

PROFIL BIOAUTOGRAM BAKTERIOSIN DALAM SEDIAAN SUSU PROBIOTIK

ISNAENI*, A. TOTO POERNOMO, FLORIANA NATALY

Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

ABSTRACT

Probiotic milk is a milk that contain probiotic bacteria. Probiotics is life microbial feed supplement; which beneficially affect the host animal by improving its intestinal microbial balance. The probiotic bacteria produce antimicrobial substances; that can inhibit the growth of pathogenic bacteria, that called bacteriocin. One of the bacteriosin is nisin, which exhibit antimicrobial activity against a wide range of Gram positive bacteria, and is particularly affective against bacterial spores. Seven from twenty probiotic milk samples contained in the marketplace, have been extracted to precipitate the bacteriocin. The extracts were then analyzed by using TLC-bioautography methods with n-butanol, acetat acid, water (4:1:1) and Staphylococcus aureus ATCC 25923 as pathogenic bacteria. Of inhibition zone diameter obtained, can be known whether in the same concentration, samples of probiotic milk have different antibacterial activity. There are different profile bioautogram from extracted samples of probiotic milk. Three from seven extracted samples have the same rf, but none of that extracted samples have the same rf with nisin. All of extracted sample have microbial activity but smaller than nisin activity to against Staphylococcus aureus ATCC 25923 bacteria.

Keywords : probiotic milk, bioautography, bacteriocin, nisin, Staphylococcus aureus.

PENDAHULUAN

Dalam kehidupan sehari-hari, susu probiotik dapat ditemukan dengan makanan sederhana yang dibuat dengan bantuan bakteri. Probiotik ditambahkan, karena bakteri ini dapat memecah struktur dasar makanan. Selain itu, bakteri probiotik ditambahkan untuk menjaga kualitas makanan dari pembusukan akibat mikroorganisme lainnya, seperti bakteri patogen yang terkandung dalam makanan. Menurut Fuller (1992), probiotik adalah bakteri hidup yang menguntungkan “host” dengan meningkatkan keseimbangan mikrobiota dalam saluran usus inang.

Bakteri probiotik termasuk bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai hasil utamanya, terutama genus *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. helveticus*), genus *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*, *B. bifidus*, *B. lactis*, *B. substilis*, *B. infantis*), dan *Streptococcus thermophilus* (Isolauri et al., 2002).

Probiotik menghasilkan komponen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, yang disebut bakteriosin. Bakteriosin adalah salah satu zat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang tahan terhadap panas dan tidak mempengaruhi produksi bakteri. Komponen bakteriosin umumnya memiliki sifat: non toksik, memiliki stabilitas tinggi selama penyimpanan, tidak mengubah rasa, dan memiliki spektrum kecil

aktivitas mikroorganisme. Bakteriosin dapat bersifat sebagai bakteriosidal atau bakteriostatik. Bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat salah satunya memiliki kemampuan mengontrol pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen pangan. Saat ini penggunaan antibiotika yang terlalu berlebihan, menyebabkan banyaknya bakteri yang menjadi resisten. Oleh karena itu, saat ini bakteriosin dikembangkan sebagai alternatif antimikroba untuk mengurangi resistensi bakteri.

Bakteriosin yang paling populer yang dihasilkan oleh berbagai bakteri probiotik adalah Nisin, yang diproduksi oleh bakteri asam laktat dan memiliki aktivitas spektrum yang luas terhadap bakteri Gram positif. Nisin dapat mempengaruhi membran luar bakteri Gram negatif jika kerusakan subletal (Luciana, 2009). Probiotik ditambahkan ke sediaan susu probiotik dalam bentuk monokultur dan multikultur, sehingga akan ada perbedaan bacteriogram di setiap susu probiotik.

Bioautografi merupakan teknik laboratorium untuk mendeteksi senyawa yang mempengaruhi laju pertumbuhan organisme uji dalam matrik (campuran dan kompleks). Metode tersebut didasarkan pada aktivitas biologi analit, yang dapat berupa antibakteri, antifungi, antitumor, antiprotozoa, dll. (Choma, 2005). Dari kromatogram KLT dapat diketahui jumlah komponen dalam sampel yang ditotolkan berdasarkan jumlah noda (dengan penampak noda

yang sesuai), sedang data bioautogram memberikan informasi jumlah komponen sampel yang memiliki aktivitas terhadap mikroba uji baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Isnaeni, 2005).

Prinsip bioautografi menggunakan metode difusi, besarnya daya hambat pertumbuhan bakteri pada metode difusi diperoleh dengan mengukur diameter zona hambat (Choma, 2005). Salah satu keuntungan metode bioautografi adalah selain untuk pemisahan dan identifikasi, juga dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologis matrik yang kompleks secara langsung, terutama terkait dengan kemampuan suatu senyawa menghambat pertumbuhan mikroba (Rahalison et al., 1994). Cara kerja bioautografi efisien dan efektif untuk determinasi antibiotik, serta relatif murah dan mudah. Metode bioautografi menggunakan teknik KLT, sehingga sensitivitas metode tersebut lebih rendah dibandingkan metode kromatografi yang lain, dan memerlukan jumlah senyawa yang lebih banyak dalam analisis.

Dengan mempertimbangkan uraian di atas, maka dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri bakteriosin dalam sediaan susu probiotik menggunakan metode bioautografi sebagai metode terpilih untuk mengetahui profil bioautogramnya. Kadar bakteriosin ditetapkan sebagai nisin, karena nisin adalah salah satu bakteriosin yang banyak dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Sebagai susu probiotik, dipilih sediaan susu probiotik. Diambil sediaan susu probiotik dengan 15 merek yang berbeda yang beredar di pasaran, yang kemudian digunakan sebagai sampel. Bakteri patogen yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yang termasuk dalam golongan Gram positif dan termasuk salah satu bakteri patogen yang tidak boleh ada dalam sediaan makanan. Dari diameter zona hambat yang diperoleh, dapat diketahui apakah dalam konsentrasi yang sama, sampel-sampel susu probiotik tersebut memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda. Dari kromatogram dan bioautogram dapat diketahui apakah sampel tersebut mengandung lebih dari satu jenis bakteriosin. Hasil penelitian ini selanjutnya dianalisa untuk memperoleh profil bioautogram.

METODE PENELITIAN

Bahan:

Bakteri : Yoghurt, bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, agar, media Nutrient Broth (Difco), larutan salin steril, air suling

Bahan Kimia : Standar nisin (Sigma) , larutan HCl 0,02M, asam trikloroasetat, buffer Tris HCl, fenol, etanol, asam asetat.

Alat:

Neraca analitik (Sartorius), bejana kromatografi, cawan petri diameter 15 cm, vortex, kawat Ose, lempeng kromatografi lapis tipis Silica Gel F254, incubator (Mettler), microlyter syringe, pipet mikro, jangka sorong (Tricle brand), otoklaf (Huxley HV-340 Speedy), spektrofotometer (Shimadzu), micro balance (Shimadzu), pipa kapiler 10 uL.

Metode Kerja:

1. Preparasi Media Nutrient Agar

Media Nutrient Agar 100 mL dibuat dengan cara mencampurkan 3 gram serat agar dengan serbuk nutrient broth 0,8 gram, ditambah air suling 100 mL dalam gelas beker, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga campuran larut dan homogen. Media yang masih cair tersebut segera diambil dengan spuit dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing masing sebanyak 8 mL dan 12 mL. Tabung yang berisi media tersebut ditutup dengan kapas bebas lemak, kemudian disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Segera setelah dikeluarkan dari otoklaf, media 12 ml yang masih cair dimiringkan hingga padat. Media tersebut digunakan sebagai media peremajaan mikroba uji, sedangkan media 8 mL disimpan dan dibiarkan memadat, sebagai stok media untuk uji bioautografi. Jika akan digunakan untuk uji bioautografi, media tersebut dipanaskan terlebih dahulu hingga cair. Media uji bioautografi dibuat dua lapis, masing masing lapis sebanyak 12 mL untuk base layer dan 8 mL untuk seed layer .

2. Penyiapan Bakteri Uji

Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari kultur persediaan diambil dengan sengkeli sebanyak satu ose, kemudian dioleskan pada permukaan agar miring dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah terjadi

pertumbuhan, dibuat suspensi bakteri dengan menambahkan 10 mL larutan salin steril pada biakan agar miring, kemudian suspensi dikocok sampai homogen menggunakan vortex. Kekeruhan yang menunjukkan jumlah bakteri diatur dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm sampai diperoleh transmittan 25%, bila perlu dilakukan pengenceran (Depkes, 1995). Larutan inokulan diambil sebanyak 5 uL kemudian ditambahkan ke dalam NA cair sebanyak 8 mL. Dituangkan ke atas cawan petri sebagai seed layer layer. Biarkan membeku (Putri, 2009).

3. Penapisan daya anti antibakteri nisin

Sebanyak 20 sampel susu probiotik yang terdapat di pasaran, masing-masing diambil sebanyak 50 uL kedalam sumuran agar yang telah dibuat pada media Nutrient Agar mengandung bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diamati diameter zona hambat yang terbentuk untuk menunjukkan sifat antibakteri dari sampel.

4. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Nisin

Ditimbang dengan teliti nisin sebanyak 50,0 mg kemudian dibuat larutan standart nisin pH 3,0 dalam larutan HCl 0,2N sampai 10 mL. Dilakukan pengenceran untuk membuat larutan standar nisin dengan konsentrasi 5000 ppm sampai dengan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan sebanyak 10 µL lalu diletakan pada cawan petri berisi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kemudian disimpan di dalam lemari pendingin selama dua jam. Cawan petri dikeluarkan dari lemari es, lempeng KLT diangkat dari permukaan agar, biakan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

5. Ekstraksi bakteriosin

Sample susu probiotik yang terdapat di pasaran, diambil 10,0 mL lalu ditambah tetes demi tetes asam triklorasetat (TCA) sampai jenuh, lalu disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit. Filtrat dan endapan dipisahkan dengan cara dekantasi. Endapan lalu dilarutkan dalam buffer Tris HCl. Selanjutnya larutan dianalisis (Reunanen, 2007).

6. Kromatografi Lapis Tipis

Tujuan dilakukan Kromatografi Lapis Tipis ini adalah untuk mengetahui bakteriosin yang terkandung di dalam sediaan. Analisis KLT dilakukan dengan cara menotolkan sediaan yang diuji dan standart bakteriosin sebanyak 10 ul dengan pipet mikro pada lempeng KLT ukuran 20 cm x 10 cm, kemudian dieluasi dengan fase gerak polar. Masing-masing dilakukan replikasi 3 kali.

Lempeng hasil eluasi dikeringkan di udara dan diamati dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Dipilih fase gerak hasil optimasi yang dapat memisahkan nisin dengan sempurna dan tidak ada tailing, yaitu fenol-etanol-asam asetat (Crandall, 1998). Noda yang tampak diberi tanda. Dihitung harga Rf masing-masing dan dibandingkan satu sama lain.

7. Uji Bioautografi

Bioautogram dibuat dengan cara meletakan hasil KLT (yang telah dikeringkan dengan aliran udara panas dalam cawan petri steril untuk menghilangkan sisa fase gerak) di atas permukaan media agar perbenihan dalam cawan petri yang berisi media Nutrient Agar mengandung bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kemudian disimpan di dalam lemari es selama dua jam agar proses difusi dalam noda kromatogram ke dalam media sempurna. Cawan petri dikeluarkan dari lemari es, lempeng KLT diangkat dari permukaan agar, biakan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan dan pengukuran zona jernih yang menunjukkan lokasi penghambatan bakteri oleh bakteriosin (Choma, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pembuatan sediaan probiotik susu, bakteri probiotik ditambahkan untuk mengubah struktur dasar susu sehingga menjadi lebih padat, meningkatkan keasaman sehingga mengubah rasa, serta menjaga kualitas susu dari pembusukan karena bakteri patogen. Bakteri probiotik bekerja dengan menekan pertumbuhan bakteri patogen yang dapat menghambat proses penghancuran makanan. Bakteri probiotik menghasilkan zat yang disebut bakteriosin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil bakteriosin bioautogram dalam susu probiotik. Sehingga dapat diketahui berapa jumlah komponen

zat yang terkandung dalam probiotik susu dan seberapa jauh sifat antibakteri setiap komponen. Metode bioautografi dipilih, karena metode ini menghasilkan kromatogram dan bioautogram. Dari kromatogram dapat dilihat jumlah komponen yang terkandung dalam masing-masing sampel. Dari hasil bioautogram bisa tahu mana komponen memiliki aktivitas antibakteri dan bagaimana kegiatan antibakteri yang kuat bila dibandingkan dengan standar. Juga bioautografi memiliki cara yang relatif mudah pengerjaan dan biaya yang diperlukan lebih murah, sehingga metode ini lebih dibandingkan dengan metode lain seperti HPTLC dan TLC.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 digunakan, karena merupakan bakteriosin yang menunjukkan

aktivitas antibakteri, terutama pada bakteri Gram-negatif, dan juga karena itu adalah salah satu syarat dari bakteri patogen tidak boleh terkandung dalam makanan.

20 sampel susu probiotik dikumpulkan dari 2 supermarket besar di Surabaya, selanjutnya dilakukan karakterisasi bentuk, warna, bau, rasa, pengawet dan bakteri probiotik ditambahkan. Dalam penelitian selanjutnya digunakan standar nisin, karena Nisin adalah bakteriosin yang dihasilkan oleh sebagian besar bakteri asam laktat, terutama banyak bakteri *Lactobacillus* ditambahkan ke susu persiapan probiotik.

Tabel 1. Karakteristik sampel susu probiotik yang beredar di pasaran

Sampel	Parameter					
	Bentuk	Warna	Bau	Rasa	Pengawet	Mikroba
1	Cair	Putih	Aroma lecy	Asam	-	<i>Lactobacillus delbrueckii / bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>
2	Cair	Pink	Aroma jambu	Asam,	-	<i>Lactobacillus delbrueckii / bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>
3	Cair	Putih kuning	Aroma susu	Asam	-	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium</i>
4	Cair	Kuning muda	Aroma jeruk	Manis	-	<i>Lactobacillus lactis, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>
5	Cair	Kuning muda	Aroma peach	Manis	-	<i>Lactobacillus lactis, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>
6	Cair	Putih	Seperti susu	Asam	-	<i>Bifidobacterium BB-12, Lactobacillus LA-5</i>
7	Cair	Putih	Seperti susu	Manis	-	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria</i>
8	Cair	Putih	Seperti susu	Asam,	-	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria</i>
9	Cream	Putih	Seperti susu	Asam	-	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria</i>
10	Cair	Putih	-	Manis	-	<i>Lactobacillus</i>

11	Cream	Pink	Seperti susu	Asam	-	<i>Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus</i>
12	Cream	Putih	-	-	-	-
13	Cream	Pink	-	Asam,	-	-
14	Cream	Ungu muda	Asam	Asam	-	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidus</i>
15	Cream	Pink muda	Seperti susu	Asam	-	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium, Streptococcus thermophilus</i>
16	Cream	Ungu muda	Seperti susu	Asam	Kalium sorbat	<i>Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>
17	Cair	Kuning muda	-	Asam	-	<i>Lactobacillus bulgaricus, Bifidobacterium, Lactobacillus casei</i>
18	Cair	Orange muda	Aroma jeruk	Asam	-	<i>Lactobacillus bulgaricus, Bifidobacterium, Lactobacillus casei</i>
19	Cair	Kuning muda	-	Asam	-	<i>Lactobacillus casei shirota</i>
20	Cair	Kuning muda	-	Asam	-	<i>Lactobacillus casei shirota</i>

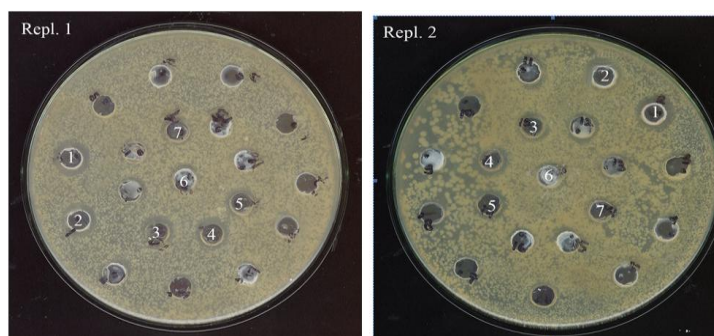
Telah diketahui bahwa bakteri probiotik yang ditambahkan adalah *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus*

acidophilus, *Lactobacillus casei*, dan *Streptococcus thermophilus*. Sementara bakteri probiotik yang jarang ditambahkan adalah *Lactobacillus casei*

Tabel 2 Data zona hambat anti bakteri dari berbagai sampel susu probiotik yang beredar di pasar

Sampel	Zona Hambat	
	Replikasi I	Replikasi II
1	+	+
2	+	+
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	+	+
15	-	-

16	-	-
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+



Gambar 1. Penapisan Sifat Antibakteri Susu Probiotik yang beredar di pasar

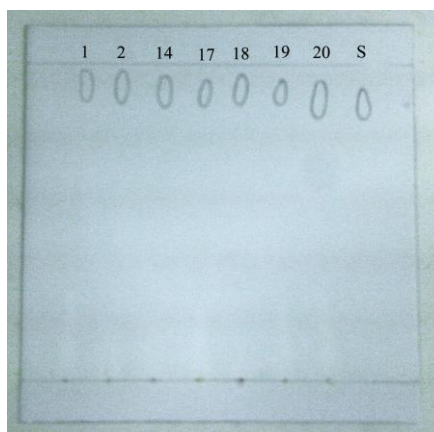
Dari Tabel 2 dan Gambar 1 dapat dilihat bahwa sampel yang memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah sampel nomor 1, 2, 14, 18, 19, dan 20, sedangkan sampel lain tidak memiliki daya hambat. Hal ini dikarenakan bakteri probiotik yang ditambahkan ke dalam sampel tidak sensitif terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, atau juga dikarenakan penggunaan media nutrient agar yang tidak sesuai atau optimum untuk bakteri probiotik yang ditambahkan, sehingga bakteri probiotik tersebut tidak dapat berkembang dan mengeluarkan sifat antibakterinya. Tidak optimumnya zona hambat yang dihasilkan, juga dikarenakan kadar bakteriosin yang terkandung di dalam ekstrak sampel susu probiotik tidak

terukur secara tepat sehingga tidak tepat sama satu sama lain yang menyebabkan perbedaan zona hambat. Disarankan dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kadar bakteriosinnya.

Proses pengendapan protein, diambil sampel masing-masing 5.0 mL dan kemudian disentrifugasi 9000 rpm selama 10 menit. Hal ini dimaksudkan untuk mengendapkan bakteri probiotik dan komponen tambahan lainnya seperti yang diinginkan yang merupakan satu-satunya peptida bakteriosin yang akan dianalisis. Filtrat ditambahkan tetes demi tetes 0,5 N HCl dalam metanol sampai jenuh, kemudian disentrifugasi 9000 rpm selama 10 menit. Kromatogram susu probiotik terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditampilkan di Tabel 3 dan Gambar 1

Tabel 3. Data harga retardasi faktor (Rf) ekstrak susu probiotik eluen n-buthanol : asam asetat : air (4:1:1) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Sampel	Rf			
	I	II	III	Rerata Rf
1	0,93	0,93	94	0,93
2	0,94	0,90	91	0,91
14	0,92	0,88	91	0,90
17	0,90	0,88	90	0,89
18	0,92	0,89	90	0,90
19	0,90	0,89	91	0,90
20	0,89	0,88	90	0,89
S (nisin 500 ppm)	0,86	0,86	88	0,87



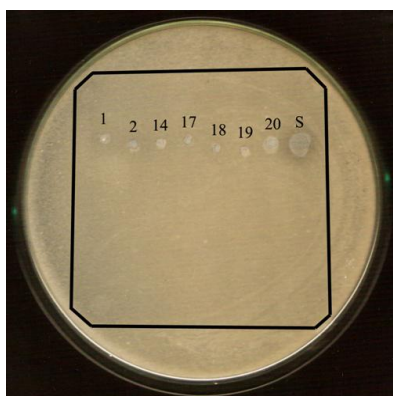
Gambar 2. Kromatogram ekstrak susu probiotik dengan eluen n-buthanol : asam asetat : air (4:1:1) Against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1 s/d7 sampel dari pasar dan 8 standar nisin)

Dari Tabel 3 dan Gambar 2 dapat diketahui bahwa masing-masing hasil ekstraksi mengandung satu komponen yang memiliki Rf yang berbeda dengan Rf yang dimiliki oleh nisin, sehingga diduga bukan merupakan nisin. Hanya hasil ekstraksi nomer 14, nomer 18 dan 19 yang memiliki Rf sama yaitu 0,9 sehingga diduga mengandung komponen yang sama. Kurang optimalnya fase gerak sehingga kurang sesuai untuk

sampel sediaan susu probiotik, sehingga kurang bisa mengangkat sampel yang ditotolkan atau karena BM sampel yang besar sehingga sulit untuk dieluasi. Hal ini juga bisa dilihat dari proses eluasi yang memakan waktu kurang lebih 2 jam. Kesalahan juga bisa disebabkan karena pada saat proses eluasi, bejana yang digunakan belum sepenuhnya jenuh sehingga memperlama proses eluasi.

Tabel 4. Bioautogram Sampel Susu Probiotik eluasi dengan Fasa Gerak n-buthanol : asam asetat : air (4:1:1) menggunakan *Staphylococcus aereus* ATCC 25923

Sampel	Diameter Zona Hambat
1	4,20 mm
2	4,15 mm
14	4,50 mm
17	4,45 mm
18	4,30 mm
19	4,00 mm
20	5,35 mm
S (Nisin 500 ppm)	8,025 mm



Gambar 3. Bioautogram Ekstrak susu probiotik terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Dari Tabel 3 dan Gambar 3 dapat dilihat bahwa hasil ekstraksi sampel yang memiliki zona hambat paling besar adalah sampel nomer 20 yang berarti sampel nomer 20 adalah hasil ekstraksi yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terbesar, sedangkan sampel yang memiliki zona penghambatan terkecil adalah sampel nomer 19. Kurang optimalnya zona hambat yang dihasilkan oleh sampel dapat dikarenakan ekstraksi yang kurang sesuai dengan sampel susu probiotik sehingga bakteriosin yang terkandung di dalam susu probiotik tidak terendapkan seluruhnya. Proses pemanasan yang dilakukan sebelumnya dapat merusak sebagian bakteriosin sehingga mempengaruhi zona hambat yang terbentuk.

Hasil dari keseluruhan penelitian yaitu profil bioautogram bakteriosin pada sediaan susu probiotik dapat dilihat pada tabel 3 dan gambar 3 masing-masing sampel memiliki 1 komponen yang berbeda-beda dan masing-masing komponen memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda-beda, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat profil bioautogram yang berbeda-beda dalam sediaan susu probiotik.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan bioautogram bakteriosin dalam sediaan susu probiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

DAFTAR PUSTAKA

- Choma, I., 2005. **The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis.** <http://chromatographyonline.findanalytiche.com/lcgc/Features/The-Use-of-Thin-Layer-Chromatography-with-Direct-B/ArticleStandard/Article/detail/177453>. Diakses 2 November 2009
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. & Chikindas, M. L. 2001. Bacteriosin: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71, p. 1-20
- Crandal, Allison D., and Thomas J. Montville. 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 Is a Complex Phenotype. **Applied And Environmental Microbiology.** New Jersey. p. 231-237
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. **Farmakope Indonesia.** Edisi ke-4, Jakarta: Departemen Kesehatan, p. 780, 980
- De Vuyst, L. Vandamme, E. J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Properties, biosynthesis, fermentation and application. **In: Bacteriocins of lactic acid bacteria.** Editors: De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. Chapman & hall, Glasgow. p. 165-167.
- Holt J.G, Krieg N.R., Sneath P.H.A., Stanley J.J and Wiliams S.T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 9th. Williams and Walkins. Philadelphia.
- Isnaeni, 1998. **Mutasintesis Antibiotika Mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137.** Disertasi, ITB, Bandung.
- Isnaeni, 2005. Bioautografi antibiotika hasil fermentasi mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137. **Majalah Farmasi Airlangga**, No. 16, Vol 5.
- Joss Delves-broughton. 2005. Feature Paper : Nisin as a Food Preservative. **Food Australia** 57 (12). p. 525-527
- J. Reunanen. 2007. Lantibiotic Nisin and Its Detection Methods. **Review of the Literature** (32). p. 10
- Lilley DM and Stillwell RH. 1965. Probiotics Growth Promoting Factors Prod by Microorganisms. *Sci* 147. p. 747-748
- Luciana Juncioni de Arauz, 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology** 20. **Nisin Preparation**, 2007. FAO JECFA Monographs 4. p. 146-154
- Putri Ratnasari, 2009. **Validasi Metode Bioautografi Untuk Penentuan Campuran Tetrasiklin Dan Oksitetrasiklin.** Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Rahalison et al. 1994. Antifungal Test In Phytochemical investigation Comparison of Bioautographic Method Using Phytopathogenic and human Pathogenic Fungi. **Plant Med** 60. p. 41-44
- Šušković J., Kos B., Goreta J. & Matošić S., 2001. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. **Food Technol. Biotechnol.**, 39 (3), p. 227-235.