

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI AIR SUSU IBU (ASI)
TERHADAP *Listeria monocytogenes* FNCC 0156**

*Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria from Breast Milk against Listeria monocytogenes
FNCC 0156*

Made Juli Antari¹, Ni Nyoman Puspawati², Putu Ari Sandhi Wipradnyadewi²

¹Mahasiswa Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Unud

²Dosen Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas teknologi Pertanian, Unud
Kampus Bukit Jimbaran, Badung-Bali

ABSTRACT

The aim of the research was to find the potency of Lactic Acid Bacteria isolated from breast milk on inhibiting *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 and to find the magnitude of lactic acid bacteria from breast milk in inhibiting *L. monocytogenes* FNCC 0156. This research consists of two phases: antimicrobial activity of lactic acid bacteria from breast milk and activity of bacteriocin against *L. monocytogenes* FNCC 0156. Isolates used in this research were A1, A3, A6, A8, A9, B3, B7, B8, and B10b. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from breast milk against *L. monocytogenes* FNCC 0156 was performed using cell free supernatant, cell free neutral supernatant, and cell free neutral heated supernatant. The test was performed by well-agar diffusion method and contact method. The activity of bacteriocin was carried out according to the optimum incubation time of bacteriocin production in cell free heated neutral supernatant. The highest antimicrobial activity was supernatant treatment by well-agar diffusion method and contact method showed by isolate A1 with inhibition diameter of 10.60 mm and a decrease of 1.66 log cycle. The highest antimicrobial activity was neutral supernatant treatment by well-agar diffusion method and contact method showed by isolate B8 with inhibition diameter of 5.11 mm and increased only by 0.18 log cycle. The highest antimicrobial activity on the heated neutral supernatant treatment by well-agar diffusion method and contact method showed by isolate A6 with inhibition diameter of 0.85 mm and a decrease of 0.48 log cycle. The two isolates of cell free neutral heated supernatant treatment were isolate A6 and isolate B8 suspected to have bacteriocin compounds and were then continued with isolation of bacteriocin. The result of the second phase showed that optimum time for bacteriocin production of isolate A6 was 36 hours and B8 was 60 hours. The highest antimicrobial activity of bacteriocin was shown by isolate A6 with an average inhibition diameter of 5.36 mm, followed by B8 with an average inhibition diameter of 2.44 mm.

Keywords: *lactic acid bacteria, breast milk, Listeria monocytogenes FNCC 0156, antimicrobial activity, bacteriocin*

PENDAHULUAN

Listeria monocytogenes adalah salah satu bakteri patogen yang dapat menjadi agen penyebab *foodborne disease* yaitu penyakit yang ditularkan melalui makanan. *Listeria monocytogenes* tersebar luas di alam dan biasanya terdapat pada tanah, tanaman atau feses hewan. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada makanan mentah seperti daging yang tidak dimasak, susu mentah, susu pasteurisasi, keju lunak, coklat susu, *hot dog*, *seafood*, serta buah dan sayuran segar (Andini *et al.*, 1998).

Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri ini dikenal dengan nama listeriosis. Listeriosis

merupakan penyakit yang jarang dilaporkan muncul namun menjadi perhatian ahli mikrobiologi karena mengakibatkan kematian sekitar 20 – 30%. Efek utama penyakit ini terjadi pada orang dengan sistem imun yang lemah seperti wanita hamil, bayi, penderita AIDS, dan penerima transplantasi organ.

Pengobatan listeriosis tergantung pada tingkat keparahan infeksi. Infeksi dengan tingkat keparahan yang cukup berat dapat diobati dengan pemberian antibiotik kimia. Penggunaan antibiotik kimia selain memiliki sisi positif juga memiliki sisi negatif antara lain munculnya efek samping dalam jangka panjang seperti terjadinya kerusakan hati dan ginjal, maka dari itu

diperlukan alternatif lain untuk pengobatan listeriosis dengan efek samping yang sedikit. Dewasa ini mulai dilakukan terapi pengobatan dengan menggunakan bakteri asam laktat karena sifat bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri baik dan sudah lama digunakan dalam dunia pangan dan kesehatan. Kemampuan BAL untuk tumbuh di jalur intestinal dapat digunakan untuk menjaga keseimbangan mikroflora usus, sehingga tubuh tidak mudah terserang mikroba patogen enterik yang menyebabkan infeksi. Potensi inilah yang menjadi alasan BAL genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* yang merupakan bagian dari flora normal pada saluran pencernaan manusia digunakan sebagai probiotik. Probiotik merupakan organisme hidup yang mampu memberikan efek yang menguntungkan bagi kesehatan hostnya apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup (Rahayu, 2002 dalam Sugiono dan Mahenda, 2004).

Worthington dan Roberts (1993) dalam Rohmawati (2010) menyatakan bahwa BAL sering ditemukan secara alamiah dalam bahan pangan dan diketahui juga terdapat pada air susu ibu (ASI). ASI mengandung banyak sekali zat gizi seperti faktor bifidus, yaitu sejenis karbohidrat yang mengandung nitrogen disebut N-acetylglucosamine yang dapat menunjang pertumbuhan bakteri *Lactobacillus bifidus*. Rohmawati (2010) telah berhasil mengisolasi BAL dari ASI ibu menyusui di sekitaran kota Bogor yang berpotensi sebagai probiotik dan

memiliki sifat penghambatan yang baik terhadap *L. monocytogenes*. Sebanyak 28 isolat BAL dari ASI ibu menyusui di sekitaran kota Denpasar juga telah berhasil diisolasi dan diperoleh 9 isolat BAL yang berpotensi dan memiliki ciri-ciri probiotik, salah satunya adalah memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroba patogen (Puspawati dan Nociantri, 2012). Komponen antimikroba yang terdapat pada BAL yaitu asam organik, karbondioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin (Amezquita dan Brashears, 2002). Komponen antimikroba tersebut sangat penting dalam melawan mikroba patogen di dalam makanan ataupun di dalam tubuh. Salah satu sifat penting dari BAL adalah kemampuannya dalam menghasilkan bakteriosin. Penelitian Putra (2015) menyatakan isolasi bakteriosin isolat BAL dari ASI memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Sundari (2014) menyatakan bahwa isolat BAL dari ASI memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, sedangkan penelitian Vinanta (2015) juga menyatakan bahwa isolat BAL dari ASI memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Vibrio cholerae*, namun pengujian aktivitas antimikroba dan bakteriosin isolat BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* belum diketahui dan belum pernah diteliti. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antimikroba dan bakteriosin isolat BAL dari ASI terhadap bakteri patogen lain salah satunya *L. monocytogenes* FNCC 0156.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana. Penelitian ini dilakukan dari bulan Juli hingga Desember 2015.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) dari ASI yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan Universitas Udayana yang berjumlah 9 buah yaitu kode A1, A3, A6, A8, A9, B3, B7, B8,

dan B10b, isolat *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 yang diperoleh dari PAU UGM Yogyakarta, *Nutrien Agar* (NA) (Merck), *De Man Rogosa and Sharpe Broth* (MRSB) (Merck), *De Man Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA) (Merck), *Tryptone Soy Broth* (TSB) (Merck), *Tryptone Soy Agar* (TSA) (Merck), *Oxford Listeria Selective Agar* (LSA) (Oxoid), NaOH 1 N, gliserol 30%, NaCl (Merck), alkohol 96% (Brataco), amonium sulfat, H₂O₂ (3%), *Bromo Cresol Purple* (BCP), kristal violet, lugol, safranin, indikator pH Universal, tissue, kapas, aquades, aluminium foil, kertas label, plastik, dan kertas buram.

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini diantaranya cawan petri (pyrex), tabung reaksi

(pyrex), gelas ukur (pyrex), jarum ose, gelas beker (pyrex), bunsen, jangka sorong, batang bengkok, erlenmeyer (pyrex), magnetik stirer, gelas objek, *effendorf*, tip, mikropipet, timbangan analitik, inkubator (Memmert), laminar flow cabinet (Kojair), vortex, autoclave (Hirayama), mikroskop (Olimpus BX 51), *waterbath*, dan sentrifuse dingin (K3 Series).

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan tujuan untuk menentukan isolat BAL dari ASI yang berpotensi menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* FNCC 0156. Terdapat 9 isolat yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu isolat A1, A3, A6, A8, A9, B3, B7, B8, dan B10b dengan perlakuan penelitian berupa supernatan bebas sel (SBS), supernatan bebas sel netral (SBSN), dan supernatan bebas sel netral panas (SBSNP). Masing-masing perlakuan dilakukan duplo dan diulang sebanyak 2 kali ulangan. Data yang diperoleh kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan gambar yang selanjutnya dianalisis secara deskriptif.

Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari 2 tahap. Tahap pertama yaitu pengujian aktivitas antimikroba BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156. Bahan yang digunakan dalam pengujian adalah supernatan BAL dari ASI yang terdiri dari supernatan bebas sel (SBS), supernatan bebas sel yang dinetralkan (SBSN), dan supernatan bebas sel netral yang dipanaskan (SBSNP). SBS merupakan cairan bebas sel yang mengandung metabolit-metabolit hasil metabolisme dari BAL seperti asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, dan bakteriosin. Penetralkan SBS memiliki tujuan untuk menghilangkan asam organik yang dihasilkan oleh isolat BAL sehingga komponen seperti hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin saja yang terdapat pada supernatan. Supernatan tersebut disebut Supernatan Bebas Sel Netral (SBSN). Pemanasan SBSN bertujuan untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat mikroba patogen yang masih terdapat dalam SBSN selama inkubasi, seperti hidrogen peroksida, diasetil dan juga enzim-enzim proteolitik sehingga hanya bakteriosin saja yang hanya terdapat pada supernatan. Supernatan

tersebut disebut Supernatan Bebas Sel Netral yang dipanaskan (SBSNP) (Sundari, 2014).

Tahap kedua yaitu pengujian aktivitas bakteriosin BAL dari ASI yang diduga terdapat pada SBSNP yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156.

1. Konfirmasi Isolat BAL dan *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Uji konfirmasi terdiri dari pewarnaan Gram, pengamatan bentuk bakteri dan uji katalase (Harrigan dan McCance, 1998).

2. Aktivitas Antimikroba BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

a. Persiapan Supernatan Bebas Sel (SBS), Supernatan Bebas Sel Netral (SBSN), dan Supernatan Bebas Sel Netral Panas (SBSNP) dari Isolat BAL dari ASI

Isolat BAL diinokulasi dalam tabung reaksi yang telah berisi media MRSB, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Suspensi isolat BAL dalam tabung reaksi disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan dan filtrat yang terbentuk kemudian dipisahkan, bagian yang digunakan adalah bagian supernatannya yang disebut supernatan bebas sel (SBS). Sebanyak 1 ml SBS kemudian dinetralkan dengan menggunakan NaOH 1 N dan indikator BCP yang selanjutnya disebut supernatan bebas sel netral (SBSN). SBSN diambil sebanyak 0,5 ml untuk diberi perlakuan pemanasan menggunakan *waterbath* pada suhu 100 °C selama 15 menit, yang selanjutnya disebut supernatan bebas sel netral dipanaskan (SBSNP). Tahap persiapan akan diperoleh 3 jenis supernatan yang akan diuji (Juniarthati, 2011).

b. Pengujian Aktivitas Antimikroba -isolat BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Pengujian aktivitas antimikroba BAL terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode sumur (Rachmawati *et al.*, 2005) dan metode kontak (Rahayu, 2000).

Metode Sumur

Pengujian dengan metode sumur diawali dengan kultur bakteri uji yang telah disegarkan,

diinokulasikan sebanyak 1 ml ke dalam 50 ml NA yang masih cair, dikocok merata kemudian dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 25 ml. Setelah ± 15 menit, dibuat sumur-sumur dengan diameter 5 mm kemudian dimasukkan sebanyak 30 μ l SBS, SBSN, SBSNP, dan MRSB steril sebagai kontrol ke dalam masing-masing sumur dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diameter penghambatan (mm) diukur dengan jangka sorong sebanyak empat kali pada posisi yang berbeda dan dirata-ratakan.

Metode Kontak

Pengujian dengan metode kontak dilakukan dengan cara 1 μ l *L. monocytogenes* FNCC 0156 yang telah disegarkan selama 24 jam dimasukkan kedalam 1 ml SBS sesuai perlakuan. Dilakukan pemupukan cawan pada jam ke-0 dan jam ke- 8 lalu cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Dilakukan perhitungan jumlah koloni per ml sesuai dengan *Standard Plate Count* (SPC) dan dihitung penurunan jumlah koloni untuk setiap perlakuan dan ulangan. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan yang mengandung jumlah koloni antara 25-250.

3. Aktivitas Bakteriosin terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

a. Penentuan Waktu Optimum Produksi Bakteriosin

Isolat BAL dari ASI yang diduga mengandung bakteriosin (SBSNP) dan memiliki aktivitas penghambatan terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antimikroba terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 pada waktu inkubasi yang berbeda dari 24, 36, 48, dan 60 jam (Putra, 2015 yang dimodifikasi) dengan metode sumur. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui waktu optimum produksi bakteriosin dan daya penghambatannya terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156.

b. Isolasi Bakteriosin

Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati dalam penelitian adalah besarnya penghambatan yang terbentuk dengan menggunakan metode sumur dan metode kontak.

Bakteri yang telah diinkubasi sesuai dengan waktu inkubasi terbaik disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama ± 15 menit. Pisahkan supernatan dengan endapan, sehingga memperoleh supernatan bebas sel (SBS). Sebanyak 1 ml SBS dipindahkan kedalam effendorf, dinetralkan dengan menggunakan NaOH 1N dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit kemudian didiamkan selama 10 menit. Tambahkan amonium sulfat sebanyak 0.52 gram ke dalam SBS dan divortex hingga homogen. SBS yang telah homogen kemudian simpan selama 24 jam pada suhu 5 °C dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Endapan yang diperoleh dibilas menggunakan air steril kemudian disentrifugasi kembali, air steril hasil bilasan dibuang. Pembilasan dilakukan sebanyak 2 kali kemudian endapan ditambah dengan air steril kembali sebanyak 50 μ L dan divortex hingga homogen (Juniarthati, 2011).

c. Pengujian Aktivitas Bakteriosin terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Pengujian aktivitas bakteriosin terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 dilakukan dengan metode sumur (Rachmawati *et al.*, 2011). Pengujian dengan metode sumur diawali dengan kultur bakteri uji yang telah disegarkan, diinokulasikan sebanyak 1 ml ke dalam 50 ml NA yang masih cair, dikocok sampai merata kemudian dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 25 ml. Setelah ± 15 menit, dibuat sumur-sumur dengan diameter 6 mm kemudian dimasukkan 20 μ l bakteriosin kedalam masing-masing lubang sumur dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Diameter penghambatan adalah diameter bening yang terbentuk di sekitar sumur yang diukur dengan satuan mm. Diameter penghambatan (mm) selanjutnya diukur dengan jangka sorong sebanyak empat kali pada posisi yang berbeda dan dirata-ratakan

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Konfirmasi Isolat BAL dari ASI dan Bakteri *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Tabel 1. Hasil uji konfirmasi isolat BAL dari ASI dan *L.monocytogenes* FNCC 0156.

| No. | Kode isolate | Karakteristik Fisik | | |
|-----|---|---------------------|---------------|----------|
| | | Gram | Morfologi | Katalase |
| 1 | A1 | Positif | Kokus | Negatif |
| 2 | A3 | Positif | Kokus | Negatif |
| 3 | A6 | Positif | Kokus | Negatif |
| 4 | A8 | Positif | Kokus | Negatif |
| 5 | A9 | Positif | Kokus | Negatif |
| 6 | B3 | Positif | Kokus | Negatif |
| 7 | B7 | Positif | Kokus | Negatif |
| 8 | B8 | Positif | Kokus | Negatif |
| 9 | B10b | Positif | Kokus | Negatif |
| 10 | <i>Listeria monocytogenes</i> FNCC 0156 | Positif | Batang Pendek | Positif |

Berdasarkan hasil konfirmasi karakteristik BAL yang diisolasi dari ASI diketahui bahwa isolat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat BAL karena memiliki karakteristik fisik yaitu berbentuk kokus, gram positif, dan katalase negatif. Menurut Purnomo, 2007 dalam Ernawati (2011) sifat-sifat umum BAL itu antara lain berbentuk batang atau bulat (kokus), bersifat Gram positif, katalase negatif, tidak berspora, non motil, dan mampu menghasilkan asam laktat. Seluruh isolat BAL yang digunakan merupakan bakteri Gram positif yang ditandai dengan warna ungu pada dinding selnya. Perbedaan bakteri Gram positif dan Gram negatif terdapat pada komposisi dinding sel, ketahanan terhadap penisilin, penghambatan terhadap pewarna basa, kebutuhan nutrisi dan ketahanan terhadap perlakuan fisik. Perbedaan komposisi dinding sel pada Gram positif dan bakteri Gram negatif mengakibatkan perbedaan dalam sifat pewarnaannya. Bakteri gram positif 90% dinding selnya terdiri dari peptidoglikan sedangkan Gram negatif hanya 5-20%, lapisan lainnya terdiri dari protein, lipoprotein dan lipopolisakarida (Pelczar dan Chan, 2005). Uji katalase yang dilakukan pada seluruh isolat BAL menunjukkan hasil katalase negatif. Katalase negatif ditandai dengan tidak adanya gelembung

Uji aktivitas antimikroba BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 dilakukan dengan SBS, SBSN, dan SBSNP. Isolat

Konfirmasi isolat BAL dilakukan berdasarkan karakteristik fisik yang meliputi uji pewarnaan, Gram, pengamatan morfologi bakteri dan uji katalase. Hasil konfirmasi isolat BAL disajikan pada Tabel 1.

gas O₂ yang dihasilkan dari degradasi H₂O₂ oleh enzim katalase. Menurut Surono (2004), enzim katalase dapat memecah senyawa H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂.

Hasil konfirmasi karakteristik terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 yaitu berbentuk batang pendek, Gram positif dan Katalase positif. Sutherland, 1998 dalam Ariyanti, 2010 menyebutkan bahwa *L. monocytogenes* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang pendek, dapat berbentuk tunggal, tersusun paralel membentuk rantai pendek atau seperti huruf V. *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 yang digunakan merupakan bakteri Gram positif yang ditandai dengan warna ungu pada dinding selnya. Warna ungu disebabkan karena bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan tebal yang menahan kristal violet selama pengecatan Gram (Razali, 1987). Uji katalase yang dilakukan terhadap isolat *L. monocytogenes* FNCC 0156 menunjukkan hasil katalase positif. Katalase positif ditandai dengan adanya gelembung gas O₂ hasil degradasi dari H₂O₂.

2. Aktivitas Antimikroba BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

BAL dinyatakan memiliki aktivitas antimikroba jika memiliki kemampuan menurunkan jumlah koloni *L. monocytogenes* FNCC 0156 dengan

metode kontak serta memberikan diameter bening dengan metode sumur.

a. Aktivitas Antimikroba SBS BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Hasil pengujian aktivitas antimikroba SBS BAL dari ASI terhadap *monocytogenes* FNCC 0156 dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas antimikroba SBS isolat BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

| No. | Kode Isolat | Metode Kontak | Metode Sumur | Keterangan (*) |
|-----|-------------|---------------|----------------------------|----------------|
| | | Log N_t/N_0 | Diameter Penghambatan (mm) | |
| 1 | Kontrol | 0,62 | 0,00 | Tidak ada |
| 2 | A1 | - 1,66 | 10,60 | Kuat |
| 3 | A3 | - 1,15 | 6,85 | Kuat |
| 4 | A6 | - 0,42 | 6,39 | Kuat |
| 5 | A8 | 0,02 | 0,02 | Lemah |
| 6 | A9 | - 0,64 | 4,30 | Sedang |
| 7 | B3 | - 1,15 | 8,92 | Kuat |
| 8 | B7 | - 1,18 | 3,14 | Sedang |
| 9 | B8 | - 0,62 | 7,25 | Kuat |
| 10 | B10b | - 0,60 | 6,13 | Kuat |

Keterangan: (-) = terjadi penurunan jumlah koloni
(+) = terjadi peningkatan jumlah koloni
(*) = Kriteria berdasarkan metode sumur (Pan *et al.*, 2009)

Aktivitas antimikroba BAL dari ASI pada perlakuan SBS terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 menunjukkan adanya penghambatan pada semua isolat dengan metode sumur. Aktivitas antimikroba SBS BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 pada metode sumur berkisar 0,02 mm hingga 10,60 mm. Dari 9 isolat BAL yang diuji, isolat A1 menunjukkan aktivitas antimikroba tertinggi dengan diameter penghambatan sebesar 10,60 mm. Aktivitas antimikroba terendah ditunjukkan oleh isolat A8 dengan diameter penghambatan sebesar 0,02 mm.

Aktivitas antimikroba BAL dari ASI pada perlakuan SBS terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 menunjukkan adanya penghambatan pada metode kontak. Aktivitas antimikroba SBS BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 berkisar 0,02 siklus log hingga (-1,66) siklus log. Dari 9 isolat BAL yang diuji, isolat A1 menunjukkan aktivitas antimikroba tertinggi karena mampu menurunkan jumlah awal koloni *L. monocytogenes* FNCC 0156 setelah kontak selama 8 jam sebesar 1,66 siklus log. Aktivitas antimikroba terendah ditunjukkan oleh isolat A8

yaitu peningkatan jumlah koloni sebesar 0,02 siklus log.

Adanya penghambatan isolat BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 dikarenakan adanya metabolit-metabolit yang dihasilkan. Metabolit-metabolit yang terkandung dalam SBS berupa asam organik (asam laktat dan asam asetat), etanol, karbohidrat, bakteriosin, diasetil, dan hidrogen peroksida. Mekanisme penghambatan bakteri patogen oleh asam-asam organik berhubungan dengan keseimbangan asam-basa pada sel mikroba yang ditunjukkan dengan pH yang mendekati normal. Protein, asam nukleat dan fosfolipid dapat rusak oleh perubahan pH. Ketersediaan ion-ion logam akan mengganggu permeabilitas membran, karena membran kurang permeabel terhadap ion dibandingkan dengan molekul yang tidak bermuatan. Perubahan permeabilitas membran akan menghasilkan efek ganda, yaitu mengganggu transpor nutrisi ke dalam sel dan menyebabkan metabolit internal keluar dari sel (Rosmawati, 2012).

Penghambatan oleh karbondioksida disebabkan karena lingkungan menjadi anaerob dan akumulasi pada lipida bilayer membran

sehingga terjadi disfungsi permeabilitas membran (Yang, 2000). Senyawa antimikroba hidrogen peroksida, etanol, dan diasetil dapat bersifat bakterisidal terutama dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa tersebut yang dihasilkan oleh BAL (Rachmawati *et al.*, (2006). Menurut De Vuyst dan Vandamme *dalam* Rochmawati (2012) bakteriosin didefinisikan sebagai protein kompleks yang menunjukkan aktivitas bakterisidal terutama terhadap bakteri gram positif dan khususnya

terhadap spesies yang berhubungan dekat dengannya.

b. Aktivitas Antimikroba SBSN Isolat BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Hasil pengujian aktivitas antimikroba SBSN BAL dari ASI terhadap *monocytogenes* FNCC 0156 dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas antimikroba SBSN isolat BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

| No. | Kode Isolat | Metode Kontak | Metode Sumur | |
|-----|-------------|---------------|----------------------------|----------------|
| | | Log N_t/N_0 | Diameter Penghambatan (mm) | Keterangan (*) |
| 1 | Kontrol | 0,62 | 0,00 | Tidak ada |
| 2 | A1 | 0,30 | 0,18 | Lemah |
| 3 | A3 | 0,80 | 0,27 | Lemah |
| 4 | A6 | 0,69 | 0,79 | Lemah |
| 5 | A8 | 0,81 | 0,00 | Tidak Ada |
| 6 | A9 | 1,06 | 0,00 | Tidak Ada |
| 7 | B3 | 0,80 | 0,00 | Tidak Ada |
| 8 | B7 | 0,96 | 4,21 | Sedang |
| 9 | B8 | 0,18 | 5,11 | Sedang |
| 10 | B10b | 0,25 | 0,7 | Lemah |

Keterangan: (-) = terjadi penurunan jumlah koloni
(+) = terjadi peningkatan jumlah koloni
(*) = Kriteria berdasarkan metode sumur (Pan *et al.*, 2009)

Aktivitas antimikroba SBSN pada metode sumur menunjukkan ada 6 isolat yang memiliki penghambatan terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 yaitu A1, A3, A6, B7, B8 dan B10b, sedangkan Isolat A8, A9, serta B3 tidak menunjukkan adanya penghambatan pada metode sumur. Aktivitas antimikroba tertinggi pada metode sumur ditunjukkan isolat B8 yaitu sebesar 5,11 mm.

Aktivitas antimikroba SBSN pada metode kontak tidak menunjukkan adanya penurunan jumlah koloni setelah kontak 8 jam, namun isolat A1, B8, dan B10b peningkatannya masih berada dibawah kontrol. Isolat A3, A6, A8, A9, B3 dan B7 mengalami peningkatan jumlah koloni *L. monocytogenes* FNCC 0156 diatas kontrol. Aktivitas antimikroba tertinggi pada metode kontak ditunjukkan pada isolat B8 dimana hanya mengalami peningkatan sebesar 0,18 siklus log dari jumlah awal koloni *L. monocytogenes* FNCC 0156 setelah dikontakkan selama 8 jam dan masih berada dibawah kontrol.

SBSN dapat menghambat bakteri *L. monocytogenes* FNCC 0156 namun aktivitas penghambatannya tidak seoptimal SBS karena senyawa antimikroba yang terkandung jumlahnya relatif lebih sedikit sehingga bersifat bakteristatik (Rachmawati *et al.* 2006). SBSN terdiri dari komponen-komponen metabolit BAL selain asam organik yaitu hidrogen peroksida, diasetil, bakteriosin dan karbondioksida. Supernatan yang telah dinetralkan mengakibatkan hilangnya pengaruh asam organik yang terkandung di dalam supernatan bebas sel sehingga tidak terjadi perubahan pH yang dapat mengganggu metabolisme sel. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri berkaitan dengan aktivitas enzim untuk mengkatalisis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri.

c. Aktivitas Antimikroba SBSNP BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Hasil pengujian aktivitas antimikroba SBSNP BAL dari ASI terhadap *monocytogenes* FNCC 0156 dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Aktivitas antimikroba SBSNP isolat BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

| No. | Kode Isolat | Metode Kontak | Metode Sumur | |
|-----|-------------|---------------|----------------------------|----------------|
| | | Log N_t/N_0 | Diameter Penghambatan (mm) | Keterangan (*) |
| 1 | Kontrol | 0,62 | 0,00 | Tidak ada |
| 2 | A1 | 1,26 | 0,00 | Tidak Ada |
| 3 | A3 | 0,61 | 0,00 | Tidak Ada |
| 4 | A6 | - 0,48 | 0,87 | Lemah |
| 5 | A8 | 1,20 | 0,00 | Tidak Ada |
| 6 | A9 | 1,84 | 0,00 | Tidak Ada |
| 7 | B3 | 1,85 | 0,00 | Tidak Ada |
| 8 | B7 | 1,12 | 0,00 | Tidak Ada |
| 9 | B8 | 0,86 | 0,85 | Lemah |

Keterangan: (-) = terjadi penurunan jumlah koloni
 (+) = terjadi peningkatan jumlah koloni
 (*) = Kriteria berdasarkan metode sumur (Pan *et al.*, 2009)

Aktivitas antimikroba SBSNP pada metode sumur menunjukkan ada 2 isolat yang memiliki penghambatan terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 yaitu isolat A6 dan B8, sedangkan Isolat yang lainnya tidak menunjukkan adanya penghambatan pada metode sumur. Aktivitas antimikroba tertinggi pada metode sumur ditunjukkan isolat A6 yaitu sebesar 0,87 mm.

Aktivitas antimikroba SBSNP isolat BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 pada metode kontak hanya isolat A6 yang menunjukkan adanya penurunan jumlah koloni setelah kontak 8 jam, yaitu sebesar 0,48 siklus log, sedangkan isolat lainnya menunjukan peningkatan.

Uji aktivitas antimikroba pada SBSNP menunjukkan penghambatan yang lebih kecil dibandingkan pada SBS dan SBSN, hal ini disebabkan karena SBSNP hanya terkandung metabolit berupa bakteriosin sedangkan metabolit-

metabolit yang lain seperti hidrogen peroksida, diasetil dan karbondioksida hilang akibat pemanasan. Menurut Ouwehand dan Vesterlund (2004), daya hambat bakteriosin sempit sehingga hanya mampu melawan bakteri yang kekerabatannya dekat dengan strainnya.

Dari 9 isolat BAL yang diisolasi dari ASI terdapat 2 isolat yang diduga memiliki senyawa bakteriosin sehingga akan dilanjutkan ketahap selanjutnya yaitu tahap inkubasi sesuai dengan waktu optimum produksi bakteriosin.

3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Produksi Bakteriosin

Uji aktivitas SBSNP yang diinkubasi sesuai dengan waktu optimum produksi bakteriosin yaitu 24 jam, 36 jam, 48 jam dan 60 jam. Hasil pengamatan waktu inkubasi optimum produksi bakteriosin dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Waktu inkubasi optimum produksi bakteriosin

| No | Isolat | Diameter Penghambatan (mm) pada Waktu Inkubasi jam ke - | | | |
|----|--------|---|------|----|------|
| | | 24 | 36 | 48 | 60 |
| 1. | A6 | 0,87 | 2,76 | 0 | 1,65 |
| 2. | B8 | 0,85 | 0,42 | 0 | 1,49 |

Aktivitas SBSNP isolat A6 terbesar yaitu pada waktu inkubasi 36 jam dengan diameter penghambatan sebesar 2,76 mm. Aktivitas SBSNP isolat B8 terbesar ditunjukkan pada waktu inkubasi 60 jam dengan diameter penghambatan sebesar 1,49 mm. Berdasarkan hasil penelitian Putra (2015), menunjukkan bahwa waktu

optimum produksi supernatan bebas sel yang mengandung bakteriosin (SBSNP) dari masing-masing isolat berbeda-beda. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses penghambatan diantaranya konsentrasi senyawa antimikroba, jumlah mikroba, spesies mikroba, suhu, pH dan

adanya bahan organik lain (Pelczar dan Chan, 1988 *dalam* Putra, 2015).

Penelitian Karthikeyan dan Santhosh (2009) menyebutkan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactococcus acidophilus* memiliki aktivitas tertinggi pada akhir fase stasioner yaitu pada waktu 14 jam. Fase stasioner BAL *L. masenteroides* berlangsung hingga waktu inkubasi 22 jam kemudian mengalami fase kematian dan bakteriosin yang dihasilkan disintesa selama fase stasioner. Periode sintesis bakteriosin memiliki waktu yang berbeda-beda, tidak selalu terjadi pada akhir awal fase stasioner. Isolat BAL yang dipergunakan dalam penelitian memiliki karakteristik berbeda-beda sehingga menghasilkan kurva pertumbuhan yang berbeda-beda yang

mempengaruhi metabolit yang dihasilkan serta aktivitas metabolit khususnya bakteriosin (Kusmiati dan Malik, 2002 *dalam* Putra, 2015).

4. Aktivitas Antimikroba Bakteriosin BAL dari ASI Terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

Uji aktivitas bakteriosin BAL yang telah diisolasi terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 menunjukkan bahwa isolat A6, dan B8 positif menghasilkan senyawa bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan *L. monocytogenes* FNCC 0156. Hasil pengujian aktivitas bakteriosin terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 6. Diameter Penghambatan Bakteriosin BAL dari ASI terhadap *Listeria monocytogenes* FNCC 0156

| No. | Isolat | Waktu Optimum produksi Bakteriosin (jam) | Rata-rata Penghambatan (mm) | Keterangan (*) |
|-----|--------|--|-----------------------------|----------------|
| 1 | A6 | 36 | 5,36 | Sedang |
| 2 | B8 | 60 | 2,44 | Lemah |

Berdasarkan hasil penelitian isolat yang memiliki daya penghambatan bakteriosin terbesar isolat A6 pada waktu inkubasi 36 jam yaitu sebesar 5,36. Mekanisme aktivitas penghambatan bakteriosin yaitu molekul bakteriosin mengalami kontak langsung dengan membran sel. Proses kontak ini mengganggu potensial membran berupa destabilisasi membran sitoplasma, menghambat sintesa asam nukleat, sintesa protein,

dan mengubah mekanisme translator sel sehingga menyebabkan sel mikroba lisis (pecah) dan kemudian mati (Gonzalez *et al.*, 1996). Bakteriosin didefinisikan sebagai protein kompleks yang menunjukkan aktivitas bakterisidal terutama terhadap bakteri gram positif dan khususnya terhadap spesies yang berhubungan dekat dengannya (De Vuyst dan Vandamme *dalam* Rochmawati, 2012).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:
2. Aktivitas antimikroba perlakuan SBS isolat BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 menunjukkan semua isolat terdapat penghambatan pada metode sumur dan penurunan jumlah koloni metode kontak. Aktivitas antimikroba perlakuan SBSN isolat BAL dari ASI terhadap *L.*

monocytogenes FNCC 0156 menunjukkan adanya penghambatan pada isolat A1, A3, A6, B7, B8, dan B10b untuk metode sumur namun tidak ada penurunan jumlah koloni pada metode kontak, hanya isolat A1, A6, B8, dan B10b mengalami peningkatan jumlah koloni yang masih di bawah kontrol. Aktivitas antimikroba perlakuan SBSNP isolat BAL dari ASI terhadap *L. monocytogenes* FNCC 0156 menunjukkan adanya penghambatan pada isolat A6 dan B8 untuk metode sumur, sedangkan pada

metode kontak hanya isolat A6 yang menunjukkan penurunan jumlah koloni.

3. Aktivitas antimikroba terbesar perlakuan SBS pada metode sumur dan metode kontak ditunjukkan oleh isolat A1 dengan diameter penghambatan sebesar 10,60 mm dan penurunan sebesar 1,66 siklus log. Aktivitas antimikroba tertinggi perlakuan SBSN pada metode sumur dan metode kontak ditunjukkan pada isolat B8 dengan diameter penghambatan sebesar 5,11 mm dan dimana

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disarankan sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik senyawa antimikroba BAL dari ASI yang dihasilkan

hanya mengalami peningkatan 0,18 siklus log pada metode kontak. Aktivitas antimikroba tertinggi perlakuan SBSNP pada metode sumur ditunjukkan isolat A6 yaitu sebesar 0,87 mm dan pada metode kontak ditunjukkan isolat A6 dengan penurunan sebesar 0,48 siklus log.

4. Aktivitas antimikroba bakteriosin tertinggi ditunjukkan oleh isolat A6 dengan rata-rata penghambatan sebesar 5,36 mm dengan waktu inkubasi 36 jam.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk menguji kemampuan isolat BAL dari ASI terhadap mikroba patogen lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amezquita, A. and M. M. Brashears. 2002. Competitive inhibition of listeria monocytogenes in ready to eat meat products by lactic acid bacteria. *Food Protection Journal* 65 (2): 316-325.
- Anonimus.2000. SNI No.01-6366-2000 tentang Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan.Dewan Standarisasi Nasional hlm.1 – 12.
- Anonimus.2006. Yogurt bagian2: Mikrobiologi Susu dan Kultur Starter. *Avaiable from* <http://manglayang.blogsome.com/2006/05/25/serba-serbi-pengolahan-susu-mengenal-yogurt-bagian-2/> [diakses pada tanggal 5 februari 2015]
- Anonimus.2010.*Listeria monocytogenes*.CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL dan PREVENTION). *Avaiable from* www.ksfoodsafety.org. [diakses pada tanggal 5 februari 2015]
- Anonimus. 2015. Bahaya Apel Impor Terkontaminasi Bakteri. *Avaiable from* <http://udoctor.co.id/infeksi--penyakit-menular/bahaya-apel-impor-terkontaminasi-bakteri-read-290.html> [diakses pada tanggal 20 Maret 2015]
- Andini, L.S., Harsojo dan S.H. Rosalina. 1998. Kemampuan Hidup *Listeria monocytogenes* yang diisolasi dari Bahan Pangan Asal Ternak terhadap Iradiasi Gamma.Artikel ilmiah pada Prosceding.Seminar Hasil-hasil Penelitian Veteriner.Bogor, 18 – 19 Februari 1998.hlm. 95 –102.
- Anguirre, M and M. Colins.1993. Lactic Acid Bacteria and Human Clinical Infection.*Journal of Applied Bacteriology* 75: 95-107.
- Ariyanti, T. 2010. Bakteri *Listeria monocytogenes* sebagai Kontaminan Makanan Asal Hewan (*Foodborne Disease*).Wartazoa Vol. 20 No. 2. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiologi. Di dalam: Salminen, S., Wright, A.V., dan Ouwehand, A., editor.Lactic AcidBacteria. Marcel Dekker Inc., New York.
- Buckle, K. A., R. A. Edwards, G. H. Fleet dan M. Wootton. 2007. Ilmu Pangan,

- Terjemahan Hari Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- De Vuyst, L. dan E.J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional, London.
- Ekandari SE. 2009. Kajian tingkat keamanan susu ultra high temperature (UHT) impor terhadap *Listeria monocytogenes*. [terhubung berkala]. Available from <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/5425> [10 Februari 2015].
- Ernawati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Gonzales, B.E., Glaasker, E.R.S. Kunji, A.J.M. Driessen, J.E. Suarez W.N.K. Onings. 1996. Bactericidal Mode of Action of Plantaricin S. Appl Environ Microbiol 62: 2701-2709
- Harrigan, W.F., Mc Chance M.E. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology 3rd edition. Academic Press, Inc., New York.
- Malaka, R., R.N. Yuliati, K.I. Prahesti, E. Murpiningrung. 2014. Isolasi dan Identifikasi *Listeria Monocytogenes* dari Susu Segar di Sulawesi Selatan. Jurusan Produksi Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Hasanuddin
- Muriana, P.M., W. Quimby, C.A. Davidson and J. Grooms. 2002. Postpackage pasteurization of ready-to-eat deli meats by submersion heating for reduction of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 65(6): 963 – 969.
- Juniarthati, P.E. 2011. Skrining Bakteri Asam Laktat Isolat Susu Sapi Bali Penghasil Bakteriosin penghambat Bakteri Patogen *E.coli* Penyebab Diare Akut. Skripsi. Jurusan Farmasi Universitas Udayana.
- Jyoti, B.D., A.K. Suresh, dan Venkatesh, K.V. 2003. Diacetyl Production and Growth of *Lactobacillus rhamnosus* on Multiple Substrate. *World J. Of Micr and Biotech* 19: 509-514.
- Karthikeyan V, Santhosh SW. 2009. Study of bacteriocin as a food preservatif and the *L. acidophilus* strain as probiotic. Pak. J. Nutr., (4): 335-340.
- Lanciotti, R. 2003. Evaluation of Diacetyl Antimicrobial Activity Against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol* 20: 537-543.
- Ouwehand, A. C. dan Vesterland, S. 2004. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. Di dalam: Salminen, S. dan Atte von Wright, editor. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 3th edition. Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang, dan Z. Zhao. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Journal of Food Control* 20 pages 598-602
- Pelczar, M.J., dan E.S.C. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. UI Press, Jakarta.
- Puspawati, N.N. dan K.A. Nociantri. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu (ASI) untuk pengembangan Probiotik Isolat Lokal. Laporan Penelitian Hibah Unggulan Udayana
- Putra, A.A.N.D.P. 2015. Optimasi Waktu Produksi dan Penghambatan Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Air Susu Ibu (ASI) terhadap Mikroba Patogen *Escherichia coli* ATCC 25922.

- Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Udayana. Jimbaran
- Winarno, F.G. 1997. Kimia Pangan dan Gizi. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Rahayu, W.P. 2000. Aktivitas Antimikroba Bumbu Masakan Tradisional Hasil Olahan Industri Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak. *Bul Tekno & Industri Pangan XI* (2): 42-48, ISSN 0216-2318.
- Razali, U. 1987. Mikrobiologi Dasar. Jatinangor: FMIPA UNPAD.
- Rachmawati, I., Suranto, Setyaningsih, R. 2006. Uji Antibakteri Bakteri Asam Laktat Asal Asinan Sawi terhadap Bakteri Patogen. *Bioteknologi*, no. 2, vol. 2, hal. 43-48.
- Rohmawati, I. 2010. Kajian Senyawa Antimikroba Bakteri Asam Laktat Isolat Asi yang Berpotensi sebagai Probiotik. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Rosmawati., 2012, Pengaruh Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Penghambatan *Staphylococcus aureus* Secara *Invitro*, *Jurnal Biology Science and Education*, 63-75.
- Sugiono dan A. Mahenda. 2004. Produk-Produk Teknologi Fermentasi. Artikel. Universitas Brawijaya. Malang
- Sundari, L. S. 2014. Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu (ASI) terhadap Mikroba Patogen *Escherichia coli* ATCC 25922. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Udayana. Jimbaran
- Suraatmaja.(1997). *Aspek gizi ASI*. Jakarta: EGC
- Surono, I.S. 2004. Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan. Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI). TRICK. Jakarta. p 31-32
- Vinanta, P. 2015. Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu (ASI) terhadap Mikroba Patogen *Vibrio cholerae*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Udayana. Jimbaran