

SELEKSI DAN OPTIMASI PROSES PRODUKSI BAKTERIOSIN DARI *Lactobacillus sp.*

Sri Usmiati dan Tri Marwati

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 12 A Bogor

email :bb_pascapanen@litbangdeptan.go.id, bb_pascapanen@cbn.net.id

Bakteriosin sebagai agen biopreservatif sangat potensial digunakan untuk mengendalikan beberapa bakteri kontaminan pada daging dan produk daging, tetapi secara komersial ketersediaannya masih sedikit dan harganya sangat mahal, padahal koleksi bakteri asam laktat (BAL) sebagai produsernya di Indonesia tersedia cukup banyak. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan bakteri calon penghasil bakteriosin yang potensial dari beberapa isolat bakteri *Lactobacillus sp.* yang mampu menekan pertumbuhan *Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium*, dan *Listeria monocytogenes*, serta kondisi optimum proses produksi bakteriosin. Penelitian dilakukan dengan dua tahap yaitu pemilihan isolat dan optimasi proses produksi bakteriosin. Pemilihan isolat meliputi kegiatan: pertama yaitu aktivasi isolat dan penghitungan jumlah koloni. Parameter yang diamati adalah visualisasi adanya kekeruhan pada media cair *nutrien broth* serta jumlah koloni isolat yang telah aktif. Kedua merupakan kegiatan produksi bakteriosin dan aktivitas penghambatan. Parameter pengamatan adalah didapatkannya bakteriosin dari isolat terpilih dan hasil uji terhadap bakteri *E.coli*, *S.thypimurium*, dan *L.monocytogenes*. Ketiga adalah mencari kurva dan fase pertumbuhan isolat terpilih. Parameter yang diamati yaitu nilai pH, *optical density* (OD) kultur pada media MRS dan nilai log dari jumlah koloni isolat terpilih yang diplot ke dalam bentuk kurva sigmoid (S). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat yang paling potensial sebagai calon produser bakteriosin adalah SCG 1223. Kondisi optimum produksi bakteriosin yang memiliki daya hambat representatif adalah pH 5, suhu 33,5 °C selama 9 jam inkubasi dengan penghambatan terhadap *S.thypimurium* sebesar 638,803 mm²/ml, *E.coli* sebesar 623,264 mm²/ml dan *L.monocytogenes* sebesar 509,434 mm²/ml.

Kata kunci: optimasi, produksi, bakteriosin, biopreservatif, *Lactobacillus sp.*

ABSTRACT. S. Usmiati and T. Marwati. 2007. Selection and optimation of process of bacteriocin production from *Lactobacillus sp.* Bacteriocin as biopreservative agent was potential to suppress some contaminant bacteria on meat and meat products, but commercial availability still limited and costly. On the other hand, the availability of lactic acid bacteria collection as a source of bacteriocin producer in Indonesia is abundant and cheap. For this reason, bacteriocin from some potential Lactic Acid Bacteria (LAB) need to be produced to suppress contaminant bacteria on meat and meat products. The objectives of research were to select bacteria as bacteriocin producer from some isolate *Lactobacillus sp* which suppress growth of *Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium*, dan *Listeria monocytogenes*, and to optimize the process of bacteriocin production. The research was done by two steps activities, i.e. potential isolate selection and optimization of bacteriocin production process. Isolate selection activity included: firstly, isolate activation and counted number of colony. The parameters were visualization of turbidity the liquid nutrient broth and number of colonies isolate activated. Secondly, step to produce bacteriocin and its inhibition. The parameters were bacteriocin production of selected isolate and result of its inhibition on *E.coli*, *S.thypimurium*, dan *L.monocytogenes*. Thirdly, activity to obtain the curve and growth phase of selected isolate. The parameters of observation were pH, optical density (OD) of culture on MRS media and log number of selected isolate colony which has been plotted on sigmoid curve (S). Result of research showed that isolate which was selected as bacteriocin producer was SCG 1223. The optimum condition for bacteriocin production which was optimum in inhibition were pH 5, temperature 33.5°C for 9 hours incubation which has inhibition on *S.thypimurium* 638.803 mm²/ml, *E.coli* 623.264 mm²/ml and *L.monocytogenes* 509.434 mm²/ml.

Keywords: optimation, production, bacteriocin, biopreservative, *Lactobacillus sp.*

PENDAHULUAN

Program swasembada daging pada tahun 2010 harus diikuti oleh terjaminnya mutu dan tingkat keamanan pangannya. Kontaminan mikrobiologis merupakan salah satu penyebab mutu daging berkurang dan menjadi tidak aman untuk dikonsumsi. Mata rantai teknis operasional dan pengelolaan akan berpengaruh terhadap mutu daging yang dihasilkan (Yonathan, 2000).

Mutu daging dapat dinilai dari tingkat kontaminan mikroba patogen. Kontaminasi yang disebabkan oleh mikroba seperti *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Listeria sp* dan lain-lain sangat dimungkinkan karena sifat fisiko-kimia daging (aw/water activity, pH dan zat gizi) dapat mendukung pertumbuhan mikroba (Hugas, 1998). Kontaminasi mikroba patogen dapat menyebabkan degradasi protein yaitu proses pemecahan protein menjadi molekul-molekul sederhana seperti asam amino, sehingga

sel-sel daging menjadi rusak atau busuk. Oleh karena itu jaminan mutu dan keamanan pangan daging menjadi sangat penting (Shimoni dan Labuza, 2000), karena keberadaan mikrobial patogen pada daging dapat menyebabkan penyakit bahkan kematian bagi konsumen.

Escherichia coli terutama dijumpai pada daging segar (Ho *et al.*, 2004) atau daging masak yang terkontaminasi oleh daging mentah atau sayuran selama proses pemasakan (Veclerc *et al.*, 2002). Strain patogen *E. coli* dapat menimbulkan penyakit diare berdarah, pembengkakan dan kelainan ginjal, demam, kelainan syaraf, bahkan kematian (Veclerc *et al.*, 2002). *Salmonella sp* merupakan bakteri patogen (Okolocha dan Ellerbroek, 2005) dan menyebabkan masalah kesehatan yang serius (Deumier dan Collignan, 2003). *Salmonella* merupakan kontaminan utama pada daging sapi dan unggas segar (Ho *et al.*, 2004). Di Perancis pada tahun 1998, *Salmonella* merupakan mikrobial patogen yang paling sering ditemukan (71%) pada beberapa kasus penyakit, bahkan menyebabkan kematian (Haeghebaert *et al.* dalam Veclerc *et al.*, 2002). *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri psikrotropik patogen terdapat pada daging unggas dan sapi serta olahannya (Veclerc *et al.*, 2002; Mataragas, 2003; Ho *et al.*, 2004), umum ditemukan di rumah pemotongan dan industri pengolahannya (Deumier dan Collignan, 2003), dapat bertahan pada pH, *aw* dan suhu rendah, sehingga berbahaya untuk produk beku. Masalah yang dihadapi akibat infeksi *L. monocytogenes* yaitu 63% *bacteriemia* dan 26% bermasalah dengan sistem syaraf (Veclerc *et al.*, 2002).

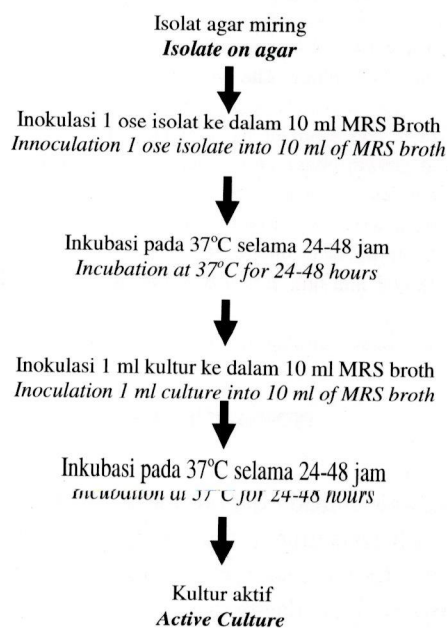
Peningkatan mutu dan keamanan daging dapat ditempuh dengan menurunkan jumlah mikrobial patogen secara biopreservasi menggunakan bakteriosin (Hugas, 1998; Sullivan *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006). Biopreservasi sangat potensial untuk diaplikasikan dalam pengawetan pangan (Ammor *et al.*, 2006) karena dapat mengontrol pertumbuhan bakteri patogen secara alami dan aman (Mataragas, 2003).

Pemakaian bakteriosin komersial sebagai biopreservatif sudah dilakukan di beberapa negara dan diaplikasikan pada beberapa jenis makanan. Beberapa galur bakteri asam laktat (BAL) dapat menghasilkan senyawa protein yang disebut bakteriosin, dan bersifat bakterisidal terhadap bakteri gram positif dan gram negatif (Tahara *et al.*, 1996). Bakteriosin dapat diproduksi oleh *Lactococcus*, *Lactobacillus* dan *Pediococcus* yang berasal dari berbagai bahan makanan, misalnya nisin diproduksi oleh *Lactococcus lactis*, pediosin AcH dihasilkan *Pediococcus acidilactic*. Beberapa kelebihan bakteriosin sehingga potensial digunakan sebagai biopreservatif yaitu: (i) bukan bahan toksik dan mudah mengalami degradasi oleh enzim proteolitik karena merupakan senyawa protein; (ii) tidak membahayakan

mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan; (iii) dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pengawet pangan; (iv) penggunaannya fleksibel; dan (v) stabil terhadap pH dan suhu yang cukup luas sehingga tahan terhadap proses pengolahan yang melibatkan asam dan basa, serta kondisi panas dan dingin (Cleveland *et al.*, 2001).

Bakteriosin sebagai agen biopreservatif sangat potensial digunakan untuk mengendalikan beberapa bakteri kontaminan, tetapi secara komersial ketersediaannya masih sedikit dan harganya sangat mahal. Di lain pihak, koleksi BAL di Indonesia dapat dimanfaatkan untuk produksi bakteriosin karena tersedia cukup banyak. Oleh karena itu penelitian produksi bakteriosin dari beberapa BAL yang potensial perlu dilakukan. Produksi bakteriosin umumnya dilakukan dalam substrat cair. Secara umum kondisi optimum produksi bakteriosin dipengaruhi oleh fase pertumbuhan, pH media, suhu inkubasi, jenis sumber karbon, jenis sumber nitrogen, dan konsentrasi NaCl (Kim dan Ahn, 2000).

Faktor pH media berpengaruh terhadap pertumbuhan sel bakteri sehingga mempengaruhi produksi bakteriosin. Produksi bakteriosin meningkat dengan meningkatnya pH hingga pH optimum, selanjutnya mengalami penurunan. Sementara itu faktor suhu berpengaruh terhadap meningkatnya produksi bakteriosin sekaligus dapat membunuh BAL yang bersangkutan. Suhu optimum merupakan batas keduanya (Dixon dan Webb, 1979 dalam Jaya, 2004), yaitu peningkatan suhu sebelum mencapai suhu optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri dan produksi bakteriosin. Pertumbuhan BAL mengalami peningkatan dengan meningkatnya waktu inkubasi.



Gambar 1. Diagram alir aktivasi isolat
Figure 1. Flowchart of isolate activation

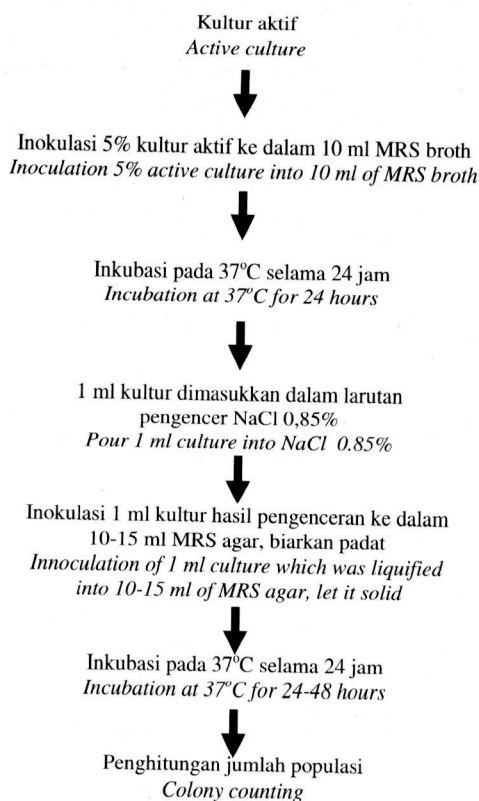
Peningkatan ini berlangsung secara logaritmik, meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan meningkat selanjutnya turun setelah mencapai fase stasioner (Boe, 1996). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri calon penghasil bakteriosin dari beberapa isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang mampu menekan pertumbuhan *Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium*, dan *Listeria monocytogenes*, serta melakukan optimasi proses produksi bakteriosin.

BAHANDAN METODE

A. Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari susu murni yaitu SCG 1223, 1221 dan 1211 diperoleh dari Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah MRS (De Man Rogosa and Sharpe) broth (Oxoid), MRS agar (Oxoid), yeast extract (Difco), Muller Hinton Agar (Oxoid) dan Nutrient agar serta Nutrient broth (Oxoid). Bahan kimia yang digunakan adalah NaCl pa, NaOH pa dan HCl pa 32% (MERCK).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah *incubator shaker* (orbital incubator SI 50, Stuart Scientific), *laminar flow*, *sentrifuge micro* (TOMMY), *spectrophotometer* (U-2010), *autoclaf* (Hirayama),



Gambar 2. Diagram alir penghitungan jumlah populasi kultur
Figure 2. Flowchart of colony counting of culture

micropipette, *vortex mixer*, neraca analitik (Precisa), pH meter, *holder milipore* dan *milipore* 0,22 μ m, alat-alat gelas untuk analisis.

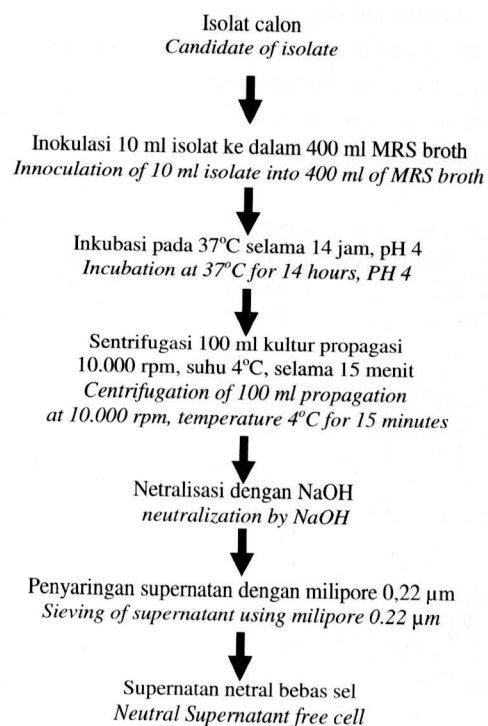
B. Metode

Penelitian dilakukan dengan dua tahap yaitu pemilihan isolat dan optimasi proses produksi bakteriosin.

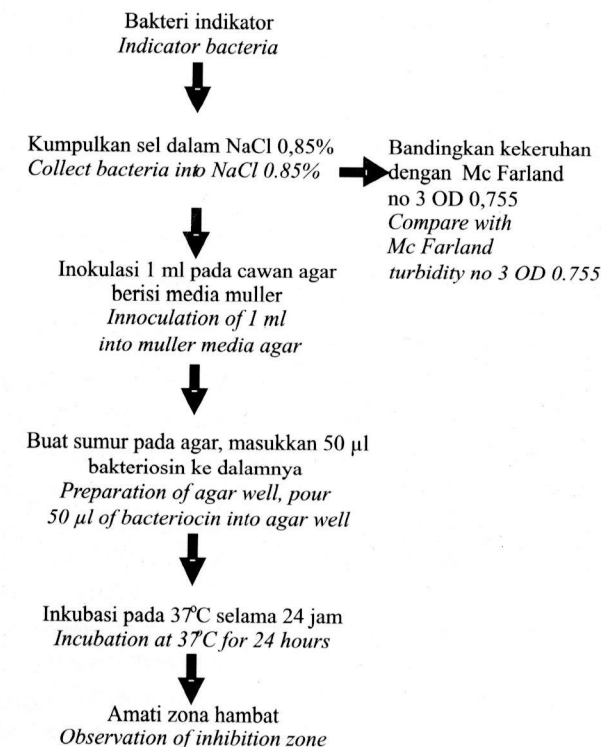
1. Pemilihan isolat penghasil bakteriosin

Kegiatan ini terdiri atas: (i) aktivasi isolat; (ii) penghitungan jumlah populasi isolat BAL calon; dan (iii) produksi bakteriosin dan uji aktivitasnya secara *in-vitro*. Isolat calon penghasil bakteriosin adalah golongan *Lactobacillus* sp. berbentuk biakan agar miring diremajakan dengan MRS broth yang ditambah ekstrak khamir beberapa kali sampai bakteri tumbuh baik. Proses ini juga dilakukan pada bakteri uji *E.coli*, *S.thypimurium*, dan *L.monocytogenes* dengan *nutrien broth* (Gambar 1). Isolat BAL calon produser bakteriosin hasil propagasi kemudian dipupuk pada media MRS agar, kemudian diinkubasi secara an-aerob pada suhu 37°C selama 24 jam dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh (Gambar 2).

Aktivitas cairan ekstraseluler (bakteriosin) yang diperoleh diuji menggunakan metode sumur agar (Delgado *et al.*, 2001) dengan bakteri uji merupakan bakteri patogen pada daging atau produk daging yaitu *E.coli*, *S.thypimurium* dan *L.monocytogenes*. Kultur hasil



Gambar 3. Diagram alir proses produksi bakteriosin
Figure 3. Flowchart of Production process of bacteriocine



Gambar 4. Diagram alir uji aktivitas bakteriosin secara *in vitro* metode difusi agar

Figure 4. Flowchart of determination of bacteriocin *in-vitro* activity used agar well diffusion method

peremajaan dipropagasi dan diinokulasi pada media MRS broth pada pH 4-6 dengan inokulum 5%-10% (v/v). Selanjutnya diinkubasi selama 4-14 jam pada suhu 27-40°C. Kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm, 4°C selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan dibagi menjadi dua, supernatan pertama sebagian disaring milipore 0,22µm dan sebagian lainnya disaring menggunakan kertas saring untuk menghasilkan

supernatan bebas sel, dan supernatan kedua sama dengan supernatan pertama namun pH-nya dinetralkan NaOH. Selanjutnya, supernatan bebas sel dan supernatan netral bebas sel diuji aktivitas hambatnya. Diagram alir proses produksi bakteriosin dan uji aktivitasnya disajikan pada Gambar 3 dan 4.

Aktivitas hambatan cairan ekstraseluler terhadap bakteri indikator diindikasikan dengan munculnya zona bening disekitar sumur. Unit aktivitas bakteriosin didefinisikan sebagai AU (Activity Unit), 1 AU merupakan luas daerah hambatan per satuan volum contoh bakteriosin yang diuji (mm²/ml). Aktivitas bakteriosin dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas bakteriosin (mm}^2\text{/ml)} = \frac{L_z - L_s}{V}$$

L_z : Luas zona bening (mm²).

L_s : Luas sumur (mm²).

V : Volume contoh (ml).

2. Optimasi proses produksi bakteriosin

Kegiatan ini terdiri atas: (i) pembuatan kurva pertumbuhan BAL calon penghasil bakteriosin; dan (ii) optimasi proses produksi bakteriosin. Tahap pertama untuk mengetahui kurva dan fase pertumbuhan isolat BAL calon penghasil bakteriosin terpilih. Dari kurva diperoleh data fase eksponensial yang berhubungan dengan sekresi substansi antimikroba. Pertumbuhan bakteri diikuti tiap jam terhadap nilai pH dan kerapatan optik (*optical density*/OD) pada media MRS *broth* menggunakan metode turbidimetrik dengan panjang gelombang 620 nm (Hadioetomo, 1990) (Gambar 5). Titik-titik kondisi pada setiap fase selama pertumbuhan BAL yaitu nilai pH, kerapatan optik, dan jumlah koloni BAL pada fase lag, logaritmik, eksponensial

Tabel 1. Pengaktifan isolat SCG 1223

Table 1. Activation isolate SCG 1223

Kultur Culture	Media Medium	Ekstrak khamir Yeast extract		Kondisi inkubasi Incubation condition	Ciri secara visual Visual performance
		dengan with	tanpa without		
Isolat 1223 Isolate SCG 1223	MRS MRS	-	V	Suhu 37°C, 7 hari Temperature 37°C, 7 days	Tidak tumbuh No growth
Isolat 1223 Isolate SCG 1223	MRS MRS	0,5%	-	Suhu 37°C, 48 jam Temperature 37°C, 48 hours	Sedikit keruh (sebagai Stock I) There was turbid (as Stock I)
Stock I SCG 1223 Stock I SCG 1223	MRS MRS	0,5%	-	Suhu 37°C, 48 jam Temperature 37°C, 48 hours	Lebih keruh dibanding Stock I (sebagai Stock II) More turbid than Stock I (as Stock II)
Stock II 1223 Stock II SCG 1223	MRS MRS	-	V	Suhu 37°C, 24 jam Temperature 37°C, 24 hours	Sama keruh dengan Stock II (sebagai Stock III) Same turbidity with Stock II (as Stock III)

Tabel 2. Pengaktifan isolat SCG 1221

Table 2. Activation isolate SCG 1221

Kultur Culture	Media Medium	Ekstrak khamir Yeast extract		Kondisi inkubasi Incubation condition	Ciri secara visual Visualization performance
		dengan with	tanpa without		
Isolat SCG 1221 Isolate SCG 1221	MRS MRS	-	V	Suhu 37°C, 48 jam Temperature 37°C, 48 hours	Sedikit keruh (Stock I) Turbid
Stock I SCG 1221 Stock I SCG 1221	MRS MRS	-	V	Suhu 37°C, 24 jam Temperature 37°C, 24 hours	Lebih keruh dibanding Stock I (sebagai Stock II) More turbid than Stock I (as Stock II)
Stock II SCG 1221 Stock II SCG 1221	MRS MRS	0,5%	-	Suhu 37°C, 24 jam Temperature 37°C, 24 hours	Lebih keruh dibanding Stock II (sebagai Stock III) More turbid than Stock II (as Stock III)

dan stasioner yang merupakan dasar dalam menentukan kondisi proses optimasi produksi bakteriosin dari BAL calon.

Pada tahap optimasi produksi bakteriosin digunakan metode permukaan respon (*Response Surface Methodology*), merupakan bentuk analisis terhadap respon yang dipengaruhi oleh beberapa faktor dan bertujuan untuk menentukan kondisi optimum respon (Montgomery, 2000 dalam Januarsyah, 2007)). Permukaan respon digambarkan dalam bentuk ruang dimensi yaitu suatu ruang yang sukar untuk dilukiskan (hanya dapat dibayangkan). Metode ini berguna untuk menentukan arah percobaan selanjutnya menuju titik optimum. Dari titik optimum/hampir optimum pada permukaan respon, maka dapat digunakan untuk menentukan persamaan di sekitar titik optimum (Sudjana, 1994 dalam Januarsyah, 2007). Tiga variabel penting *RSM* pada optimasi produksi bakteriosin adalah suhu, pH dan lama inkubasi untuk mengetahui tingkat optimum ketiga variabel tersebut. Disain percobaan mengacu pada Olivera *et al.* (2004). Variabel optimasi proses produksi bakteriosin ditentukan berdasarkan hasil pembuatan kurva pertumbuhan pada ketiga variabel.

Produksi bakteriosin dilakukan menggunakan media cair MRS broth (Ammor *et al.*, 2006; Vermeiren *et al.*, 2004; Budde *et al.*, 2003), dan pemanenan bakteriosin mengikuti metode Suarsana *et al.* (2003) dan Ammor *et al.* (2006). Produksi bakteriosin dilakukan pada skala laboratorium menggunakan erlenmeyer 1000ml dengan volume kerja 400ml.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pemilihan isolat penghasil bakteriosin

Isolat penghasil bakteriosin yang dipakai adalah hasil isolasi oleh Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Hasil penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa bakteriosin dari

Lactobacillus sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen/pembusuk *Eschericia coli*, *Salmonella* sp. dan *Listeria* sp (Ammor *et al.*, 2006). Isolat bakteri asam laktat calon penghasil bakteriosin adalah SCG 1223, SCG 1221 dan SCG 1211 hasil isolasi dari susu murni. Dari ketiga isolat BAL tersebut dipilih satu isolat yang potensial.

1. Aktivasi isolat

Isolat BAL SCG 1223 diaktifkan menggunakan media cair MRS broth. Hasil aktivasi Isolat SCG 1223 disajikan pada Tabel 1. Pengaktifan isolat SCG 1221 juga dilakukan menggunakan media yang sama dengan isolat SCG 1223. Hasil pengaktifan dapat dilihat pada Tabel 2.

Pola aktivasi dan propagasi isolat BAL SCG 1211 serupa dengan isolat SCG 1221. Dari hasil pengaktifan tampak bahwa isolat SCG 1223 mengalami sedikit kendala yaitu pada media dan kondisi yang sama dengan isolat 1221 dan 1211, sampai dengan inkubasi 7 hari isolat SCG 1223 tidak menunjukkan pertumbuhan. Hal ini disebabkan oleh karena kultur induk (*mother culture*) isolat SCG 1223 pada agar miring koloninya lebih sedikit dibandingkan isolat SCG 1221 dan SCG 1211.

Tabel 3. Jumlah koloni masing-masing isolat

Table 3. Number of colony each isolate

Kultur Culture	Jumlah koloni Number of colony (CFU/ml)	Rata-rata jumlah koloni Average of colony (CFU/ml)
SCG 1223 SCG 1223	4,60 X 10 ¹⁴ 4,93 X 10 ¹⁴	4,77 X 10 ¹⁴
SCG 1221 SCG 1221	5,89 X 10 ¹⁰ 6,24 X 10 ¹⁰	6,07 X 10 ¹⁰
SCG 1211 SCG 1211	5,05 X 10 ¹⁰ 4,57 X 10 ¹⁰	4,81 X 10 ¹⁰

2. Penghitungan jumlah populasi BAL calon

Pada tahap kegiatan penghitungan jumlah populasi atau koloni, dari ketiga isolat digunakan kultur *Stock III* yang selanjutnya dipropagasi dengan menggunakan media *MRS broth*. Hasil hitungan jumlah koloni disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan bahwa populasi isolat BAL SCG 1223 paling banyak dibandingkan populasi isolat lainnya yaitu $4,77 \times 10^{14}$ CFU/ml. Jumlah populasi ini merupakan indikator bahwa pada kondisi yang sama yaitu jenis media yaitu *MRS broth* tanpa pengkayaan ekstrak khamir, suhu inkubasi dan lama waktu inkubasi pada volume yang sama, isolat SCG 1223 mampu tumbuh lebih baik.

3. Produksi bakteriosin dan aktivitas hambatnya

Setelah cairan ekstraseluler masing-masing isolat disaring menggunakan milipore 0,22 μ m kemudian diuji daya hambatnya. Hasil uji daya hambat disajikan pada Tabel 4.

Berdasarkan data pada Tabel 4 tampak bahwa cairan ekstraseluler dari ketiga isolat memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen/indikator, dan aktivitas tampak bahwa penghambatan ekstraseluler SCG 1223 dan 1221 tertinggi terhadap *E.coli*, isolat SCG 1211 tertinggi terhadap *S.thypimurium*.

Dengan mempertimbangkan hasil aktivasi dan propagasi ketiga (menjadi *Stock III* masing-masing isolat), isolat BAL SCG 1223 memiliki jumlah koloni terbanyak dibandingkan isolat SCG 1221 dan SCG 1211, serta pembuatan *Stock III* isolat SCG 1223 tanpa harus penambahan ekstrak khamir (tanpa pengkayaan media), maka dipilih isolat SCG 1223 sebagai calon produser cairan penghambat/ekstraseluler bakteri patogen. dengan daya hambat terhadap *E.coli* 2767 mm²/ml, terhadap

S.thypimurium 2072 mm²/ml, dan terhadap *L.monocytogenes* 1648 mm²/ml disaring menggunakan milipore 0,22 μ m.

B. Optimasi proses produksi bakteriosin

1. Kurva pertumbuhan isolat terpilih

Disain percobaan optimasi produksi mengacu pada disain Olivera *et al.* (2004). Metode yang digunakan untuk optimasi produksi bakteriosin yaitu *Response Surface Methodology* (RSM) dengan tiga variabel yaitu suhu, pH dan lama inkubasi. Untuk penyusunan disain optimasi proses diperlukan data titik bawah dan titik atas pH, lama dan suhu inkubasi. Data pH dan lama inkubasi diperoleh dengan pembuatan kurva pertumbuhan. Suhu inkubasi ditentukan berdasarkan kondisi isolasi dari isolat terpilih tersebut.

Sel produser yang digunakan adalah isolat BAL SCG 1223. Dari pengamatan laju pertumbuhan diketahui populasi mikroba saat fase logaritmik. Pola pertumbuhan BAL mengikuti suatu kurva sigmoid (S) baik diukur dari tingkat kekeruhan media (OD) maupun melalui perhitungan populasi *Total Plate Count* (Gambar 5).

Pengamatan laju pertumbuhan mikroba diikuti dengan pengukuran terhadap nilai pH. Dengan meningkatnya jumlah populasi mikroba maka aktivitas metabolismenya akan meningkat. Hasil metabolisme pada saat *lag phase* sebagian besar berupa asam laktat yang dimanifestasikan oleh adanya penurunan nilai pH. Produksi asam ini suatu saat menjadi penghambat dalam pertumbuhan mikroba yang bersangkutan (efek *negative feed back*) (Koroleva, 1991), yaitu ketika telah mencapai fase stasioner bakteri tidak tumbuh lagi bahkan banyak yang lisis atau mati sehingga kurva TPC tampak menurun (Gambar 5).

Tabel 4 . Hasil pengukuran zona bening cairan ekstraseluler isolat SCG 1223, SCG 1221 dan SCG 1211

Table 4. Result of clear zone inhibition of extracellular isolate SCG 1223, SCG 1221 and SCG 1211

Isolat BAL LAB Isolate	Indikator Indicator	diameter sumur Well diameter (mm)	diameter zona bening clear zone diameter (mm)	luas sumur well area (mm ²)	luas zona bening Clear zone area (mm ²)	aktivitas hambat Inhibition activity (mm ² /ml)
SCG 1223	<i>L.monocytogenes</i>	8	13	50,24	132,665	1648,500
	<i>S.thypimurium</i>	8	14	50,24	153,860	2072,400
	<i>E.coli</i>	8	15,5	50,24	188,596	2767,125
SCG 1221	<i>L.monocytogenes</i>	8	12,5	50,24	122,656	1448,325
	<i>Salmonella sp</i>	8	14	50,24	153,860	2072,400
	<i>E.coli</i>	8	16	50,24	200,960	3014,400
SCG 1211	<i>L.monocytogenes</i>	8	10	50,24	78,50	565,200
	<i>S.thypimurium</i>	8	14	50,24	153,86	2072,400
	<i>E.coli</i>	8	12	50,24	113,04	1256,000

Metabolit lain yang diproduksi selama BAL tumbuh adalah bakteriosin yang merupakan metabolit sekunder (ekstraseluler). Meningkatnya jumlah *biomassa* menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan akan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner (Boe, 1996). Sintesis bakteriosin oleh bakteri asam laktat terjadi selama pertumbuhan fase eksponensial, biasanya mengikuti pola sintesis protein (Schnell *et al.*, 1998). Pertumbuhan BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor. Dengan meningkatnya waktu inkubasi maka pertumbuhan BAL mengalami peningkatan secara logaritmik. Jenis sumber karbon maupun sumber nitrogen yang digunakan dalam medium dapat berpengaruh terhadap laju pertumbuhan sel BAL, selanjutnya akan mempengaruhi metabolisme produksi bakteriosin. Selain itu tingkat salinitas medium produksi seperti kandungan garam dalam media juga turut mempengaruhi metabolisme produksi bakteriosin.

Selama pertumbuhannya, suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya proses ini disebut waktu generasi (Fardiaz, 1992). Dengan mengetahui waktu generasi setiap mikroba maka dapat diprediksi populasi setiap mikroba dalam jangka waktu yang sama serta keaktifannya dalam proses metabolisme.

Berdasarkan Gambar 5, pada titik fase logaritmik (ditunjukkan oleh garis logaritmik sebelum memasuki fase stasioner) nilai pH terendah pada jam ke-6. Secara teoritis kultur SCG 1223 menghasilkan asam laktat dalam jumlah yang relatif tinggi karena ditumbuhkan dalam media *nutrient broth* yang mengandung sumber karbon yang cukup untuk dimanfaatkan secara optimal dalam aktivitas metabolismenya. Pada saat jumlah populasi mikroba mulai stasioner maka produksi asam laktat juga stasioner atau

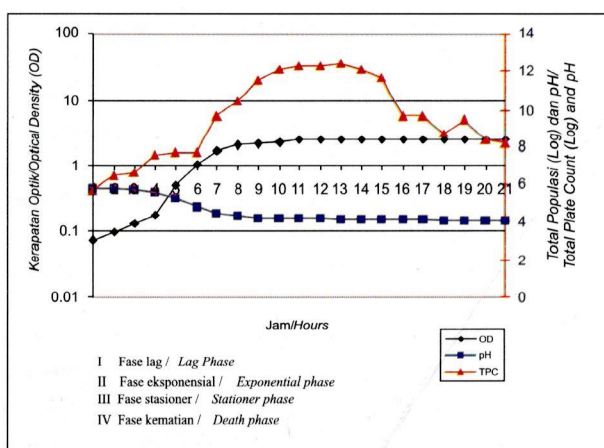
bertambah dengan peningkatan yang relatif sedikit. Hal ini kemungkinan karena substrat dalam media pada fase ini sudah mengalami penurunan. Penggunaan substrat oleh mikroba tidak lagi untuk pertumbuhan dan produksi asam laktat, tetapi lebih banyak untuk metabolisme sekunder dalam menghasilkan metabolit lain di antaranya bakteriosin.

2. Optimasi proses produksi bakteriosin

Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat penghasil bakteriosin, maka untuk tujuan optimasi proses ditentukan sebagai berikut: (a) titik pH bawah: 3, titik pH atas: 6; (b) titik lama inkubasi bawah: 4 jam, titik lama inkubasi atas: 35 jam; dan (c) titik suhu bawah: 22,5°C, titik suhu atas: 44°C. Rancangan produksi bakteriosin disajikan pada Tabel 5, dengan kode *run* merupakan kombinasi antara variabel pH, suhu dan lama inkubasi. Pada proses produksi bakteriosin dengan persentase inokulum 10% telah dihasilkan aktivitas supernatan netral bebas sel yang menggambarkan adanya aktivitas hambat bakteriosin terhadap bakteri *E.coli*, *S.thypimurium* dan *L.monocytogenes*.

a. Aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E. coli*

Berdasarkan hasil *RSM* (Gambar 7), faktor yang berpengaruh nyata terhadap aktivitas hambat bakteriosin adalah pengaruh linier waktu dan pengaruh kuadrat suhu. Pengaruh linier pH dan suhu serta pengaruh kuadrat pH dan waktu, tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas hambat bakteriosin pada *E. coli*. Interaksi antar faktor tidak berpengaruh nyata pada



Gambar 5. Kurva pertumbuhan bakteri asam laktat SCG 1223
Figure 5. Curve of growth of lactic acid bacteria SCG 1223

Tabel 5. Disain optimasi proses produksi bakteriosin

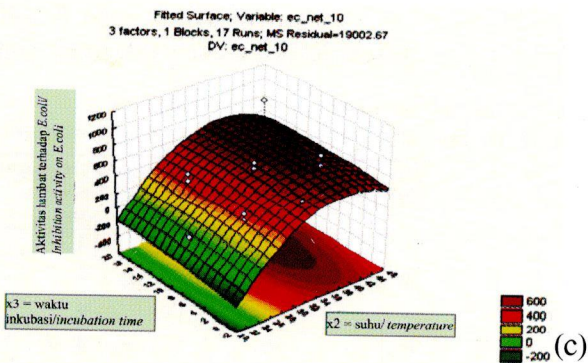
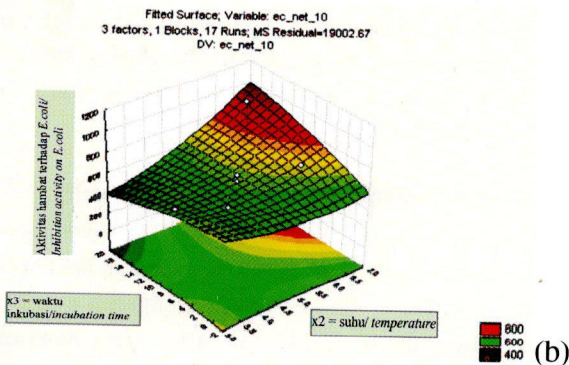
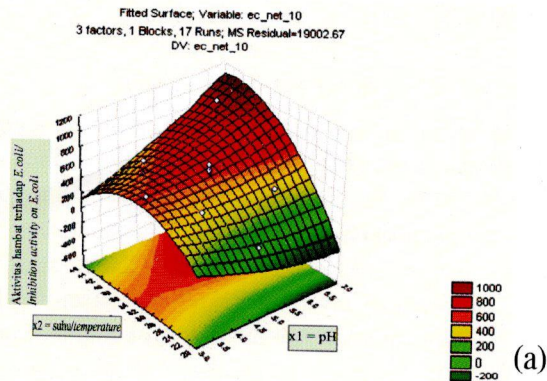
Table 5. Optimize design of production process of bacteriocin

Kode Run Run Code	pH pH	Suhu (°C) Temperature (°C)	Lama inkubasi (jam) Incubation time (hour)
1	4	27	4
2	6	27	4
3	4	40	4
4	6	40	4
5	4	27	14
6	6	27	14
7	4	40	14
8	6	40	14
9	3,32	33,5	9
10	6,68	33,5	9
11	5	22,5	9
12	5	44,4	9
13	5	33,5	35,4
14	5	33,5	17,2
15	5	33,5	9
16	5	33,5	9
17	5	33,5	9

aktivitas hambat terhadap *E. coli*. Model persamaan regresi aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E. coli* sebagai berikut:

$$y = 64,05x_1 + 161,34x_2 + 20,51x_3 + 19,70x_1^2 - 107,98x_2^2 - 9,34x_3^2 + 92,73x_1x_2 + 39,78x_1x_3 - 2,29x_2x_3$$

dengan y, merupakan aktivitas hambat bakteriosin



Gambar 7. Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E.coli*.

Figure 7. Surface response of inhibition activity on *E.coli*

Keterangan/Remarks:

- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E.coli* (y); faktor pH (x1) dan suhu (x2)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *E.coli* (y); pH factor (x1) and temperature factor (x2)
- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E.coli* (y); faktor pH (x1) dan waktu inkubasi (x3)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *E.coli* (y); pH factor (x1) and incubation time factor (x3)
- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E.coli* (y); faktor suhu (x2) dan waktu inkubasi (x3)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *E.coli* (y); temperature factor (x2) and incubation time factor (x3)

(response); x1=pH awal media; x2=suhu; dan x3=waktu inkubasi. Berdasarkan Gambar 7, permukaan respon pada aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E.coli* menghasilkan *saddlepoint*, yang menunjukkan bahwa hasil optimum tidak dapat ditentukan dengan menggunakan model persamaan yang diperoleh.

b. Aktivitas hambat ekstrak bakteriosin terhadap *L.monocytogenes*

Pengaruh dari faktor yang digunakan terhadap aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L.monocytogenes* adalah bahwa faktor yang berpengaruh nyata terhadap aktivitas hambat bakteriosin merupakan pengaruh linier suhu dan waktu serta pengaruh kuadrat pH. Pengaruh interaksi pH dan suhu serta pH dengan waktu, juga berpengaruh nyata terhadap aktivitas hambat bakteriosin. Pengaruh linier pH dan pengaruh kuadrat suhu dan waktu, tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas hambat bakteriosin pada *L.monocytogenes*. Interaksi antara suhu dan waktu juga tidak berpengaruh nyata pada aktivitas hambat terhadap *L.monocytogenes* (Gambar 8). Model persamaan regresi aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L.monocytogenes* sebagai berikut:

$$Y = 9.92x_1 + 151.96x_2 - 64.60x_3 + 59.79x_1^2 + 16.68x_2^2 + 21.32x_3^2 + 98.20x_1x_2 + 98.83x_1x_3 + 13.42x_2x_3$$

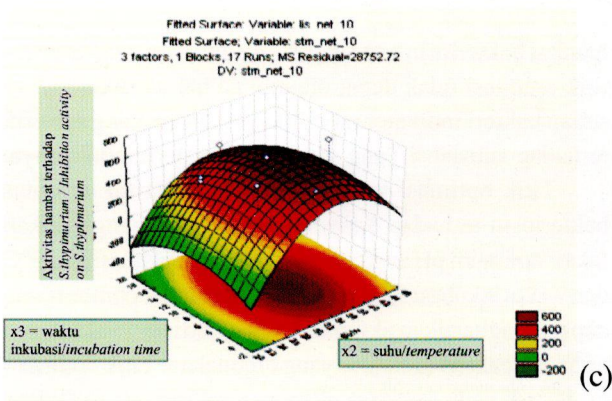
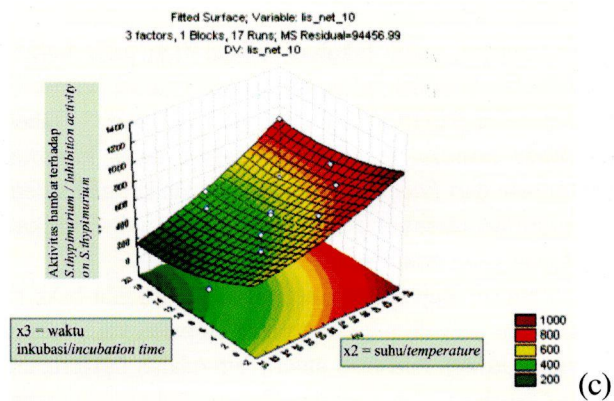
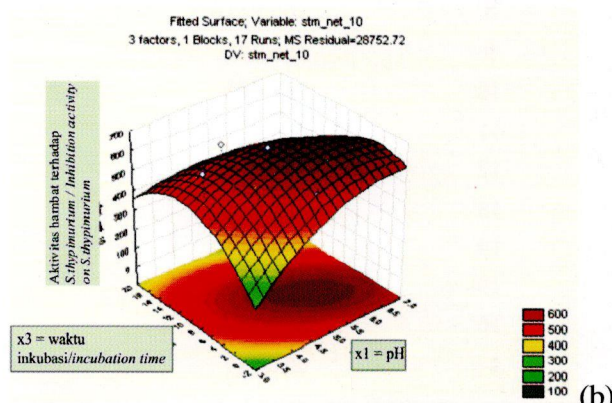
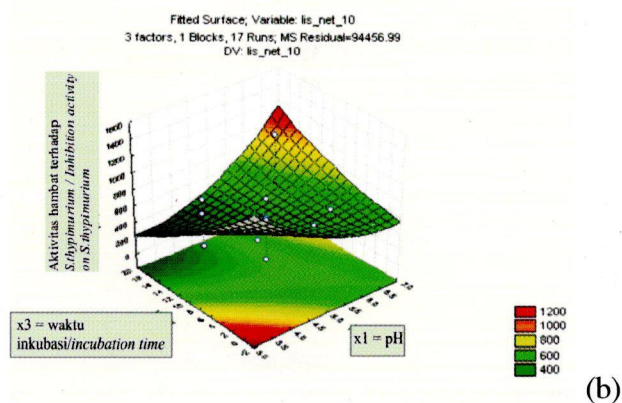
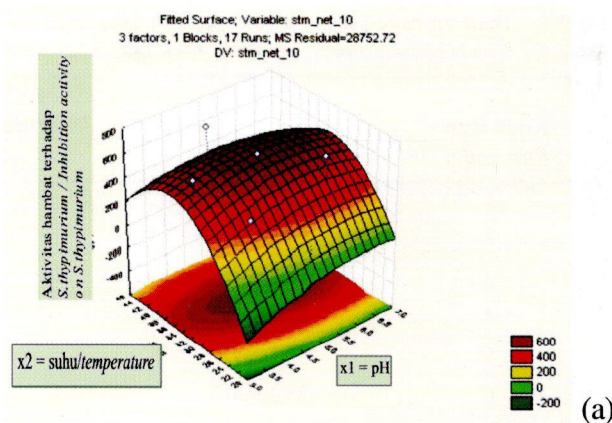
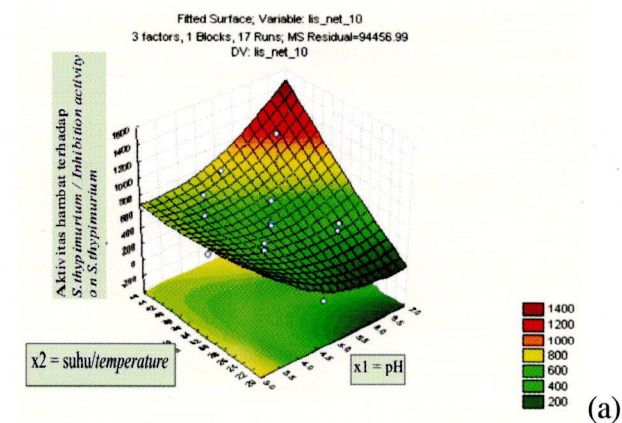
dengan y, merupakan aktivitas hambat bakteriosin (response); x1=pH awal media; x2=suhu; dan x3=waktu inkubasi. Berdasarkan Gambar 8, permukaan respon pada aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L.monocytogenes* menghasilkan *saddlepoint*, yang menunjukkan bahwa hasil optimum tidak dapat ditentukan dengan menggunakan model persamaan yang diperoleh.

c. Aktivitas hambat ekstrak bakteriosin terhadap *S.thypimurium*

Hasil RSM (Gambar 9) menunjukkan bahwa faktor yang mempengaruhi aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium* adalah pengaruh kuadrat suhu. Pengaruh linier pH, suhu dan waktu, sedangkan pengaruh kuadrat pH dan waktu tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium*. Interaksi antar faktor juga tidak berpengaruh nyata pada aktivitas hambat terhadap *S.thypimurium*. Model persamaan regresi aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium* sebagai berikut:

$$y = 12,79x_1 + 45,72x_2 - 37,88x_3 - 29,19x_1^2 - 130,98x_2^2 - 44,92x_3^2 - 26,16x_1x_2 - 36,48x_1x_3 - 4,34x_2x_3$$

dengan y, merupakan aktivitas hambat bakteriosin (response); x1=pH awal media; x2=suhu; dan x3=waktu inkubasi. Berdasarkan Gambar 9 aktivitas hambat maksimum bakteriosin terhadap *Salmonella thypimurium* didapatkan pada pH awal media 5,57, suhu inkubasi 34,33°C dan waktu inkubasi 5,69 jam. Pada optimasi aktivitas



Gambar 8. Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L. monocytogenes*

Figure 8. Surface response of inhibition activity on *L.monocytogenes*

Keterangan/Remarks:

- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L.monocytogenes* (y); faktor pH (x1) dan suhu (x2)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *L.monocytogenes* (y); pH factor (x1) and temperature factor (x2)
- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L.monocytogenes* (y); faktor pH (x1) dan waktu inkubasi (x3)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *L.monocytogenes* (y); pH factor (x1) and incubation time factor (x3)
- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *L.monocytogenes* (y); faktor suhu (x2) dan waktu inkubasi (x3)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *L.monocytogenes* (y); temperature factor (x2) and incubation time factor (x3)

Gambar 9. Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S. thypimurium*.

Figure 9. Surface response of inhibition activity on *S. thypimurium*

Keterangan/Remarks:

- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium* (y); faktor pH (x1) dan suhu (x2)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *S.thypimurium* (y); pH factor (x1) and temperature factor (x2)
- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium* (y); faktor pH (x1) dan waktu inkubasi (x3)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *S.thypimurium* (y); pH factor (x1) and incubation time factor (x3)
- Permukaan respon aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium* (y); faktor suhu (x2) dan waktu inkubasi (x3)/ Response surface of inhibition activity of bacteriocin on *S.thypimurium* (y); temperature factor (x2) and incubation time factor (x3)

Tabel 6. Hasil uji daya hambat bakteriosin dari SCG 1223 terhadap *E.coli*, *S.thypimurium* dan *L.monocytogenes*
 Table 6. Result of bacteriocin inhibition from SCG 1223 on *E.coli*, *S.thypimurium* and *L.monocytogenes*

Kode Run Run code	Aktivitas daya hambat bakteriosin Inhibition activity of bacteriocin (mm ² /ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. thypimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
1	311,488	392,500	643,072
2	474,768	392,500	729,108
3	643,072	392,500	816,400
4	474,768	311,488	558,292
5	392,500	643,072	474,768
6	392,500	433,477	558,292
7	772,597	474,768	643,072
8	1085,812	311,488	1178,128
9	558,292	643,072	495,531
10	638,803	524,732	512,198
11	0	0	0
12	474,768	592,053	763,874
13	524,731	558,292	790,080
14	508,027	520,551	0
15	638,803	638,803	499,693
16	579,369	638,803	528,915
17	651,619	638,803	499,693

Keterangan/remarks: Kode run adalah kode kombinasi dari faktor pH, suhu dan waktu inkubasi/
 Run code is the code of combination between pH, temperature and incubation time

hambat bakteriosin terhadap *E.coli* dan *L.monocytogenes* titik optimasi tidak dapat ditentukan hal ini dikarenakan setiap bakteri indikator memiliki ketahanan yang spesifik terhadap substansi yang menghambat pertumbuhannya.

Titik optimasi yang didapatkan pada uji aktivitas bakteriosin terhadap *S.thypimurium* yang menghasilkan faktor optimum pH awal media 5,57, suhu inkubasi 34,33°C dan waktu inkubasi 5,69 jam merupakan titik optimum yang dapat menghasilkan aktivitas hambat tertinggi bakteriosin terhadap bakteri indikator yang digunakan. Titik optimum ini terjadi pada saat fase eksponensial dimana pada fase ini dilakukan sintesis metabolit primer oleh sel bakteri produsen, bakteriosin merupakan produk metabolit sekunder yang sintesisnya mengikuti pola sintesis metabolit primer. Berdasarkan hasil dari RSM yang menunjukkan bahwa yang memiliki titik optimum hanya bakteriosin terhadap *S.thypimurium*, maka perlu dicari nilai daya hambat yang paling representatif mewakili hambatan optimum terhadap ketiga bakteri indikator (Tabel 6).

Berdasarkan data pada Tabel 6, tampak bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh sel produser; dalam hal ini *Lactobacillus sp.* yang diisolasi dari susu segar; yang memiliki daya hambat paling representatif untuk menghambat pertumbuhan kontaminan *E.coli*, *S.thypimurium* dan *L.monocytogenes* adalah bakteriosin yang diproduksi dengan kondisi proses pada pH 5, suhu

33,5°C, dengan waktu inkubasi selama 9 jam pada skala 1 liter (skala laboratorium) menggunakan volume kerja 400 ml. Proses ini dilakukan pada kode run 15, 16 dan 17 (Tabel 6). Pada kondisi tersebut, rata-rata daya hambat bakteriosin dari *Lactobacillus sp.* terhadap ketiga bakteri kontaminan tersebut adalah optimum (pada tingkat hambatan yang relatif setingkat/sama besar).

Menurut Ray (1996), beberapa bakteriosin bakteri asam laktat yang digunakan sebagai biopreservatif dalam berbagai produk makanan antara lain adalah bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus sp.* Bakteriosin yang dihasilkannya memiliki spektrum yang luas sebagai pengawet makanan dan mampu melawan bakteri gram negatif patogen. *Lactobacillus sp.* dapat ditemukan di dalam daging, produk daging, susu, saluran pencernaan, dan makanan yang difermentasi secara terkontrol.

KESIMPULAN

1. Isolat yang paling potensial sebagai calon produser bakteriosin diantara bakteri asam laktat SCG 1223, 1221 dan 1211 adalah isolat BAL SCG 1223 dengan daya hambat terhadap *E.coli* 2767 mm²/ml, terhadap *S.thypimurium* 2072 mm²/ml, dan terhadap *L.monocytogenes* 1648 mm²/ml disaring menggunakan milipore 0,22µm.

2. Kondisi optimum produksi bakteriosin yang memiliki daya hambat representatif adalah pH 5, suhu 33,5 °C dan lama inkubasi 9 jam, dengan nilai daya hambat bakteriosin terhadap *S.thypimurium* sebesar 638,803 mm²/ml, *E.coli* sebesar 623,264 mm²/ml dan *L.monocytogenes* sebesar 509,434 mm²/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammor S., G. Tauveron, E. Dufour, and I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility : 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17: 454–461.
- Boe. 1996. Evaluation of optimum production for bacteriocin from *Lactobacillus* sp JB 42 Isolation from Kimichi. *J. Microbiol Biotech* 6: 63–67.
- Budde B.B., T. Hornbæk, T. Jacobsen, V. Barkholt and A. G. Koch. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* 83:171– 184.
- Cleveland, J., J.T. Montville, I.F.Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71:1–20.
- Deegan L.H., P.D. Cotter, C. Hill and P. Ross. 2006. Bacteriocin: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. www.elsevier.com/locate/foodj.
- Delgado, A., D. Brito, P. Fevereiro, C. Peres and J.F. Marques. 2001. Antimicrobial activity of *L.plantarum* isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *EDP Sciences* 81:203215.
- Deumier, F. and A. Collignan. 2003. The effects of sodium lactate and starter cultures on pH, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. levels in pure chicken dry fermented sausage. *Meat Science* 65:1165–1174.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. Jilid I. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Hadioetomo, R.S. 1990. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Gramedia, Jakarta.
- Hugas. M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, Vol. 49, No. Suppl. I, S139–S150.
- Ho, C.P., N.Y. Huang and B.J. Chen. 2004. A Survey of microbial contamination of food contact surfaces at broiler slaughter plants in Taiwan. *Journal of Food Protection*. 67:12:2809–2811.
- Januarsyah, T. 2007. Kajian Aktivitas Hambat Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Galur SCG 1223. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian-IPB, Bogor.
- Jaya, F.P. 2004. Pengaruh pH dan Suhu pada Produksi Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Galur M6-15. Skripsi. Program Studi Kimia, Departemen Kimia. FMIPA, IPB, Bogor.
- Koroleva, N. S. 1991. Products Prepared with Lactic Acid Bacteria and Yeasts. In *Therapeutics Properties of Fermented Milks*. R. K. Robinson (ed.). Elsevier Applied Science, London and New York.
- Kim CHGE Ji dan C Ahn. 2000. Purification and molekuler characterization of a bacteriocin from *Pediococcus* sp KCA 1202-10 isolated from fermented flatfish. *Food Sci Biotechnology* 9: 270–276.
- Mataragas, M., E.H. Drosinos, and J. Metaxopoulos. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiology* 20: 259–265.
- Olivera, F.C., G.R. Caron and A. Brandelli. 2004. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 21:53–58.
- Okolocha, E.C., and L. Ellerbroek. 2005. The influence of acid and alkaline treatments on pathogens and the shelf life of poultry meat. *Food Control* 16: 217–225.
- Ray, B. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, Tokyo. P. 8–29.
- Schnell N., K.D. Entian, U. Schneider, F. Gots, H. Zahner, R. Kellner and G. Jung. 1998. Prepeptida sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-ring. *Nature London*. 333:276–278.
- Shimoni, E. and T.P. Labuza. 2000. Modeling pathogen growth in meat products: Future challenges. *Trends in Food Sci. and Tech.* 11:394–402.
- Sullivan, L., R.P. Ross and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- Suarsana, I.N., I. H. Utama, dan N.G.A.A. Suartini. 2001. Aktivitas in vitro senyawa antimikroba dari *Streptococcus lactis*. *Jurnal Veteriner*. 2(1): 25–31.
- Tahara, T., M. Oshimura, C. Umezawa and K. Kanatani. 1996. Isolation partial characterization and mode of action acidocin J1132, a two-compound bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:892–897.
- Veclerc, V., B. Dufour, B. Lombard, F. Gauchard, B. Garin-Bastuji, G. Salvat, A. Brisabois, M. Poumeyrol, M-L. De Buyser, N. Gnanou-Besse and C. Lahellec. 2002. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science* 76: 195–202.
- Vermeiren, L., F. Devlieghere, I. Vandekinderen, and J. Debevere. 2004. The interaction of non-bacteriogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactacin S producing *Lactobacillus sakei* 148 toward *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiology* 23: 511–518.
- Yonathan. 2000. INDONESIA-VIEWS: Supaya swasembada daging berhasil. *Majalah Infovet* April 2000.