

PENGARUH EKSTRAK ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) TERHADAP PERMEABILITAS DAN HIDROFOBISITAS *Bacillus cereus*

[Effect of Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) Extracts upon Permeability and Hydrophobicity of *Bacillus cereus*]

Adolf JN. Parhusip¹⁾, Betty Sri Laksmi Jenie²⁾, Winiati Pudji Rahayu²⁾, Sedarnawati Yasni²⁾

¹⁾ Staf Pengajar pada Jurusan THP, FAPERTA Unika St. Thomas Medan 20123

²⁾ Staf Pengajar Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan FATETA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

Diterima 27 April 2005/ Disetujui 6 Juli 2005

ABSTRACT

"Andaliman" spice is usually added as one of main spices in cooked fish and meat. Andaliman seeds were extracted using maceration method with nonpolar, semipolar and polar solvents. The result showed that the three kinds of andaliman extract had antibacterial activity on *Bacillus cereus*, especially during exponential phase (8 hour incubation period). Ethyl-acetate extract of Andaliman showed the highest antibacterial activity toward *B. cereus* with MIC and MBC values being 0.2% and 0.8% respectively. The permeability of *B. cereus* was observed at the dose of 2.5 MIC and 60.30% hydrophobicity leakage was obtained at 6% andaliman extracted by ethyl-acetate.

Key words: Andaliman, extract, hydrophobicity, antibacterial, cell-leakage.

PENDAHULUAN

Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) merupakan jenis rempah yang sering digunakan sebagai bumbu pada beberapa masakan khas Sumatera Utara khususnya masyarakat Tapanuli. Tumbuhan andaliman ini banyak terdapat di kawasan pegunungan Danau Toba, dan biasanya tumbuh secara liar.

Penelitian-penelitian antibakteri telah banyak dilakukan terutama terhadap berbagai jenis tanaman rempah-rempah. Rempah-rempah dan beberapa jenis tanaman secara empiris mempunyai aktivitas antibakteri dan secara tradisional banyak yang digunakan sebagai pengobatan. Sediaan bentuk segar, ekstrak, dan minyak atsiri digunakan sebagai obat anti radang, analgesik dan sebagai obat anti-diare (Winarno dan Sundari 1998).

Beberapa diantaranya adalah serih (Cepeda 2005), biji atung (Moniharopan 1998; Syamsir 2001; Murhadi 2003), daun beluntas (Ardiansyah 2003), ekstrak *annato* (Cuspinera et al., 2003), ekstrak andaliman (Ardiansyah 2001). Usaha untuk mencari sumber antibakteri baru, terutama tanaman asli yang terdapat di Indonesia terus dilakukan.

Hasil penelitian Parhusip et al., (1999) melaporkan bahwa bubuk rempah andaliman sebanyak 10% (v/v) dengan waktu inkubasi 72 jam mampu menghambat *S. typhimurium* (2.7×10^8 cfu/ml), *S. aureus*

(1.0×10^6 cfu/ml), *V. cholerae* (1.0×10^7 cfu/ml) dan *B. subtilis* (1.9×10^7 cfu/ml). Ekstrak etilasetat andaliman menggunakan metode maserasi memiliki diameter penghambatan tertinggi terhadap *S. aureus* sebesar 10.62 mm/0.05 gram ekstrak, sedangkan metode refluks diameter penghambatannya lebih rendah yaitu sebesar 4.50 mm/0.05 gram ekstrak (Ardiansyah 2001). Analisis minyak atsiri andaliman dengan GC-MS menghasilkan minimal 11 komponen dengan 5 komponen utama adalah *alfa-pinen*, *limonen*, *geraniol*, *sitronela* dan *geraniol asetat*. Minyak atsiri andaliman mampu menghambat *B. cereus*, *S. aureus* dan *Pseudomonas* (Yasni 2001). Cosentino et al., 2003 melaporkan bahwa *alfa-pinen* dan *limonen* merupakan komponen yang memiliki antibakteri kuat.

Kebocoran sel bakteri dapat disebabkan karena rusaknya ikatan hidrofobik komponen penyusun membran sel seperti protein, fosfolipid serta larutnya komponen-komponen yang berikatan secara hidrofilik. Hal ini berakibat meningkatnya permeabilitas membran sel sehingga memungkinkan masuknya senyawa-senyawa fetol dan ion-ion organik dalam sel dan keluarnya substansi sel seperti protein dan asam nukleat yang berakibat kematian sel (Ingram 1981).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh ekstrak andaliman terhadap kerusakan membran sel pada fase eksponensial dan fase stasioner serta hidrofobisitas *B. cereus*.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah andaliman yang diperoleh dari Pusat Pasar Senen Jakarta. Kultur *Bacillus cereus* FNCC 134 diperoleh dari koleksi kultur Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta, *nutrient broth* (NB) dan bahan kimia lainnya kualitas pro-analisa. Alat yang digunakan adalah *Double Beam Spectrophotometer* Model U-2000 Hitachi Instruments, peralatan ekstraksi dan alat-alat gelas lain.

Metode

Ekstraksi (metode maserasi) (Harbone 1996)

Sebanyak 100 gram bubuk andaliman dimaserasi dengan 400 ml pelarut nonpolar (heksana) (1:4 w/v), kemudian disonikator selama 15 menit dan inkubasi bergoyang kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 1 hari. Selanjutnya campuran disaring, ampas bubuk andaliman tersebut dimaserasi kembali sebanyak 2 kali dengan perlakuan sama seperti diatas sedangkan filtrat dipisahkan menggunakan evaporator pada suhu 45°C dengan kecepatan 75 rpm sampai larutan menjadi kental. Ekstrak yang diperoleh disebut ekstrak nonpolar. Ampas andaliman kemudian dikeringkan dalam oven vakum pada suhu 40°C selama 24 jam, dan dimaserasi kembali dengan pelarut semipolar (etilasetat) dan polar (metanol). Rendemen ekstrak dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat bahan yang di ekstraksi (g)}} \times 100\%$$

Penentuan fase pertumbuhan *B. cereus* (Lin et al., 2000)

Satu ose dari agar miring *Nutrient Agar* (NA) biakan murni *B. cereus* diinokulasi ke dalam 10 ml *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diambil 10 µl suspensi sel yang diinokulasi kembali ke dalam 10 ml NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 25 jam. Setiap waktu inkubasi dilakukan penghitungan jumlah sel dengan metode *Total Plate Count* (TPC).

Penentuan Nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) *B. cereus* (Kubo et al., 1995)

Dibuat seri pengujian sebanyak 14 tabung kecil, masing-masing dibuat konsentrasi ekstrak 0,0, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0, 5,0, dan 6,0% (w/w). Total media cair uji per tabung adalah 3,00 ml. *B. cereus* yang telah disegarkan dan diinkubasi selama 24 jam 37°C

lalu diencerkan 10 kali. Masing-masing 14 tabung tersebut diinokulasi 30 µl suspensi *B. cereus*, diinkubasi 37°C selama 24 dan 48 jam. Pengamatan jumlah bakteri dengan metode TPC setelah inkubasi 24 dan 48 jam. Nilai MIC (%) ditetapkan berdasarkan konsentrasi terendah ekstrak andaliman yang mampu menghambat pertumbuhan (bakteristatik) *B. cereus*. Nilai MBC (%) adalah konsentrasi terendah yang menunjukkan penurunan pertumbuhan *B. cereus* secara drastis (> 99,9 persen) setelah diinkubasi 48 jam dibandingkan dengan jumlah *B. cereus* awal (not jam).

Pengaruh ekstrak andaliman terhadap hidrofobitas bakteri (Jones et al., (1991); Lee dan Yli (1996)

Sebanyak 4,8 ml suspensi bakteri uji yang mengandung 10^6 cfu/ml disentrifus dengan kecepatan 1900 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet bakteri ditambah 4,8 ml NB yang mengandung ekstrak andaliman 2%, 4% dan 6% (w/w). Kontrol disiapkan dengan penambahan 1,07 ml bufer fosfat dan 3,73 ml media NB pada pelet bakteri, sehingga volume akhir menjadi 4,8 ml. Selanjutnya suspensi bakteri tersebut diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan disentrifus pada 1900 rpm selama 15 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dan diresuspensikan dalam PBS menjadi 4,8 ml.

Setiap 4,8 ml suspensi ditambahkan n-oktana dengan volume 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 dan 1,5 ml. Selanjutnya divortex selama satu menit dan disetimbangkan pada suhu kamar selama 15 menit, sehingga terjadi pemisahan. Fase cair diambil secara perlahan menggunakan pipet pasteur, selanjutnya diukur pada λ 600 nm.

Pengaruh ekstrak andaliman terhadap permeabilitas sel (Bunduki et al., 1995)

Sebanyak 10 ml kultur *B. cereus* disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian filtrat dibuang. Selanjutnya pelet ditambahkan dengan ekstrak etilasetat dan ekstrak metanol dengan konsentrasi 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 MIC dan diinkubasi pada shaker bergoyang selama 24 jam. Selanjutnya suspensi disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan yang diperoleh diukur pada panjang gelombang 280 nm dan 260 nm. Panjang gelombang 280 nm untuk menentukan nitrogen dan protein sel, sedangkan panjang gelombang 260 nm digunakan untuk menentukan nitrogen dari asam nukleat sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak andaliman

Rendemen ekstrak bubuk andaliman berdasarkan polaritas pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Rendemen ekstrak paling tinggi diperoleh dari pelarut heksana, diikuti etilasetat dan metanol, berturut-turut sebesar 6.30%, 4.15% dan 3.17%.

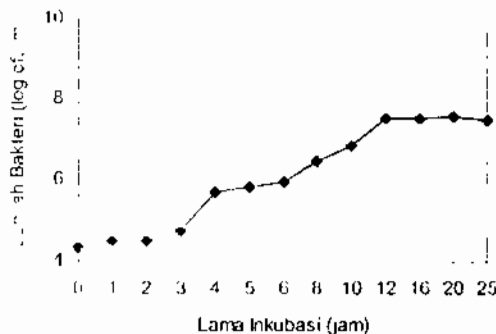
Tabel 1 Rendemen ekstrak andaliman dengan metode maserasi

Jenis pelarut	Rendemen ekstrak (%)
heksana	6.30
Etilasetat	4.15
Metanol	3.17

Menurut Houghton dan Raman (1998), ekstrak heksana (nonpolar) mengandung komponen yang bersifat nonpolar seperti lilin, lemak dan minyak atsiri, sedangkan ekstrak etilasetat (semipolar) sebagian besar mengandung senyawa-senyawa alkaloid, aglikon-aglikon, dan glikosida. Ekstrak metanol (polar) terutama mengandung kelompok senyawa gula, asam-asam amino, glikosida dan kelompok senyawa yang juga larut dalam petroleum eter, heksana, kloroform, etilasetat, etanol dan air dalam jumlah dan proporsi berbeda-beda. Pengujian dilakukan terhadap ekstrak etilasetat dan ekstrak metanol, karena hasil pengamatan aktivitas ekstrak heksana terhadap bakteri uji dengan metode difusi sumur tidak menunjukkan adanya penghambatan.

Penentuan fase pertumbuhan *B. cereus* (Lin et al., 2000)

Hasil pengamatan fase pertumbuhan bakteri *B. cereus* dapat dilihat pada Gambar 1. Fase adaptasi *B. cereus* terdapat pada interval waktu 1-3 jam, sedangkan fase eksponensial berlangsung sekitar 9 jam mulai dari jam ke 3 sampai dengan jam ke 12, sementara fase stasioner berlangsung mulai dari jam ke 16 sampai dengan jam ke 25. Berdasarkan data tersebut ditetapkan bahwa untuk mewakili fase adaptasi dipilih setelah 1 jam, fase eksponensial dan fase stasioner masing-masing setelah 8 jam dan 16 jam.



Gambar 1 Kurva pola pertumbuhan *B. cereus*

Jumlah sel *B. cereus* selama fase adaptasi belum meningkat yaitu pada jam ke-3 sebesar 10^4 cfu/ml. Fase eksponensial mulai jam ke-3 sampai jam ke-12 meningkat pesat sampai 10^8 cfu/ml dan setelah jam ke-16 sampai jam ke-25 jumlahnya tetap (fase stasioner) yaitu 10^8 cfu/ml. Fase adaptasi *B. cereus* berlangsung selama 3 jam dan merupakan persiapan untuk fase berikutnya. Pada penelitian ini fase eksponensial berlangsung 3-12 jam. Pada fase ini pertumbuhan bakteri sangat cepat, teratur, dan semua bahan dalam sel berada dalam keadaan seimbang (Jawet et al., 1996; Madigan et al., 2000). Jumlah sel *B. cereus* setelah 1 jam sebanyak 5.6×10^4 cfu/ml, setelah 8 jam meningkat sampai 7.4×10^8 cfu/ml dan mencapai jumlah tetap 3.4×10^8 cfu/ml setelah 16 jam. Berdasarkan data diatas ditetapkan bahwa mewakili fase adaptasi adalah 1 jam, fase eksponensial 8 jam dan fase stasioner 16 jam.

Penentuan nilai MIC dan MBC ekstrak andaliman

Hasil pengujian MIC dan MBC terhadap bakteri *B. cereus* dapat dilihat pada Tabel 2. Sel *B. cereus* lebih peka terhadap ekstrak etilasetat dengan nilai MIC dan MBC adalah 0.20% dan 1.20% dibandingkan terhadap ekstrak metanol dengan MIC dan MBC yang lebih tinggi masing-masing adalah 0.80% dan 1.60%.

Tabel 2. Nilai MIC dan MBC ekstrak andaliman untuk *B. cereus*.

Bakter uji	Ekstrak uji	MIC %	MBC %
<i>B. cereus</i>	Etilasetat	0.20	1.20
	Methanol	0.80	1.60

¹ Jumlah bakteri awal 10^6 cfu/ml.

Bacillus cereus merupakan bakteri Gram positif dan paling peka terhadap ekstrak etilasetat. Setiap zat yang menghambat salah satu langkah dalam biosintesis peptidoglikan akan menyebabkan dinding sel bakteri yang tumbuh menjadi lemah dan sel akan mengalami lisis (Jawetz et al., 1996). Komponen-komponen ekstrak etilasetat dan metanol diduga berikatan dengan α -karboksil residu alanin ujung dari satu rantai yang menghambat sintesis dinding sel sehingga sel akan mengalami kerusakan dan lisis.

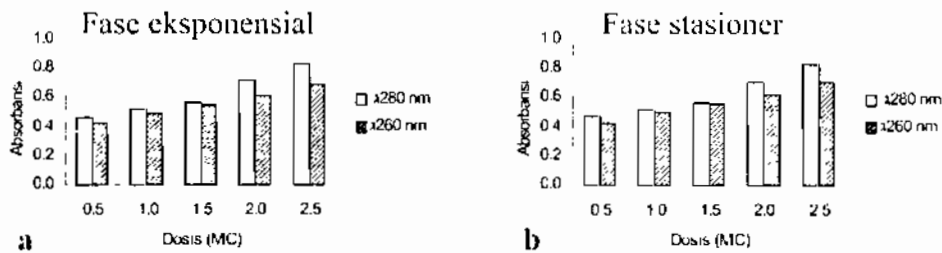
Tingkat kepolaran mempengaruhi penghambatan terhadap sel, semakin menurun polaritas (mendekati nonpolar) akan semakin efektif menghambat bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Davidson dan Branen 1993). Hal ini sejalan dengan hasil-hasil penelitian dari Farag et al., (1989) dan Kim et al., (1995) yang membuktikan bahwa komponen-komponen minyak atsiri yang bersifat semipolar sampai nonpolar, lebih kuat daya antibakterinya terhadap kelompok bakteri Gram positif dibandingkan kelompok bakteri Gram

negatif (Friedman et al., 2004). Bakteri Gram positif mempunyai kecenderungan lebih peka dibandingkan bakteri Gram negatif, hal ini disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel bakteri. Pada bakteri Gram positif sebagian besar dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan dan asam teikoat, sedangkan pada bakteri Gram negatif dinding selnya mempunyai lapisan (membran) luar terdiri dari lipopolisakarida, protein dan fosfolipid serta lapisan tipis peptidoglikan (Cano dan Colome 1986). Membran luar bakteri Gram negatif ini akan memberikan ketegaran yang lebih kuat dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Adanya ketiga senyawa ini pada membran luar menyebabkan bakteri Gram negatif mempunyai ketahanan terhadap senyawa antibakteri (Friedman et al., 2002).

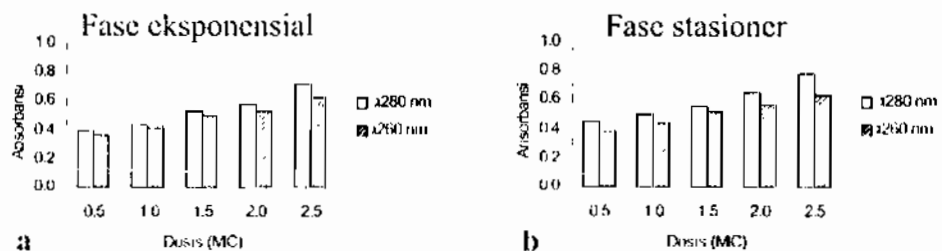
Mekanisme kerja metanol adalah dengan mendenaturasi dan mengkoagulasikan protein bakteri dari *B. cereus*. Selain itu metanol juga dapat merusak dinding sel bakteri. Metanol menyerap air yang ada dalam sel sehingga bakteri kekurangan air. Adanya perbedaan konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel menyebabkan cairan di lingkungan juga akan masuk ke dalam sel, sehingga sel kemudian membengkak, mengalami lisis dan selanjutnya menyebabkan kematian bakteri (Anonim 2004).

Pengaruh ekstrak andaliman terhadap permeabilitas sel *B. cereus*

Peningkatan absorbansi supernatan sel diamati sebagai indikasi terjadinya peningkatan bahan-bahan yang dapat diserap pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm yang dikeluarkan oleh bakteri. Panjang gelombang 260 nm dan 280 nm masing-masing mengukur nitrogen dari asam nukleat sel dan protein sel. Semakin meningkatnya dosis MIC pada ekstrak etilasetat maupun ekstrak metanol yang digunakan akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan terjadi kebocoran sel, yang diikuti dengan keluarnya materi intraseluler dan ditunjukkan dengan tingginya nilai absorbansi. Hasil pengukuran kebocoran sel *B. cereus* pada fase eksponensial dan stasioner oleh ekstrak etilasetat dan metanol dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3. Pada perlakuan dosis 2.5 MIC memberikan pengaruh tertinggi pada pengukuran dengan panjang gelombang 280 nm dari pada panjang gelombang 260 nm. Hal ini menunjukkan bahwa pengukuran nitrogen yang disebabkan oleh kerusakan protein sel lebih tinggi daripada nitrogen yang disebabkan kerusakan asam nukleat. Degradasi komponen asam nukleat lebih sulit karena lebih banyak terdapat pada dinding sel, sedangkan kerusakan protein banyak terdapat dari cairan sel saat lisis.



Gambar 2 Pengaruh ekstrak etilasetat terhadap kebocoran sel *B. cereus* pada fase (a) eksponensial dan (b) stasioner



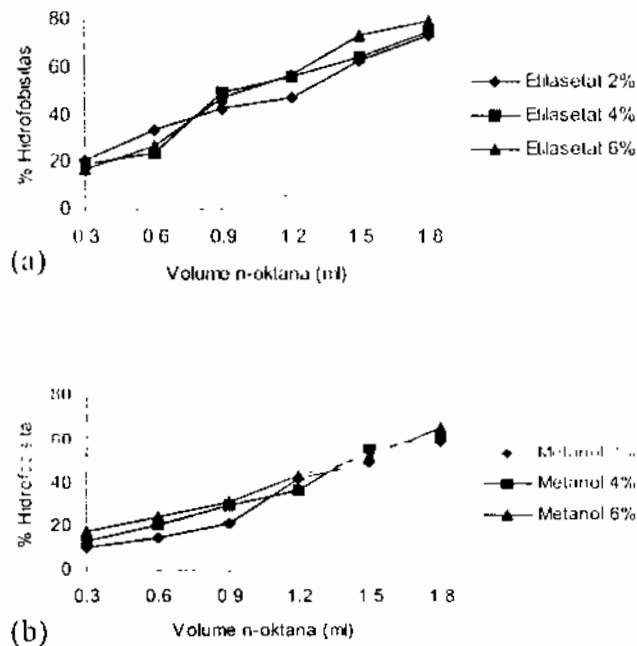
Gambar 3 Pengaruh ekstrak metanol terhadap kebocoran sel *B. cereus* pada fase (a) eksponensial dan (b) stasioner

Senyawa-senyawa antibakteri yang bereaksi dengan membran sitoplasma dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas membran serta kebocoran sel dan keluarnya metabolit-metabolit intraseluler. Senyawa fenolik ditaporkan dapat bereaksi dengan membran sitoplasma mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran atau menyebabkan perubahan nyata dengan terlepasnya komponen-komponen membran sel (Davidson 1997).

Beberapa senyawa antibakteri seperti alilisotiosianat (Lin et al., 2000), *butylated hydroxyanisole* (BHA) (Degre dan Sylvestre 1983), *butylated hydroxytoluena* (BHT), asam p-kumarat dan asam kafeat (Nychas 1995), benzaldehida fenolik dan asam benzoat (Friedman et al., 2003) juga dapat merusak membran sel dan menyebabkan kebocoran metabolit seluler. Gangguan pada membran sel mengakibatkan terganggunya proses-proses metabolisme dalam membran sel seperti penyerapan nutrisi, produksi energi dan transport elektron (Nychas 1995).

Pengaruh ekstrak andaliman terhadap hidrofobisitas *B. cereus*

Hasil pengukuran hidrofobisitas sel *B. cereus* oleh ekstrak etilasetat dan ekstrak metanol dapat dilihat pada Gambar 4, memberikan respon positif terhadap n-oktana. Ekstrak etilasetat dan ekstrak metanol andaliman pada konsentrasi 2, 4, dan 6 persen (w/w) memberikan nilai hidrofobisitas kuat terhadap *B. cereus* masing-masing dengan kisaran 73.01-79.58 persen dan 58.12-65.96 persen. Hidrofobisitas *B. cereus* tertinggi diperoleh pada konsentrasi ekstrak etilasetat dan ekstrak metanol masing-masing 6 persen. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak andaliman maka hidrofobisitas terhadap sel *B. cereus* juga semakin tinggi. Hal ini menggambarkan bahwa *B. cereus* tersebut tergolong pada bakteri hidrofobik kuat, sesuai dengan pernyataan Lachica (1990). Analisis hidrofobisitas secara BATH (*Bacterial Adherence to Hydrocarbons*) menurut kriteria Santos et al., (1990), menunjukkan bahwa nilai hidrofobisitas bakteri lebih besar dari 50 persen dapat digolongkan bakteri hidrofobik kuat, nilai hidrofobisitas 20-50 persen digolongkan hidrofobik moderat, dan nilai hidrofobisitas kurang dari 20 persen digolongkan hidrofobik lemah.



Gambar 4 Pengaruh konsentrasi dan ekstrak (a) etilasetat dan (b) metanol andaliman terhadap hidrofobisitas *B. cereus*

Semakin tinggi jumlah n-oktana dan konsentrasi ekstrak andaliman yang ditambahkan maka hidrofobitasnya terhadap sel *B. cereus* juga semakin tinggi. Gugus metil dari n-oktana mampu berikatan dengan gugus fosfat dari dinding sel *B. cereus* (Marin et al., 1997), dimana semakin tinggi jumlah n-oktana yang ditambahkan akan semakin banyak yang berikatan dengan gugus metil dan fosfat dari dinding sel bakteri. Sifat hidrofobitas bakteri berhubungan dengan komponen dinding sel seperti fosfolipid, lipopolisakarida dan komponen luar sel seperti pili, fimbriae dan kapsul. Komponen ini mempunyai fungsi penempelan pada sel inang dengan membentuk interaksi hidrofobik (Finlay dan Falkow 1997). Sifat hidrofobik *B. cereus* diekspresikan oleh adanya fimbriae (Lachica 1990) yang dimediasi oleh adanya protein 20.5 kDalton dan protein ini mengandung asam amino polar (lisin) dan asam amino nonpolar (leusin dan isoleusin).

KESIMPULAN

Ekstrak etilasetat dan ekstrak metanol andaliman dapat menghambat pertumbuhan *B. cereus*. Bakteri ini peka terhadap ekstrak andaliman terutama adalah ekstrak etilasetat. Nilai MIC ekstrak etilasetat terhadap *B. cereus* adalah 0.2% dan MBC adalah 1.20%. Semakin meningkatnya dosis MIC baik ekstrak etilasetat maupun ekstrak metanol yang digunakan akan meningkatkan permeabilitas dan terjadi kebocoran sel yang menyebabkan keluarnya materi intraseluler. Hidrokarbon n-oktana pada konsentrasi 2, 4 dan 6% (w/w) dapat meningkatkan nilai hidrofobitas *B. cereus* terhadap ekstrak etilasetat sebesar 73.01-79.58%, sedangkan ekstrak metanol sebesar 58.92-65.96%.

DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim]. 2004. Bacteria and Spices. [29 Okt 2004].
- Ardiansyah. 2001. Teknik ekstraksi komponen antimikroba andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) dan antarasa (*Litsea cubeba*). [skripsi]. Bogor. FATETA Institut Pertanian Bogor.
- Bunduki MMC, Flanders KJ, Donnelly CW. 1995. Metabolic and structural sites of damage in heat and sanitizer-injured populations of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 58: 410-415
- Cano RJ, Colome JS. 1986. Microbiology. West Publishing Company. New York.
- Cepeda GN. 2005. Aktivitas ekstrak etanol sereh terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* verotoksigenik [tesis]. Bogor. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Cosentino S, Barra A, Pisano B, Cabizza M, Pirisi FM, Palmas F. 2003. Composition and antimicrobial properties of sardinian *Juniperus* essential oils against foodborne pathogens and spoilage microorganisms *J Food Prot* 66(7):1288-1291
- Cuspinera VG, Westhoff DC, Rankin SA. 2003. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *J Food Prot* 66(6):1074-1078.
- Davidson PM. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Di dalam: Doyle MP, Beuchat LR dan Montville TJ, editor. *Food Microbiology Fundamental and Frontiers*. Washington: ASM Press.
- Davidson PM, Brannen AL. 1993. Antimicrobials in Food Marcel Dekker Inc., New York.
- Degre R, Sylvestre M. 1983. Effect of butylated hydroxyanisole on the cytoplasmic membrane of *Staphylococcus aureus* Wood 46. *J Food Prot* 46:206-209.
- Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, El-Baroty GSA. 1989. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. *J Food Prot* 52(9) 665-667
- Finlay BB, Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. hlm:136-169.
- Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritica* in apple juice *J Agric Food Chem* 52: 6042-6048.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* 66(10): 1811-1821.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *ecampylobacter jejuni*, *escherichia coli*, *listeria monocytogenes*. and *Salmonella enterica*. *J Agric Food Chem* 65(10). 1545-1560.

- Harbone JB. 1996. Metode Fitokimia Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Pdmawinata K, Sudiro P. Penerjemah. Bandung: Penerbit ITB.
- Houghton PJ dan Raman A. 1998. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Thomson Science, London.
- Ingram LO. 1961. Mechanisms of lysis of *E. coli* by ethanol and other osmotic agents. *J Bacteriol* 146 (1): 331-336
- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. 1996. Medical Microbiology. Appleton & Lange. San Fransisco.
- Jones D, Gorman S, Mccafferty DF, Woolfson AD. 1991. The effects of three non-antibiotic, antimicrobial agents on the surface hydrophobicity of certain microorganism evaluated by difference methods. *J Appl Bacteriol* 71:218-227
- Kim JM, Marshal MR, Cornell JA, Boston JF, Wei CI. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniols against *Salmonella typhimurium* in culture medium and fish cubes. *J Food Sci* 60 (6): 1365-1368.
- Kubo I, Muroi H, Kubo A. 1995. Antibacterial activity of long-chain alcohols against *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem* 40(6): 999-1003.
- Lachica RV. 1990. Significance of hydrophobicity in the adhesiveness of pathogenic Gram negative bacteria. Di dalam Doyle RJ dan Rosenberg M, editor. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Lee KK, Yli KC. 1996. A Comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic *Vibrio*. *Letters in Appl Microbiol* 13:343-346
- Lin CM, Preston JF III, Wei CI. 2000. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *J Food Prot* Vol 63 (6): 727-734.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2000. Brock Biology of Microorganisms. Ninth Edition. Southern Illinois University Carbondale.
- Marin ML, Benito Y, Pin C, Fernandez MF, Garcia ML, Selgas MD, Cases C. 1997. Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters in Appl Microbiol* 24:14-18.
- Moniharopan T. 1998. Kajian fraksi bioaktif dari buah Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) sebagai bahan pengawet pangan. [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Nychas GJE. 1995. Natural antimicrobials from plants. Di Dalam: Gould GW (Eds). *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London
- Parhusip AJ, Posman S, Adelina T. 1999. Studi tentang aktivitas antimikroba alami pada andaman. Di dalam. *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia Jakarta, 12-13 Okt 1999*
- Santos Y, Bandin I, Nicto TP, Bruno DW Ellis Ae dan Taranzo AT. 1990. Proposed criteria of hydrophobicity and differentiation. Di dalam: Doyle RJ dan Rosenberg M. Eds. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Syamsir E. 2001. Mempelajari stabilitas aktivitas antimikroba ekstrak biji atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) selama penyimpanan terhadap *Staphylococcus aureus*. [tesis]. Bogor: Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Winarno MW, Sundari D. 1998. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat diare di Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran* 109: 25-32.
- Yasni S. 2001. Aktivitas antimikroba buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) dan Antarasa (*Litsea cubeba*) terhadap bakteri dan kapang serta deskriptif komponen aktif penyusunnya. Di dalam: Nuraida dan Dewanti-Haryadi (editor). *Pangan Tradisional. Basis Bagi Industri Pangan Fungsional dan Suplemen*. Pusat Kajian Makanan Tradisional Institut Pertanian Bogor