

PRODUKSI SENYAWA BAKTERIOSIN SECARA FERMENTASI MENGUNAKAN ISOLAT BAL *Enterococcus faecium* DU55 DARI DANGKE

Abd. Rahman Razak^{a*}, Abd. Rauf Patong^b, Tjodi Harlim^b, M. Natsir Djide^c, Haslia^c, Mahdalia^b

^aJurusan Kimia FMIPA Universitas Tadulako Palu 94118

^bJurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin Makassar 90245

^cFakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar 90245

Abstrak. *Dangke* merupakan salah satu makanan tradisional asal Kabupaten Enrekang Propinsi Sulawesi Selatan yang terbuat dari susu kerbau dan diolah secara enzimatis menggunakan papain dari getah pepaya. Penelitian terhadap produk lokal ini sebagai sumber bakteri asam laktat (BAL) telah dilakukan. Sebanyak 30 isolat BAL berhasil diisolasi dan 3 diantaranya menunjukkan potensi untuk dapat menghasilkan senyawa antimikroba. *Enterococcus faecium* DU55 merupakan salah satu isolat BAL yang dapat digunakan untuk memproduksi senyawa antimikroba bakteriosin secara fermentasi. Kondisi optimum fermentasi ditetapkan dengan menentukan aktivitas antimikroba tertinggi yang ditimbulkan oleh filtrat hasil fermentasi. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan mengukur diameter zona inhibisi terhadap pertumbuhan koloni bakteri uji patogen *Salmonella typhimurium* FNCC 0050. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi secara maksimal senyawa bakteriosin oleh isolat BAL *E. faecium* DU55 dapat dilakukan pada kondisi fermentasi yang optimum yaitu pada suhu 30 °C selama 42 jam menggunakan medium produksi M1 dengan komposisi sama dengan medium MRS (Man, Rogosa and Sharpe).

Kata kunci: *dangke*, isolat BAL, bakteriosin, aktivitas antimikroba

Abstract. *Dangke* is one of traditional food from Enrekang Province Sulawesi Selatan which is made from buffalo milk and enzymatically processed using papain from papaya's gland secretion. Research on this local product as source of lactic acid bacteria (LAB) has been done. Counted 30 LAB was successfully isolated and 3 of them were potentially to be able to yield antimicrobial compound. *Enterococcus faecium* DU55 is one of LAB isolate available to be applied for producing bacteriocin compound through fermentation. Optimum condition of fermentation was specified by determining the highest antimicrobial activity generated by filtrate of fermentation result. Antimicrobial activity examination was carried out through diffusion agar method by measuring inhibition zone growth of pathogen bacterium *Salmonella typhimurium* FNCC 0050. Research results indicate that maximum bacteriocin compound production by BAL isolate *E. faecium* DU55 was obtained at condition of optimum fermentation at 30 °C during 42 hour using M1 medium with the same composition to medium MRS (Man Rogosa and Sharpe).

Keyword: *dangke*, LAB isolate, bacteriocin, antimicrobial activity

*Alamat korespondensi: arrazak@telkom.net

Pendahuluan

Bakteri asam laktat (BAL) dikategorikan sebagai *foodgrade microorganism* karena bersifat non-patogen dan aman bagi manusia. Peranannya pada bidang pangan sudah sangat luas terutama pada *processing* makanan seperti fermentasi susu, daging dan sayuran. Salah satu manfaat BAL yang paling penting adalah menghambat pertumbuhan bakteri perusak makanan atau patogenik asal makanan, seperti *Staphylococcus aureus* dan *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus*, dan lain-lain. Aktivitas antimikroba disebabkan oleh karena BAL dapat menghasilkan senyawa antimikroba, termasuk asam-asam organik, diasetil dan hidrogen peroksida. Beberapa diantaranya telah diketahui dapat menghasilkan bakteriosin, yaitu peptida atau protein bakterisida yang aktif secara biologis.¹⁻⁴

BAL banyak diisolasi dari bahan pangan seperti *dadih* (produk susu fermentasi tradisional asal Sumatera Barat)⁵, *urutan* (sosis fermentasi dari Bali)⁶, maupun di luar negeri seperti *miso-paste* (Jepang)⁷, *gari* (makanan tradisional dari Afrika)⁸, *boza* (masakan gandum tradisional dari Bulgaria)⁹ dan *Turkish dairy products*.¹⁰ *Dangke* merupakan salah satu makanan tradisional dari Sulawesi Selatan yang dapat digunakan sebagai sumber strain BAL. Produk makanan asal Enrekang ini terbuat dari susu kerbau yang diolah secara enzimatis menggunakan papain dari getah pepaya.^{11,12} Isolasi BAL dari produk makanan lokal ini telah dilakukan dan sebanyak 3 dari 30 isolat yang diperoleh menunjukkan potensi untuk dapat menghasilkan senyawa antimikroba yang masing-masing diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* DU15, *Enterococcus faecium*

DU55, dan *Leuconostoc mesentroides* DU02.^{13,14}

Enterococcus faecium DU55 merupakan salah satu isolat BAL yang dapat digunakan untuk memproduksi senyawa antimikroba bakteriosin secara fermentasi.¹⁴ Produksi senyawa bakteriosin secara maksimal oleh isolat BAL *E. faecium* DU55 dapat dilakukan pada kondisi yang optimum meliputi suhu, waktu dan medium fermentasi. Kondisi optimum fermentasi ditetapkan dengan menentukan aktivitas antimikroba tertinggi yang ditimbulkan oleh filtrat hasil fermentasi. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan mengukur diameter zona inhibisi terhadap pertumbuhan koloni bakteri uji patogen.^{15,16,17}

Metode Penelitian

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat sentrifus, cawan petri, gelas piala, gelas ukur, inkubator, jarum ose, kertas saring, labu Erlenmeyer, *laminar air flow* (LAF), lampu spiritus, lemari pendingin, mikropipet, otoklaf, oven, pencadangan *paper disk*, *shaker*, tangas air, timbangan analitik, turbidimeter (*colorimeter*), *water bath*, dan beberapa alat gelas lainnya.

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini ialah bakteri asam laktat (BAL) *Enterococcus faecium* DU55 yang diisolasi dari *dangke*, dan bakteri uji patogen *Salmonella typhimurium* FNCC 0050.

Bahan lain yang digunakan ialah aquades, buffer sitrat pH 5,0, enzim katalase, indikator metil merah, kalsium karbonat, larutan fisiologis, larutan H₂O₂, medium MRS (Man, Rogosa and

Sharpe) agar dan broth, medium MHA (Muller Hinton Agar), dan beberapa bahan lain komponen medium produksi.

Pelaksanaan Penelitian

Penyiapan inokulum

Produksi bakteriosin menggunakan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 dari *dangke* dilakukan secara fermentasi seperti yang diuraikan oleh Yamamoto *et al* (2003). Isolat BAL diinokulasikan ke dalam medium MRS broth lalu diinkubasikan pada suhu 30 °C selama 24 jam sambil dilakukan *shaking* dengan kecepatan 120 spm (*strokes per minute*). Hasil inkubasi ini digunakan sebagai inokulum untuk pelaksanaan penelitian selanjutnya dalam produksi senyawa bakteriosin. Pengujian aktivitas antimikroba bakteriosin hasil fermentasi dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan bakteri uji patogen seperti yang dilakukan oleh Yamamoto *et al* (2003) .

Penentuan suhu optimum fermentasi

Inokulum sebanyak 5% (v/v) diinokulasikan ke dalam 3 labu fermentasi yang masing-masing berisi 200 ml medium broth (komposisi sama dengan medium MRS) lalu diinkubasi berturut-turut pada suhu 30, 40, dan 50 °C selama 2 hari. Pengamatan adanya pertumbuhan sel dilakukan dengan melihat terjadinya kekeruhan pada medium fermentasi. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel dan filtrat bakteriosin dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm (*rotation per minute*) selama 30 menit. Supernatannya dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit lalu dinetralkan pHnya kemudian dilakukan pengujian aktivitas antimikroba.

Penentuan waktu fermentasi optimum

Inokulum sebanyak 5% (v/v) diinokulasikan ke dalam labu fermentasi yang berisi 500 ml medium broth (komposisi sama dengan medium MRS) yang telah ditambahkan 0,5% CaCO₃ lalu diinkubasikan pada suhu tertentu (suhu fermentasi optimum) selama 2 hari. Pengambilan produk fermentasi dilakukan setiap 2 jam mulai pada jam ke-0 hingga lebih dari 48 jam. Jumlah bakteri (sel/ml) dihitung dengan metode turbidimetri menggunakan standar McFarland. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel dan filtrat bakteriosin dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit. Supernatannya dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit lalu dinetralkan pHnya kemudian dilakukan pengujian aktivitas antimikroba.

Pengaruh komposisi medium fermentasi

Perlakuan terhadap penggunaan medium fermentasi dilakukan dengan membuat variasi komponen medium broth seperti tampak pada Tabel 1. Inokulum sebanyak 5% (v/v) diinokulasikan ke dalam labu fermentasi yang berisi medium broth 200 ml lalu masing-masing diinkubasikan pada suhu dan selama waktu tertentu (suhu dan waktu fermentasi optimum). Pengamatan adanya pertumbuhan sel dilakukan dengan melihat terjadinya kekeruhan pada medium fermentasi. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel dan filtrat bakteriosin dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit. Supernatannya dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit lalu dinetralkan pHnya kemudian dilakukan pengujian aktivitas antimikroba.

Tabel 1. Perlakuan komposisi medium fermentasi dalam produksi bakteriosin oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55

Komponen	Jumlah (%)					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Pepton	1,0	1,0	-	-	-	1,0
Tripton	-	-	1,0	2,0	0,5	-
Ekstrak beef	0,8	0,8	0,8	-	-	0,8
Ekstrak yeast	0,4	0,4	0,4	2,0	0,5	0,4
Glukosa	2,0	-	2,0	2,0	0,5	2,0
Sukrosa	-	2,0	-	-	-	-
Tween 80	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Kalium fosfat	0,2	0,2	0,2	-	-	-
Natrium asetat	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Ammonium sitrat	0,2	0,2	0,2	-	-	-
Magnesium sulfat	0,02	0,02	0,02	0,01	0,005	0,02
Mangan sulfat	0,005	0,005	0,005	0,01	0,005	0,005

Hasil dan Pembahasan

Penentuan suhu optimum fermentasi

Suhu optimum fermentasi ditentukan dengan melakukan inkubasi pada suhu 30, 40, dan 50 °C. Pengamatan dilakukan dengan melihat pertumbuhan sel yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan pada medium dan uji aktivitas antimikroba filtrat bakteriosin hasil fermentasi menggunakan bakteri uji patogen *Salmonella typhimurium*. Hasil pengamatan seperti yang disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pertumbuhan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 pada perlakuan suhu inkubasi 50 °C kurang pesat bila dibandingkan dengan fermentasi pada suhu 30 dan 40 °C. Hal ini berkaitan

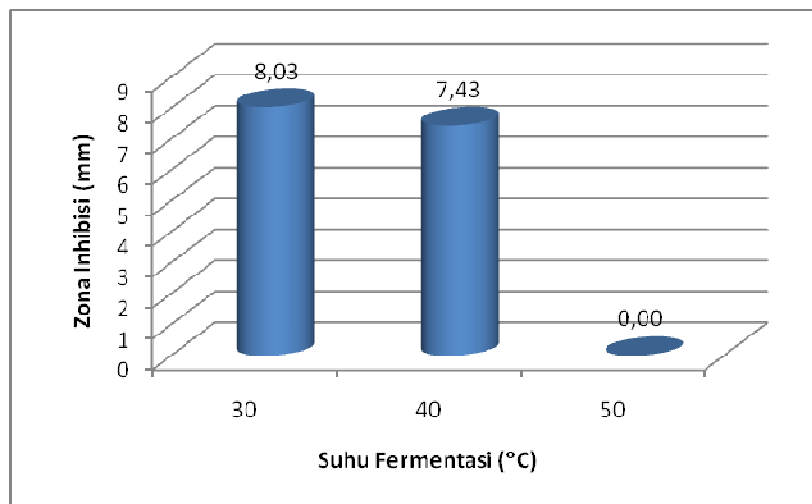
dengan daya inhibisi yang ditimbulkan oleh filtrat hasil fermentasi, dimana pada perlakuan suhu inkubasi 50 °C tidak menunjukkan adanya zona inhibisi. Sedangkan pada perlakuan suhu inkubasi pada 30 dan 40 °C menunjukkan pertumbuhan sel yang sangat pesat, tetapi zona inhibisi yang ditimbulkan oleh filtrat hasil fermentasi pada suhu 30 °C dengan diameter rata-rata $8,03 \pm 0,08$ mm lebih besar daripada hasil fermentasi pada suhu 40 °C dengan diameter rata-rata $7,43 \pm 0,10$.

Berdasarkan hasil tersebut, maka dapat dikatakan bahwa suhu optimum fermentasi untuk menghasilkan senyawa antimikroba bakteriosin oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 yaitu pada suhu 30 °C.

Tabel 2. Penentuan suhu optimum fermentasi dalam produksi bakteriosin oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55

Perlakuan	Pertumbuhan BAL	Zone Inhibisi (mm)
Suhu fermentasi 30 °C	+++	8,03 ± 0,08
Suhu fermentasi 40 °C	+++	7,43 ± 0,10
Suhu fermentasi 50 °C	+	0,00 ± 0,00

Keterangan: Bakteri uji yang digunakan ialah *Salmonella typhimurium*.



Gambar 1. Diagram batang pengaruh suhu fermentasi terhadap diameter zona inhibisi pertumbuhan *Salmonella typhimurium*

Penentuan waktu optimum fermentasi

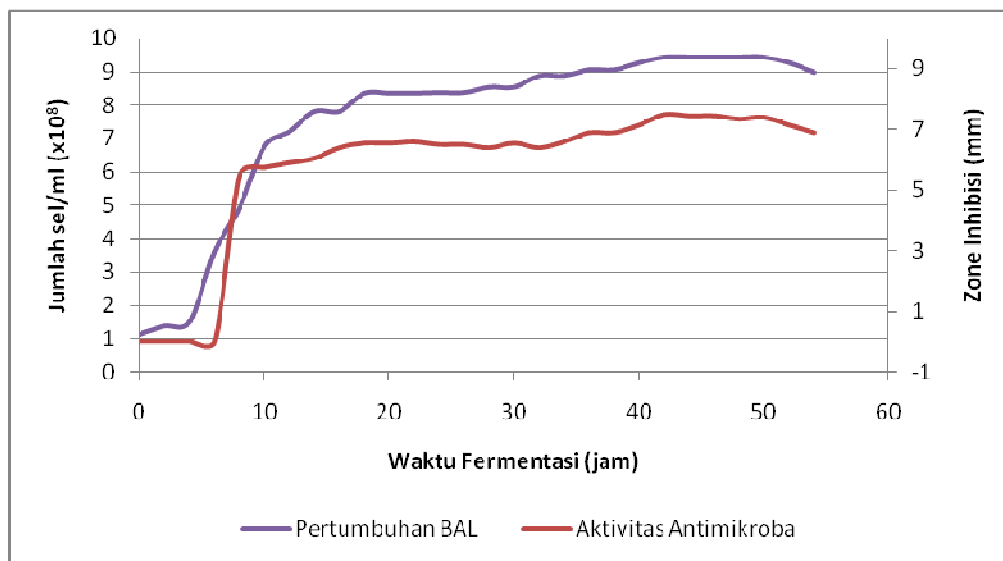
Waktu fermentasi optimum ditentukan melalui pembuatan kurva pertumbuhan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55. Indikator waktu optimum fermentasi ialah waktu dimana senyawa antimikroba bakteriosin diproduksi secara maksimal yang

ditandai dengan terbentuknya zona inhibisi paling besar terhadap pertumbuhan koloni bakteri uji patogen *Salmonella typhimurium*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa waktu optimum ditetapkan pada jam ke-42 seperti tampak pada Tabel 3 dan Gambar 2.

Tabel 3. Penentuan waktu optimum fermentasi dalam produksi bakteriosin oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55

Jam ke-	Jumlah sel/ml ($\times 10^8$)	Zone Inhibisi (mm)
0	1,1	0,00
2	1,4	0,00
4	1,5	0,00
6	3,6	0,00
8	4,9	5,50
10	6,8	5,75
12	7,2	5,90
14	7,8	6,05
16	7,8	6,40
18	8,4	6,55
20	8,4	6,55
22	8,4	6,60
24	8,4	6,50
26	8,4	6,50
28	8,5	6,40
30	8,5	6,55
32	8,9	6,40
34	8,9	6,60
36	9,1	6,90
38	9,1	6,90
40	9,3	7,15
42	9,4	7,50
44	9,4	7,45
46	9,4	7,45
48	9,4	7,35
50	9,4	7,40
52	9,3	7,15
54	9,0	6,90

Keterangan: Bakteri uji yang digunakan ialah *Salmonella typhimurium*.



Gambar 2. Grafik pertumbuhan sel BAL *Enterococcus faecium* DU55 dan diameter zona inhibisi hasil fermentasi terhadap bakteri uji *Salmonella typhimurium*

Pada Tabel 3 terlihat bahwa fase adaptasi pertumbuhan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 berlangsung hingga 4 jam dan setelah fermentasi selama 6 jam terjadi fase pertumbuhan logaritmik. Demikian halnya dengan produksi senyawa antimikroba belum terjadi hingga jam ke-6 dan mulai menunjukkan adanya aktivitas antimikroba setelah proses fermentasi berlangsung selama 8 jam.

Pada jam ke-18, terlihat pertumbuhan sel telah memasuki fase stasioner dengan kepadatan $8,4 \times 10^8$ sel/ml dan aktivitas antimikroba hasil fermentasi menunjukkan zona inhibisi sebesar 6,55 mm. Namun pada jam ke-28, pertumbuhan isolat BAL tersebut kembali menunjukkan grafik meningkat hingga pada jam ke-42 dengan kepadatan $9,4 \times 10^8$ sel/ml. Demikian pula dengan diameter zona inhibisi yang dihasilkan juga menunjukkan terjadinya peningkatan menjadi 6,40 mm. Selanjutnya, pada jam ke-52 terlihat pertumbuhan sel telah memasuki fase kematian. Berdasarkan hasil tersebut, maka jam ke-42 ditetapkan sebagai waktu optimum fermentasi untuk

menghasilkan senyawa antimikroba oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55.

Pada Gambar 2 tampak pula adanya hubungan antara pertumbuhan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 dan aktivitas antimikroba hasil fermentasi terhadap bakteri *Salmonella typhimurium*. Analisis statistik menunjukkan hubungan yang kuat dengan nilai korelasi sebesar 0,97.

Pengaruh komposisi medium fermentasi

Pengaruh medium dalam fermentasi senyawa bakteriosin oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 ditentukan dengan melakukan variasi komponen medium broth yang digunakan (Tabel 1). Hasil penelitian seperti tampak pada Tabel 4 menunjukkan bahwa keenam macam medium fermentasi yang digunakan dapat memberikan pertumbuhan sel yang cukup pesat dan semuanya memperlihatkan adanya aktivitas antimikroba dengan diameter zona inhibisi mulai $6,13 \pm 0,06$ mm (M5) sampai $7,58 \pm 0,08$ mm (M1). Tingkat aktivitas antimikroba dapat dilihat secara jelas pada diagram batang Gambar 3.

Perbedaan terhadap keenam medium fermentasi yang digunakan dianalisis secara statistik dengan ANOVA (*analysis of variance*) dan hasilnya menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (sig. 0.000) antara penggunaan medium satu dengan yang lainnya pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

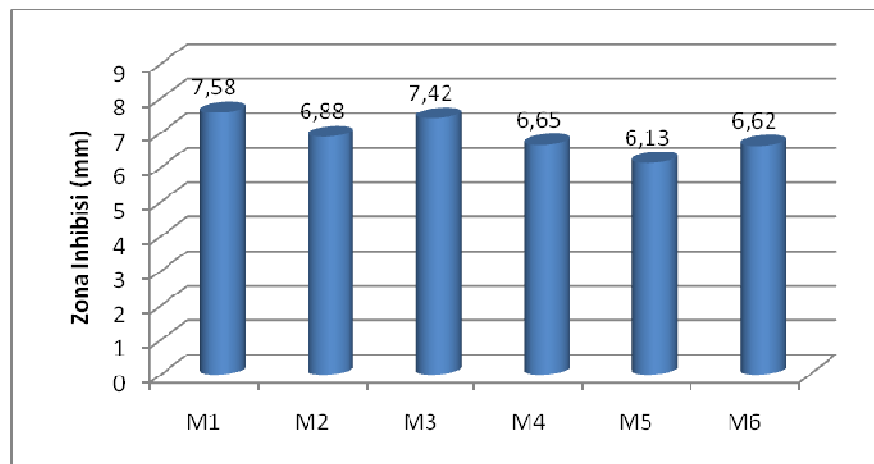
Produksi senyawa antimikroba yang paling tinggi diperoleh pada penggunaan medium M1 (komposisi sama dengan medium MRS) yang

ditunjukkan dengan terbentuknya zona inhibisi paling tinggi. Aktivitas senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh medium M1 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan penggunaan medium lainnya, kecuali dengan medium M3. Hal ini berarti bahwa substitusi pepton dengan tripton tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap diameter zona inhibisi senyawa bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55.

Tabel 4. Penentuan komposisi optimum medium fermentasi dalam produksi bakteriosin oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55

Perlakuan	Pertumbuhan BAL	Zone Inhibisi (mm)
M1	+++	7,58 ± 0,08
M2	++	6,88 ± 0,10
M3	+++	7,42 ± 0,10
M4	+++	6,65 ± 0,15
M5	++	6,13 ± 0,06
M6	+++	6,62 ± 0,10

Keterangan: Bakteri uji yang digunakan ialah *Salmonella typhimurium*.



Gambar 3. Diagram batang pengaruh medium fermentasi terhadap diameter zona inhibisi pertumbuhan *Salmonella typhimurium*.

Medium yang dapat memproduksi senyawa antimikroba tertinggi berikutnya ialah medium M2 yaitu suatu medium modifikasi terhadap medium M1 yang mensubstitusi glukosa

dengan sukrosa. Penggantian glukosa dengan sukrosa ini dalam medium dasar MRS sebagai sumber karbon memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas antimikroba hasil

fermentasi oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 dengan diameter zona inhibisi sebesar $6,88 \pm 0,10$ mm. Perbedaan aktivitas ini ditimbulkan oleh perbedaan proses fermentasi yang terjadi akibat perbedaan struktur molekul kedua sumber karbon yang digunakan. Glukosa sebagai monosakarida merupakan senyawa yang langsung dapat digunakan secara penuh oleh bakteri dalam metabolismenya, sedangkan sukrosa yang merupakan disakarida harus melalui tahap hidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa untuk selanjutnya digunakan oleh bakteri dalam metabolisme.

Penggunaan tiga macam medium yang lainnya (medium M4, M5, dan M6) memberikan aktivitas antimikroba yang lebih kecil dan menunjukkan perbedaan diameter zona inhibisi yang nyata dari penggunaan medium M1, M2, dan M3.

Berdasarkan hasil tersebut, maka komposisi medium yang optimum untuk digunakan dalam fermentasi menghasilkan senyawa antimikroba bakteriosin secara maksimal oleh isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 ialah medium M1 (komposisi sama dengan medium MRS).

Kesimpulan

Senyawa antimikroba bakteriosin dapat diproduksi secara fermentasi menggunakan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 yang diisolasi dari dangke. Kondisi optimum produksi ditetapkan dengan menentukan diameter zona inhibisi tertinggi yang ditimbulkan oleh filtrat hasil fermentasi terhadap pertumbuhan koloni bakteri uji patogen *Salmonella typhimurium* FNCC 0050.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi optimum dapat dilakukan pada suhu 30 °C selama 42 jam menggunakan medium produksi M1 dengan komposisi sama dengan medium MRS (Man, Rogosa and Sharpe).

Daftar Acuan

1. Harris, L.J.; Daeschel, M.A.; Stiles, M.E.; and Klaenhammer, T.R. *App. Microbiol.* 25 (1989), 436-444.
2. Daeschel, M.A. 1992. Procedures to Detect Antimicrobial Activities of Microorganism. Dalam B. Ray and M.A. Daeschel (eds), *Food Biopreservatives of Microbial Origins*. CRC Press Inc., Florida.
3. Kato, T. *et al.* 1994. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 (2):411-412.
4. Vuyst, L. de dan E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potencial of lactic acid bacterial. Dalam L. de Vuyst and E.J. Vandamme (eds), *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria; Microbiology, Genetics, and Applications*. Blackie Academic and Professional, London.
5. Hosono, A., R. Wardoyo, and H. Otani. 1988. *J. Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 22:20-24.
6. Antara, N.S., I N. Sujaya, A. Yokota, K. Asano, and F. Tomita. 2004. *J. Biosci. Bioeng.* 98:92-98.
7. Onda, T., F. Yanagida, M. Tsuji, T. Shinohara, and K. Yokotsuka. 2003. *Int. J. Food Microbiol.* 87:153-159.
8. Kostinek, M., I. Specth, V.A. Edward, U. Schillinger, C. Hertel, W.H. Holzapfel, and C.M.A.P. Franz. 2005. *Syst. App. Microbiol.* [In Press, Corrected Proof].
9. Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2005. *Proc. Biochem.* 40:365-370.
10. Aslim, B., Z.N. Yuksekdog, E. Sarikaya, and Y. Beyatli. 2004. *LWT Food Sci. Techol.* 38:691-694.
11. Admin. 2007. *Mencicipi Dangke dan Pulú Mandoti* [online], (<http://www.enrekangkab.go.id>, diakses 30 Agustus 2007).

12. Marzoeki, A.A.M., A. Hafid, M. Jufri, Amir, dan Madjid. 1978. *Penelitian Peningkatan Mutu Dangka*. Balai Penelitian Kimia Departemen Perindustrian, Makassar.
13. Buckle, K.A., R.A. Edwards, G. H. Flead dan M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan*. Terjemahan oleh H. Purnomo dan Adiono. UI Press, Jakarta.
14. Razak, A.R., A.R. Patong, T. Harlim, M.N. Djide, Haslia, dan Mahdalia. 2008. *J. Kim. Tad.* 9(2):17-29.
15. Klaenhammer, T.R. 1988. *J. Biochimie*. 70:337-349.
16. Mayr-Harting, A., A.J. Hedges, and R.C.W. Berkeley. 1972. Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol.* 7:315-422.
17. Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka, and M. Okazaki. 2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10):5746-5753.
18. Idionline. 2008. *Antara Antibiotik, Probiotik, dan Prebiotik* [online], (<http://www.KeluargaSehat.com>, diakses 8 April 2008).
19. Patong, A.R., A. Karim, dan A. Ahmad. 2005. *J. Phar. and Pharmacol.* 9(3):86-94.
20. Rahayu, E.S., A.K. Wardani, dan S. Margino. 2004. *Agritech.* 24(2):74-81.