

PENGARUH pH, NaCl DAN PEMANASAN TERHADAP STABILITAS ANTIBAKTERI BUNGA KECOMBRANG DAN APLIKASINYA PADA DAGING SAPI GILING

[Effects of pH, NaCl and Teating on the Antibacterial Stability of Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Flower Extracts and Its Aplication in Minced Meat]

Rifda Naufalin¹⁾, Betty Sri Laksmi Jenie²⁾, Feri Kusnandar³⁾
Mirnawati Sudarwanto⁴⁾, dan Herastuti Sri Rukmini⁵⁾

¹⁾ Staf Pengajar Fakultas Pertanian UNSOED, ²⁾ Guru Besar Fakultas Teknologi Pertanian IPB

³⁾ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian IPB, ⁴⁾ Guru Besar Fakultas Kedokteran Hewan IPB

⁵⁾ Guru Besar Fakultas Pertanian UNSOED

Diterima 10 Desember 2006 / Disetujui 14 Mei 2007

ABSTRACT

The effect of pH (4-9), NaCl concentration (1-5%), temperature and heating time (80, 100 and 121°C for 10, 20 and 30 minute) on the antibacterial effectivity of ethyl acetate and ethanol kecombrang extract were analysed. Both ethyl acetate and ethanol extracts showed antibacterial activity at pH 4-8, but its activity gradually decreased at higher pH. At pH 9, only ethanol extract still showed antibacterial activity. Addition of 1-4% NaCl on ethyl acetate and ethanol extract still showed antibacterial activity. Heating the extracts at 80-100 °C for 10-30 minutes and 121°C for 10 minutes did not haves significantly affect on the antibacterial activity of both ethyl acetate and ethanol extracts. Application of ethyl acetate extract at the concentration of 1 and 3 MIC on minced meat were still effective to reduce the viable bacteria until 7 days and 5 MIC was still effective until 9 days.

Key words : Kecombrang, pH, NaCl, temperature and heating time, antibacteria

PENDAHULUAN

Kemampuan senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri diantaranya dipengaruhi oleh tingkat keasaman (pH), suhu, protein, lemak, karbohidrat dan aktivitas air (a_w) medium pertumbuhan bakteri (Nychas & Tassou 2000) serta dipengaruhi oleh konsentrasi garam (Brewer 2000). Beuchat et al., (1994) melaporkan bahwa NaCl pada konsentrasi 5% dapat memberikan efek perlindungan terhadap *Listeria monocytogenes*. Ardiansyah (2003) melaporkan bahwa penambahan NaCl (2-5 %) dalam ekstrak daun beluntas mengakibatkan terjadinya penurunan aktivitas antibakteri. Penambahan garam juga dapat memberikan pengaruh sinergisme terhadap senyawa BHA (*Butylated hydroxy anisole*). Peningkatan konsentrasi garam dari 3% menjadi 7% akan menurunkan jumlah BHA yang dibutuhkan untuk menghambat *Staphylococcus aureus* sebesar dua kali (Stern et al., 1979).

Efektivitas senyawa antibakteri alami pada pH rendah dalam menghambat bakteri telah dilaporkan oleh Ultee et al., (1998) dimana karvakrol lebih efektif menghambat *Bacillus cereus* pada pH 5 sampai 6 dibandingkan pada pH 7. Cepeda (2005) melaporkan bahwa peningkatan pH antara 4 sampai 7 menyebabkan terjadinya penurunan daya hambat ekstrak sereh terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Ewald (1999) melaporkan bahwa aktivitas antibakteri kuersetin dan kaemferol dari golongan flavonoid menurun sebesar 48 dan 68 % dengan adanya pemanasan pada suhu 60°C selama 2 jam.

Penelitian pengujian antibakteri dalam sistem pangan telah dilaporkan misalnya pada susu skim diperlukan konsentrasi 2 MIC (Karatzas et al., 2001), pada sup 50 MIC (Ultee & Smid 2001) dan pada keju lunak 25 – 100 MIC (Mendoza-Yepes et al., 1997). Aplikasi ekstrak bunga kecombrang pada daging giling memerlukan penelitian mengenai konsentrasi yang tepat agar efektif.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh pH, konsentrasi NaCl, suhu dan waktu pemanasan terhadap stabilitas aktivitas antibakteri ekstrak bunga kecombrang dan mengetahui konsentrasi pada ekstrak etil asetat terhadap daya antibakteri pada sistem pangan (daging sapi giling).

METODOLOGI

Kultur bakteri

Bakteri uji meliputi *B. cereus* (FNCC 057) yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, UGM dan *E. coli* (ATCC 25922) dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan SEAFST (*Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology*) Center, IPB.

Persiapan bahan untuk ekstraksi

Bahan bunga kecombrang diseleksi dan diambil helaian bunganya. Bahan hasil seleksi dibersihkan dengan air, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga kadar air 8-10% (selama \pm 20 jam). Selanjutnya helaian kering digiling sampai diperoleh bubuk yang homogen.

Ekstraksi dengan pelarut organik (Houghton & Raman 1998)

Ekstraksi dilakukan secara bertahap dengan menggunakan pelarut heksana, etil asetat dan etanol. Mula-mula bubuk bunga kecombrang diekstrak dua kali dengan heksana (1:4 b/v). Residu heksana diekstrak dua kali dengan etil asetat (1:4 b/v) dan selanjutnya residu etil asetat diekstraksi dua kali dengan etanol (1:4 b/v). Proses ekstraksi dilakukan secara maserasi pada suhu 37°C, dengan kecepatan rotasi 150 rpm selama 24 jam. Tiap-tiap filtrat dipisahkan dari pelarut dengan cara penguapan dalam rotavapor sampai pelarut tidak menetes lagi. Pelarut pertama diuapkan pada suhu 40°C, sedangkan pelarut kedua dan ketiga diuapkan pada suhu 50°C. Sisa pelarut dihilangkan dengan gas nitrogen. Untuk selanjutnya ekstrak etil asetat dan etanol diambil sebanyak 30 mg/ml untuk dianalisis aktivitas antibakterinya pada berbagai kondisi percobaan.

Stabilitas aktivitas antibakteri ekstrak bunga kecombrang pada berbagai pH, konsentrasi NaCl dan pemanasan (modifikasi Carson & Riley 1995)

Ekstrak etil asetat dan etanol bunga kecombrang dilarutkan dalam larutan buffer fosfat dengan pH awal 7,3, selanjutnya nilai pH ditepatkan pada pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 menggunakan HCl dan NaOH 0,1 N. Larutan bufer fosfat disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan dan ekstrak dengan berbagai pH diuji daya antibakterinya.

Pengaruh NaCl terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dan etanol dilakukan pada konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4 dan 5%. Larutan garam tersebut disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai medium untuk melarutkan ekstrak.

Pengaruh suhu dan waktu pemanasan diamati dengan memanaskan medium yang mengandung ekstrak pada suhu 80, 100 dan 121°C selama 10, 20 dan 30 menit.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak bunga kecombrang

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak pada kondisi berbagai percobaan dilakukan menggunakan metode difusi sumur (modifikasi Carson & Riley 1995).

Daya antibakteri ekstrak bunga kecombrang pada medium daging giling

Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antibakteri lebih baik dari ekstrak etanol, oleh karena itu pengujian

dalam daging giling menggunakan ekstrak etil asetat dengan konsentrasi sebesar 1, 3 dan 5 MIC dibandingkan dengan kontrol. Pengujian ekstrak bunga kecombrang pada daging giling dilakukan dengan cara menambahkan ekstrak dengan konsentrasi 0, 1, 3 dan 5 MIC pada 10 gram daging giling. Nilai MIC ekstrak bunga kecombrang yang digunakan adalah nilai MIC terendah terhadap bakteri uji yaitu 3 mg/ml. Selanjutnya dikemas dalam kantong plastik steril dan disimpan dalam lemari es. Analisis *Total plate count* dilakukan pada 0, 1, 3, 5, 7 dan 9 hari. Penghambatan pertumbuhan mikroba dihitung dari log CFU/g kontrol – log CFU/g perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH terhadap stabilitas aktivitas antibakteri ekstrak bunga kecombrang

Data hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas antibakteri terdapat pada Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak etil asetat bunga kecombrang terhadap bakteri uji dipengaruhi oleh pH. Pengaruh pH terhadap efektivitas ekstrak etil asetat bunga kecombrang terhadap *E. coli* dan *B. cereus* aktivitasnya terlihat meningkat pada pH 5-7, namun pada pH 8 dan 9 ekstrak etil asetat tidak memberikan penghambatan pada bakteri uji.

Kemampuan ekstrak etil asetat bunga kecombrang sebagai antibakteri lebih aktif pada pH rendah, diduga terjadi sinergisme antara komponen antibakteri dengan komponen pengatur keasaman. Substitusi antara bagian komponen antibakteri dengan asam klorida sebagai halogen menyebabkan kerusakan membran sel lebih efektif. Hal ini disebabkan karena adanya ion Cl yang mengharuskan sel mengeluarkan energi ekstra (Shelef & Seiter 1993)

Kemungkinan lain, mekanisme penghambatan pada pH rendah disebabkan pada kondisi tersebut sel mempertahankan pH konstan di dalam sel. Jika pH diturunkan maka proton yang terdapat dalam jumlah tinggi dalam medium akan masuk ke dalam sitoplasma sel. Proton (ion H⁺) dari asam masuk dalam sel melalui gradien proton trans membran (Ray 2001). Hal ini menyebabkan pH sitoplasma menurun. Penurunan pH sitoplasma menyebabkan enzim-enzim akan bekerja untuk mengembalikan pH internal sel menjadi pH normal (Booth 1985). Proton ini harus dikeluarkan untuk mencegah terjadinya pengasaman dan denaturasi komponen-komponen sel. Aktivitas mengembalikan pH internal sel menjadi pH normal menggunakan banyak energi. Bila energi yang dibutuhkan dalam jumlah tinggi, akan mengganggu metabolisme sel, sehingga lama kelamaan sel akan mengalami kematian (Fardiaz 1992).

Pada ekstrak etanol bunga kecombrang (Gambar 2) aktivitas antibakteri secara umum tetap stabil pada pH 4-7. Pada pH basa (8-9), aktivitas antibakteri menurun, tetapi masih menunjukkan penghambatan. Hal ini didukung oleh Campo et al., (2000) yang menyatakan

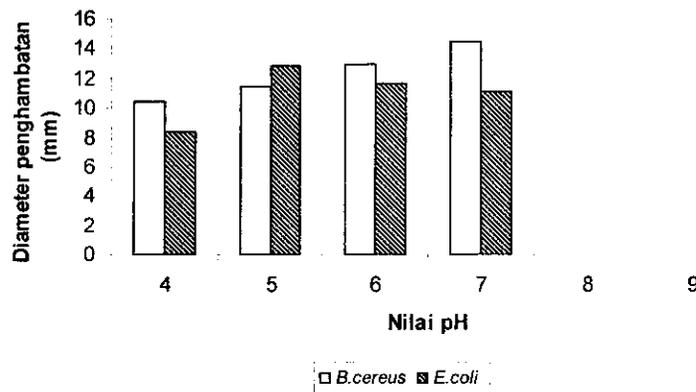
bahwa aktivitas antimikroba *rosemary* meningkat dengan menurunnya pH karena sel-sel yang mengalami stres pada pH rendah akan lebih sensitif terhadap ekstrak *rosemary*. Pengaruh pH dan minyak atsiri rempah-rempah juga telah dibuktikan dimana pada pH rendah diperoleh daya antibakteri terbesar (Nychas & Tassou 2000).

Berdasarkan analisis komponen terhadap ekstrak etanol bunga kecombrang, senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut adalah fenolik, triterpenoid, alkaloid, flavonoid dan glikosida. Dilaporkan pula bahwa kelopak bunga kecombrang mengandung senyawa fenolik yang tersusun dari gugus fenol (Tampubolon et al., 1983) sebesar 71,7 ppm (Kardono & Dewi 1998). Senyawa fenolik yang terdapat dalam ekstrak tanaman semakin efektif pada pH rendah. Struktur gugus hidroksil senyawa fenolik memegang peranan penting dalam aktivitas antibakteri dimana pada pH rendah terjadi reaksi alkilasi dan hidroksilasi sehingga akan meningkatkan distribusi gugus fenol pada fase air dan fase lipid pada membran sel bakteri (Dorman & Deans 2000; Puupponen-Pimia 2001).

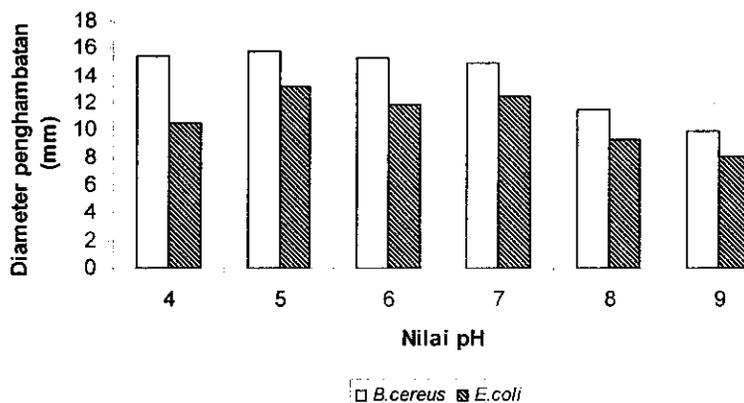
Pengaruh garam NaCl terhadap aktivitas antibakteri ekstrak bunga kecombrang

Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga kecombrang dalam berbagai konsentrasi garam NaCl (1-5%) disajikan pada Gambar 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi NaCl pada ekstrak etil asetat berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri pada *B. cereus* dan *E. coli*. Penambahan NaCl 4-5% pada ekstrak akan menyebabkan aktivitas antibakteri lebih tinggi di banding pada konsentrasi 1-3%. Hal ini disebabkan karena NaCl sendiri dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan menurunkan aktivitas air, merusak membran sel dan menyebabkan osmolisis (Brewer, 2000).

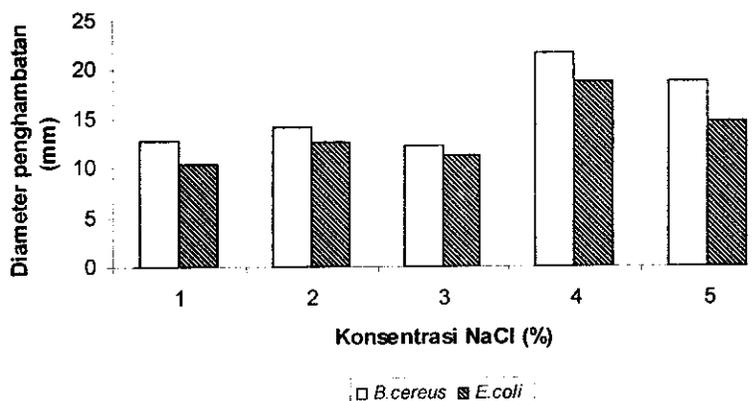
Peningkatan aktivitas antibakteri beberapa senyawa antimikroba bila digunakan bersama-sama dengan NaCl telah dibuktikan oleh Campo et al., (2000) yang melaporkan bahwa sel bakteri yang mengalami stres dengan konsentrasi NaCl 10% akan lebih sensitif terhadap ekstrak *rosemary*. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh Stern et al., (1979) bahwa pemberian NaCl dari 3% menjadi 7% akan menurunkan jumlah BHA yang diperlukan untuk menghambat *Staphylococcus aureus* sebesar dua kali.



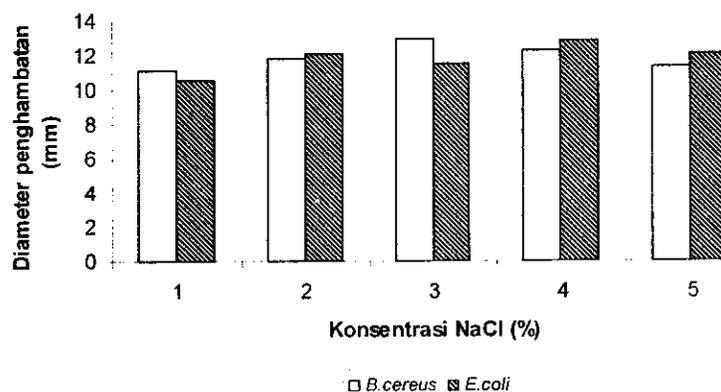
Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga kecombrang



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol bunga kecombrang



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga kecombrang



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol bunga kecombrang

Pengaruh NaCl terhadap ekstrak etanol bunga kecombrang menunjukkan bahwa NaCl 1-5 % merupakan konsentrasi yang dapat memberikan efek antibakteri pada bakteri uji. Hal ini sesuai dengan penelitian Glass et al., (1992) dimana *E. coli* 0157:H7 dilaporkan mampu tumbuh pada konsentrasi garam 6,5% dan menurut McClure dan Hall (2000), *E. coli* dapat bertahan hidup selama 60 hari pada kombinasi NaCl 12% dan asam laktat 0,2%.

Stabilitas ekstrak bunga kecombrang terhadap pemanasan

Pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga kecombrang dapat dilihat pada Tabel 1. Ekstrak etil asetat bunga kecombrang setelah pemanasan masih menunjukkan aktivitas terhadap *B. cereus*, dan *E. coli*. Hal ini menunjukkan kestabilan ekstrak etil asetat terhadap pemanasan pada suhu 80 dan 100°C selama 10, 20 dan 30 menit dan 121°C selama 10 menit, namun pada suhu 121°C selama 20 dan 30 menit sudah tidak menunjukkan aktivitas antibakteri (data tidak ditampilkan).

Tabel 1. Pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat bunga kecombrang

Jenis bakteri	Diameter penghambatan (mm) pada pemanasan (°C/menit)						
	80/10	80/20	80/30	100/10	100/20	100/30	121/10
<i>B. cereus</i>	17,65	18,35	14,75	14,65	14,82	19,50	16,58
<i>E. coli</i>	15,10	16,25	12,70	12,33	13,80	13,07	12,33

Tabel 2. Pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol bunga kecombrang

Jenis bakteri	Diameter penghambatan (mm) pada pemanasan (°C/menit)						
	80/10	80/20	80/30	100/10	100/20	100/30	121/10
<i>B. cereus</i>	15,37	18,47	17,57	16,70	18,93	16,67	13,88
<i>E. coli</i>	13,10	17,72	20,77	17,15	17,30	15,18	12,33

Pada Tabel 2 terlihat bahwa ekstrak etanol bunga kecombrang juga masih menunjukkan adanya aktivitasnya setelah pemanasan 80°C dan 100°C selama 10, 20 dan 30 menit dan 121°C selama 10 menit. Pada bakteri uji *B. cereus* dan *E. coli* aktivitas ekstrak semakin menurun dengan semakin meningkatnya suhu dan waktu pemanasan. Hal ini sesuai dengan laporan penelitian Ewald et al., (1999) dimana pemanasan kuersetin dan kaempferol dari golongan flavonoid pada suhu 60°C selama 2 jam akan menurunkan aktivitas sebanyak 48 dan 68 %.

Ekstrak bunga kecombrang setelah pemanasan 121°C selama 10 menit masih menunjukkan aktivitas antibakteri, hal ini berarti ekstrak bunga kecombrang stabil pada pemanasan. Hurst dan Hoover (1993) melaporkan bahwa antibakteri nisin tidak kehilangan aktivitasnya setelah pemanasan dengan otoklaf pada suhu 121°C. Nisin ditambahkan sebagai pengawet pada produk kaleng, karena nisin dapat menginaktivkan spora bakteri, dengan merusak protein spora.

Aplikasi antibakteri ekstrak etil asetat bunga kecombrang dalam daging giling

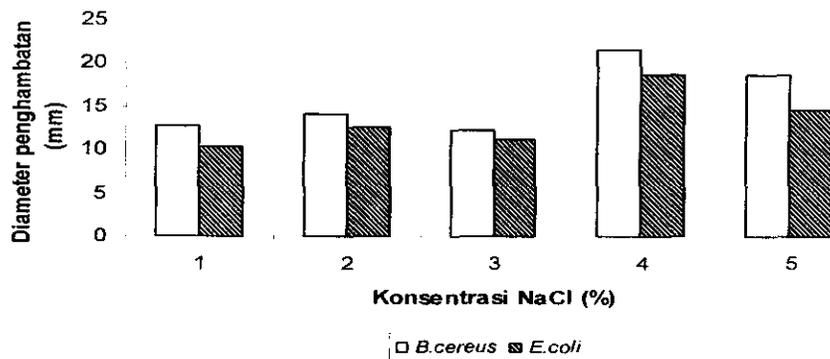
Daging giling dipilih sebagai contoh sistem pangan. Nilai MIC yang dipergunakan adalah 3 mg/mg daging giling yang merupakan nilai MIC terendah dari ekstrak etil asetat bunga kecombrang (Naufalin et al., 2005). Penghambatan pertumbuhan mikroba (log CFU/g) disajikan pada (Gambar 5). Daging sapi segar banyak mengandung komponen nutrisi yang diperlukan oleh bakteri untuk pertumbuhan, sehingga bakteri akan tumbuh baik di dalam daging segar dibandingkan dengan apabila tumbuh dalam media agar saja. Oleh sebab itu diperlukan ekstrak bunga kecombrang dengan konsentrasi lebih tinggi agar dapat dipergunakan sebagai bahan antimikroba atau pengawet.

Pada daging sapi segar sebagai kontrol (tanpa penambahan ekstrak) diperoleh jumlah total mikroba awal sebesar 6×10^5 cfu/g. Standar daging sapi giling adalah jumlah total mikroba tidak lebih dari $5,0 \times 10^6$ cfu/g (Schaich dan Beck 2000).

Penambahan konsentrasi 1 MIC ekstrak etil asetat ke dalam daging giling setelah penyimpanan selama 1 hari menyebabkan penurunan jumlah koloni bakteri sebesar 1,27 log CFU/g, sedangkan pada penyimpanan 3, 5 dan 7 hari terjadi penurunan sebesar 1,56 - 1,68 log CFU/g namun setelah penyimpanan 9 hari hanya terjadi penurunan sebesar 0,75 log CFU/g (Gambar 5). Sedangkan pada kontrol jumlah mikroba sudah meningkat (1,72 log CFU/g) pada hari ke 1.

Penambahan konsentrasi 3 MIC ekstrak etil asetat ke dalam daging giling dapat menghambat pertumbuhan mikroba mulai hari ke 1, 3, 5 dan 7 dengan penurunan jumlah koloni bakteri berkisar antara 1,32 - 1,78 log CFU/g, namun setelah penyimpanan 9 hari hanya mengalami penurunan sebesar 0,68 log CFU/g. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi 1 dan 3 MIC ekstrak etil asetat ke dalam daging giling dapat menghambat pertumbuhan mikroba sampai penyimpanan 7 hari.

Penambahan konsentrasi 5 MIC ekstrak etil asetat ke dalam daging setelah penyimpanan selama 1 hari mengalami penurunan jumlah koloni bakteri sebesar 1,87 log CFU/g, setelah penyimpanan dilanjutkan sampai hari ke 3, 5 dan 7 hari terjadi penurunan berkisar antara 2,14 - 2,25 log CFU/g. Pada penyimpanan 9 hari mengalami penurunan sebesar 1,65 log CFU/g. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi 5 MIC ekstrak etil asetat dapat menghambat pertumbuhan mikroba sampai penyimpanan 9 hari.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi ekstrak etil asetat pada berbagai MIC terhadap penurunan total mikroba (log cfu/g) pada daging giling yang disimpan sampai hari ke-9

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Aktivitas antibakteri ekstrak etil dan etanol asetat bunga kecombrang dipengaruhi oleh pH, NaCl dan pemanasan. Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dan etanol bunga kecombrang pada pH asam (4) lebih besar dibanding pH basa (8-9). Penambahan NaCl sampai 4-5 % pada ekstrak etil asetat akan menunjukkan aktivitas antibakteri lebih tinggi dibanding konsentrasi ekstrak 1-3%. Ekstrak etil asetat dan etanol bunga kecombrang masih menunjukkan aktivitas antibakteri setelah pemanasan pada suhu 80 dan 100 selama 10, 20, 30 menit dan 121°C selama 10 menit. Penambahan ekstrak etil asetat 5 MIC dapat menghambat pertumbuhan mikroba pada daging giling yang disimpan pada suhu refrigerasi sampai dengan 9 hari yaitu menurunkan jumlah mikroba 1,65 log CFU/g.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi ekstrak bunga kecombrang pada bahan pangan mentah dan olahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah, Nuraida L, Andarwulan N. 2003.** Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Beluntas (*Plucea indica* L) dan Stabilitas Aktivitasnya Pada Berbagai Konsentrasi Garam dan Tingkat pH. *J Teknol dan Industri Pangan* XIV:2 (90-97).
- Bauchat LR, Brackett RE, Doyle MP. 1994.** Lethality of Carrot Juice to *Listeria monocytogenes* as Affected by pH, Sodium Chloride and Temperature. *J Food Protect* 57(6):470-474.
- Booth IR. 1985.** Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiol Rev* 49:359-378.
- Brewer MS. 2000.** *Traditional Preservatives – Sodium Chloride.* In : Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology.* volume 1. London : Academic Press.
- Campo JD, Amiot MJ, Nguyen-The C. 2000.** Antimicrobial Effect of Rosemary Extracts. *J Food prot* 63:1359-1368.
- Carson CF, Riley TV. 1995.** Antimicrobial Activity of the Major Components of The Essential Oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 264-269.
- Cepeda GN. 2005.** Aktivitas Ekstrak Etanol Sereh (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) terhadap Pertumbuhan dan Produksi Verotoksin oleh *Escherichia coli* Verotoksigenik [Thesis]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000.** Antimicrobial Agents From Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile oils. *J App Microbiol* 88:308-316.
- Ewald C. et al. 1999.** Effects of Processing on Major Flavonoids in Processed Onion, Green Beans and Peas. *Food Chem* 64: 231-235.
- Fardiaz S. 1992.** *Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut.* PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP. 1992.** Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as Affected by pH or Sodium Chloride and in Fermented, Dry Sausage. *Appl Environ Microbiol* 58:2513-2516.
- Houghton PJ, Raman. 1998.** *Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extract.* Chapman & Hall. London.
- Hust A, Hoover DG. 1993.** Nisin. Di dalam Davidson PM, Branen (Ed.). *Antimicrobials in Foods.* 2nd Ed. Marcel Dekker. New York.
- Karatzas AK, Kets EPW, Smid EJ, Bennik MHJ. 2001.** The Combined Action of Carvacrol and High Hydrostatic Pressure on *Listeria Monocytogenes* Scott A. *J Appl Microbiol* 89:296-301.
- Kardono BS, Dewi RT. 1998.** Kandungan Antioksidan dan Senyawa Fenolik dalam Rempah-rempah Endemik. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi.* Puslitbang Kimia Terapan LIPI, Serpong.
- McClure PJ, Hall S. 2000.** Survival of *Escherichia coli* in foods. *Appl Microbiol Sym Supplement* 88:61-70.
- Mendoza-Yepes MJ, Sanchez-Hidalgo LE, Maertens G, marin-Iniesta F. 1997.** Inhibition of *Listeria Monocytogenes* and Other Bacteria by Plant Essential Oil (DMC) en Spanish soft cheese. *J Food Safety* 17:47-55.
- Nychas GJE, Tassou CC. 2000.** *Traditional Preservatives-Oils and Spices.* Di dalam Robinson, R.K., C.A. Batt, P.D. Patel. Ed. *Encyclopedia of food.*
- Puupponen-Pimia R et al., 2001.** Antimicrobial Properties of Phenolic Compound from Berries. *J Appl Microbiol* 90:494-507.
- Ray B. 2001.** *Fundamental food microbiology.* Ed ke 2. New York: CRC Press.
- Schalch B, Beck H, 2000.** European Union. Di dalam: Robinson RK, Batt CA, Patel PD. editorial. *Encyclopedia of Food Microbiology* Volume 1. Academic Press London.
- Shelef LA, Seiter JA. 1993.** Indirect antimicrobial. Di dalam Davidson PM, Branen (Ed.).

- Antimicrobials in Foods. 2nd Ed. Marcel Dekker. New York.
- Stern NJ, Smoot LA, Pierson MD. 1979.** Inhibition of *Staphylococcus Aureus* Growth by Combinations of Butylated hydroxyanisole, Sodium Chloride and pH. *J Food Sci* 44:710-712.
- Tampubolon OT, Suhatsyah S, Sastrapradja S. 1983.** Penelitian Pendahuluan Kimia Kecambah (*Nicolaia speciosa* Horan). *Risalah* *Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III.* Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- Ultee A, Gorris LGM, Smid EJ. 1998.** Bacterial Activity of Carvacrol Towards the Foodborne Pathogen *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 85:211-216.
- Ultee A, Smid EJ. 2001.** Influence of Carvacrol on Growth and Toxin Production by *Bacillus cereus*. *Intern J Food Microbiol* 64:373-378.