+	-	-

Note: + = inhibited
 - = not inhibited

Aktivitas antimikrobia pada bakteri asam laktat dapat diketahui dengan pengujian penghambatan terhadap bakteri indikator. Pada penelitian ini lebih diarahkan pada bakteri asam laktat yang mempunyai aktivitas antimikrobia berupa bakteriosin sehingga digunakan bakteri indikator yang tahan asam agar dapat diketahui bahwa penghambatan yang terjadi bukan karena asam.

Bakteriosin dapat membunuh mikrobia yang secara taksonomi mempunyai hubungan dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin (Daeschel, 1992). Oleh sebab itu digunakan bakteri indikator yang berasal dari kelompok bakteri asam laktat.

Adanya aktivitas antimikrobia dapat diketahui setelah inkubasi 1 hari yang ditandai timbulnya zona jernih di sekitar koloni yang tumbuh di media lapisan bawah. Zona jernih timbul karena bakteri indikator tidak dapat tumbuh, ini berarti metabolit bakteri asam laktat memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri indikator.

Zona jernih yang timbul sangat bervariasi, menurut Ray (1992) bakteriosin menghasilkan zona jernih yang jelas, bulat dan luas. Jika tidak demikian diperkirakan akibat aktivitas hidrogen peroksida, asam, atau diasetil. Kemampuan isolat berbeda-beda tergantung jenis isolat dan kandungan nutrisi dalam media. Kemampuan penghambatan ini disebabkan adanya komponen antimikrobia yang dimiliki dari masing-masing kultur bakteri asam laktat tersebut, diantaranya asam laktat, asam asetat, diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Efektivitas diacetyl dapat menghambat atau mengurangi pertumbuhan atau membunuh sel beberapa bakteri patogen dan pembusuk dengan konsentrasi rendah (100 ppm) dan tinggi (1000 ppm) (Ray, 1992).

Table 3. Inhibition of indicator (NCDO & PI) and psychrotrophic bacteria by supernatant of lactic acid bacteria (LAB) and nisin.

Treatment	Inhibition activity (AU/ml)				
	Indicator bacteria		Isolate of psychrotrophic bacteria		
	NCDO	PI	K-1	K-2	K-3
BRP-34	200	200	0	0	0
Mcod-8	0	0	0	0	0
Nisin	12000	12000	0	0	0

Note: NCDO = *Lactobacillus plantarum* NDCO 95
 PL = *Pediococcus acidilactici* LB 34

Hidrogen peroksida yang diproduksi bakteri asam laktat untuk melindungi dari keracunan oksigen. Hidrogen peroksida dapat menghasilkan radikal hidroksi yang sangat reaktif dan dapat merusak komponen sel penting semacam membran lemak dan DNA bakteri patogen dan pembusuk (Daeschel, 1992).

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa supernatant bakteri asam laktat dan nisin tidak mampu menghambat bakteri psikrotrofik. Hal ini terjadi karena semua isolat bakteri psikrotrofik adalah bakteri Gram negatif karena nisin dan bakteriosin dari bakteri asam laktat kelompok *Pediococcus* hanya efektif menghambat bakteri Gram positif dan tidak efektif menghambat bakteri Gram negatif.

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pediocin AcH dari *P. acidilactici* H mempunyai antimikrobia terhadap *Pseudomonas putida* dan

Aeromonas hydrophila (Bhunia dkk., 1988). Namun, dalam penelitian-penelitian selanjutnya dilaporkan bahwa molekul pediocin AcH tidak dapat menyerang (*adsorb*) spesies-spesies tersebut (Bhunia dkk., 1991 dalam Ray, 1992). Hal ini menunjukkan bahwa penghambatan bakteri Gram negatif kemungkinan bukan karena pengaruh pediocin AcH.

Secara normal bakteri Gram negatif adalah resisten terhadap pediocin AcH. Beberapa penelitian yang dilakukan Ray (1992) menunjukkan bahwa jika sel bakteri Gram negatif mengalami luka karena *sublethal stress*, ternyata menjadi sensitif terhadap pediocin AcH. Rahayu dkk. (1998), melaporkan bahwa senyawa yang diduga bakteriosin dari TGR-2 efektif dipakai sebagai agensia produk susu yang didinginkan. Gilliland dan Speck (1975) juga melaporkan bahwa penambahan $8,4 \times 10^7$ /ml *Lactobacillus bulgaricus* NCS1 dapat menekan *P. fragi* dalam media susu yang diinkubasi pada 7°C.

Nisin secara normal tidak efektif terhadap bakteri Gram negatif. Namun demikian dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa pada kondisi tertentu (*sublethal stress*) nisin dapat efektif menghambat bakteri Gram negatif. Ogdem dkk. (1988) dalam Ray (1992) melaporkan bahwa 3 strain *Flavobacterium* dan satu strain *Hafnia* sangat sensitif terhadap nisin. Ray dan Kalchayanand (1991) dalam Ray (1992) juga melaporkan bahwa bakteri Gram negatif seperti *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* dan *Pseudomonas* spp. menjadi sensitif terhadap nisin pada waktu diberi perlakuan beku, panas, dan pH rendah.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan :

1. Isolat bakteri psikrotrofik dari produk perikanan segar (ikan kembung, kerang dan udang) terdiri dari genus *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, dan *Flavobacterium/Cytophaga*
2. Isolat bakteri psikrotrofik dari produk perikanan segar didominasi oleh bakteri Gram negatif dan dapat dihambat oleh kultur bakteri asam laktat penghasil bakteriosin namun tidak dapat dihambat oleh supernatant bakteri asam laktat dan nisin.
3. Isolat bakteri psikrotrofik pada kondisi normal tidak dapat dihambat oleh bakteriosin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Bibek Ray dari University of Wyoming Amerika atas bantuan isolatnya dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. dan Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Applied Bacteriol.*, 65: 261-268.

- Campbell, L.L.Jr. dan Williams, O.B. 1952. The bacteriology of Gulf Coast shrimp. IV. Bacteriological, chemical and organoleptic changes with ice storage. *Food Technol.* 6: 125.
- Cox, N.A. dan Lovell, R.T. 1973. Identification and characterization of the microflora and spoilage bacteria in freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *J. of Food Sci.* 38: 679-681.
- Daeschel, M.A. 1992. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *In* Ray, B. dan Daeschel, M.A. (Eds). *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press. New York.
- Ekner, K.F., 1992. Bacteriocin and food applications. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 4: 204-209
- Gilliland, S.E. dan Speck, M.L. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in nonfermented refrigerated foods. *J. of Food Sci.* 40: 903-905.
- Hayes, P.R. 1995. *Food microbiology and hygiene*. Chapman & Hall.
- Lahallec, C. dan Colin, P. 1995. Psychrotrophic microflora. *In* Bourgeols, C.M. dan Leveau, J.Y. (Eds.). *Microbiological control for food and agricultural product*. VCH Publisher. New York.
- Rahayu, E.S., Widowati, T.W., dan Margino, S. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in refrigerated milk product by antibacteria of *Lactobacillus plantarum* TGR-2. Dalam Raharjo, S., Marseno, D.W., dan Supartono, W. (Eds.). *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi*, 15 Desember 1998. Yogyakarta.
- Ray, B. 1992. Cells of lactic acid bacteria as food biopreservatives. *In* Ray, B. dan Daeschel, M.A. (Ed.): *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press. New York.
- Ray, B. 1996. *Fundamental food microbiology*. CRC Press. New York.