

Fase Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Tempoyak Asal Jambi yang Disimpan Pada Suhu Kamar

Growth Phase of Lactic Acid Bacteria Isolate of Tempoyak Originated from Jambi Stored at Room Temperature

Mardalena

Fakultas Peternakan Universitas Jambi, Kampus Pinang Masak,
Jl. Raya Jambi – Ma. Bulian Km 15 Ma. Jambi 36136 Jambi
E-mail: lenadjamas@yahoo.co.id

ABSTRACT

The purpose of the study is to determine the growth phase of the lactic acid bacteria (LAB) of tempoyak Jambi origin stored at room temperature. Tempoyak made from durian flesh without the seeds that have been added salt and stored in an aerobic environment. The research was conducted on the LAB isolation and counting bacterial colonies, identification of LAB isolates with Gram coloring and growth patterns of isolated LAB at room temperature. The results showed that the isolated lactic acid bacteria from tempoyak Jambi origin shows the characteristics of spherical-shaped colonies, milky white color of the colonies, Positive Gram (+), negative catalase reaction, short rod-shaped cell with dark purple color. The LAB isolates were able to grow at room temperature for 6 hours of storage only.

Key words: Lactic acid bacteria, tempoyak, room temperature

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk menentukan fase pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) dari tempoyak asal Jambi yang disimpan pada suhu kamar. Tempoyak terbuat dari daging buah durian tanpa biji yang telah ditambahkan garam dan disimpan dalam lingkungan aerob selama seminggu. Penelitian dilakukan melalui isolasi bakteri asam laktat, menghitung koloni bakteri, identifikasi morfologi koloni bakteri asam laktat secara mikrobiologi dengan pewarnaan gram dan melihat fase pertumbuhan bakteri asam laktat pada suhu kamar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi dari tempoyak asal Jambi menunjukkan karakteristik koloni berbentuk bulat dan berwarna putih susu, gram positif (+), reaksi katalase negatif, isolat bakteri asam laktat berbentuk batang dan mampu tumbuh pada suhu kamar selama 6 jam penyimpanan saja.

Kata kunci : Bakteri asam laktat, tempoyak, suhu kamar

PENDAHULUAN

Pengolahan pakan secara biologis dapat menggunakan bakteri asam laktat (BAL) yang memiliki peranan penting dalam kehidupan ternak, baik melalui keterlibatannya pada fermentasi makanan maupun kemampuannya tumbuh pada jalur *intestine*. Melalui teknik fermentasi bakteri asam laktat terhadap pakan ternak, akan dapat meningkatkan mutu pakan dan memiliki daya simpan yang cukup lama.

Pengaruh penggunaan bakteri asam laktat (BAL) terhadap komposisi kimia silase hijauan pakan dapat dilihat pada Tabel 1. Fermentasi pakan oleh BAL, juga dapat meningkatkan aroma pakan, sehingga menambah nafsu makan ternak. BAL selain memiliki sifat antimikroba, beberapa spesies BAL memiliki enzim BSH (*Bile Salt Hidrolase*) yaitu enzim yang berfungsi mendegradasi lemak jenuh menjadi lemak tak jenuh, sehingga produk ternak yang dihasilkan akan rendah kolesterol (Urnemi.

2012). Salah satu sumber BAL adalah tempoyak.

Tabel 1. Pengaruh Penggunaan BAL Terhadap Komposisi Kimia Silase Hijauan Pakan

Jenis Hijauan	Komposisi Kimia Silase (%)			
	BK	BO	PK	NDF
Rumput Raja ¹	21,9	93,8	15,1	61,5
Rumput Benggala ²	28,4	10,6	74,9	49,4
Rumput Gajah ³	23,89	76,83	-	69,95

Keterangan : ¹Antaribaba *et al.* (2009), ² Santoso *et al.* (2009), ³Ridwan *et al.* (2005)

Tempoyak adalah istilah dari durian yang difermentasi dan hasil fermentasi dari buah durian memiliki bau khas dan berwarna kuning krem dan banyak dikonsumsi di Indonesia dan Malaysia sebagai lauk dan bumbu (Battcock dan Ali, 1998; Ganjar, 2000). Tempoyak ini berbentuk campuran bubur durian dengan garam yang difermentasi dalam kondisi anaerob dalam wadah tertutup. Fermentasi biasanya membutuhkan waktu sekitar 4-7 hari dan tekstur durian berubah dari bentuk padat menjadi konsistensi semi padat dengan bau dan rasa asam dominan. Keasaman tempoyak dilaporkan 2,8-3,6%. Rasa asam tempoyak dikaitkan dengan asam yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) selama fermentasi. (Amin *et al.*, 2004, Leisner *et al.*, 2002).

Melalui proses fermentasi, daging durian dapat disimpan selama 2 bulan sampai 1 tahun. Sifat awet yang ditunjukkan oleh tempoyak sangat baik untuk kesehatan sehingga BAL yang ada pada tempoyak dimungkinkan dapat bersifat sebagai probiotik. Daging durian mengandung karbohidrat yang cukup tinggi yaitu 25,7 % (Hanum *et al.*, 1989), maka akan mampu

membunuh bakteri patogen di dalam rumen dan mendesak bakteri patogen keluar dari usus. Hal ini membuat kondisi usus lebih sehat, dan proses pencernaan berjalan baik (Purwati *et al.*, 2005).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang dominan dalam durian fermentasi (Amiza *et al.*, 2006). Komposisi kimia dari buah durian dengan kandungan gula 15-20% (Ketsa dan Daengkanit, 1998) dapat mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat. Dilaporkan bahwa spesies *Lactobacillus* merupakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari tempoyak asal Indonesia dan Malaysia. Strain BAL dan mikroorganisme lainnya bervariasi tergantung dari mana tempoyak dibuat. *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. mali*, *L. fermentum* ditemukan pada tempoyak asal Malaysia (Leisner *et al.*, 2001). Leisner *et al.*, (2002) melaporkan spesies baru *Lactobacillus*, *L. durianis* sp., terisolasi dari tempoyak Malaysia. BAL lainnya yang ada pada tempoyak dari Malaysia adalah *Leuconostoc mesenteroides*.

Berdasarkan hal diatas dilakukan penelitian tentang daya tahan dan

pertumbuhan bakteri asam laktat tempoyak asal Jambi yang dibiarkan pada suhu kamar.

MATERI DAN METODE

Sumber BAL

Pembuatan tempoyak dalam penelitian ini secara tradisional. Buah durian yang telah matang dikupas dan diambil isinya. Isi buah durian dipisahkan antara daging dan bijinya, kemudian daging durian tanpa biji ditambah garam 2% (b/b) dan dimasukkan ke dalam stoples yang tertutup rapat sehingga tercipta suasana an aerob. Stoples dibiarkan pada suhu kamar selama satu minggu. Setelah satu minggu, stoples dibuka dan tempoyak siap diisolasi.

Isolasi BAL dan Pewarnaan Gram

Semua peralatan yang dibutuhkan seperti: cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, tip pipet mikro, *hockey stick*, disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 lbs. Dipersiapkan media *enrichment* yaitu dengan melarutkan 9.87 g MRS *Broth* dalam 189 ml aquades kemudian dipanaskan sambil dihomogenisasi dengan *hot plate-stirrer* pada suhu 100°C, lalu di *autoclave* (15 menit, 121 °C dan tekanan 15 lbs). Dipersiapkan media MRS Agar dengan melarutkan 5.96 g MRS Agar dalam 90 ml aquades kemudian dipanaskan sambil dihomogenisasi dengan *hot plate-stirrer* pada suhu 100°C, lalu di *autoclave*, setelah agak dingin ($\pm 55^{\circ}\text{C}$) dituang ke dalam masing-masing cawan petri

sebanyak ± 15 ml. Menggunakan sendok steril dan *aluminium foil* dadih ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan 9 ml larutan MRS *Broth* dalam tabung reaksi, lalu divortex sampai homogen.

Hasil ini disebut pengenceran 10^{-1} , dimasukkan ke dalam *anaerob jar*, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Hasil 10^{-1} tersebut diambil 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan MRS *Broth*, lalu divortex sampai homogen. Hasil pengenceran ini disebut dengan pengenceran 10^{-2} , begitu seterusnya sampai pada pengenceran 10^{-9} . Dari pengenceran 10^{-9} , diambil 100 μl sampel dan ditanam dengan metode *spread* pada *petridish* yang telah berisi media MRS Agar, kemudian diratakan dengan *hockey stick* yang sebelumnya disteril dengan alkohol dan dibakar dengan bunsen lalu diangin anginkan. Inokulum disimpan dalam *anaerob jar* kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pengkodean *petridish* dengan menandai masing-masing *petridish*.

Setelah 48 jam, *single colony* yang mencirikan BAL yaitu bulat licin berwarna putih kekuningan dipindahkan ke media MRS Agar untuk pemurnian koloni dengan metode *streak* yaitu dengan menggunakan jarum ose kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Purwati *et al.*, 2005). Koloni yang mencari BAL dilakukan pewarnaan gram menurut prosedur Dwidjoseputro (1994)

Produksi Kultur Bakteri Asam Laktat

Bakteri BAL ditumbuhkan dalam media MRS agar miring selama 24 jam pada suhu ruang. Sebanyak 1 lub bakteri diinokulasikan pada 50 ml media MRS cair dan ditempatkan dalam anaerobik jar yang kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam sebagai sub kultur. Setelah sub kultur berumur 24 jam kemudian dikulturkan ke media MRS cair 10 % dengan cara memipet 10 ml subkultur kedalam 90 ml media MRS cair yang baru, lalu di sebar umur 0 jam s/d 8 jam dengan interval tiap 1 jam. Penyebaran dilakukan dengan mengenceran serial sebanyak 100

ul di sebar kedalam media padat MRS petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang yang berkisar antara 28 – 30° C. Produksi kultur BAL dapat dihitung dan dibuat kurva pertumbuhan bakteri (Mustopa, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Koloni Bakteri Asam Laktat

Hasil isolasi dan inkubasi bakteri selama 48 jam, didapatkan total koloni bakteri asam laktat yang dihasilkan pada pengenceran 10^{-4} – 10^{-9} seperti terlihat pada Tabel 2.

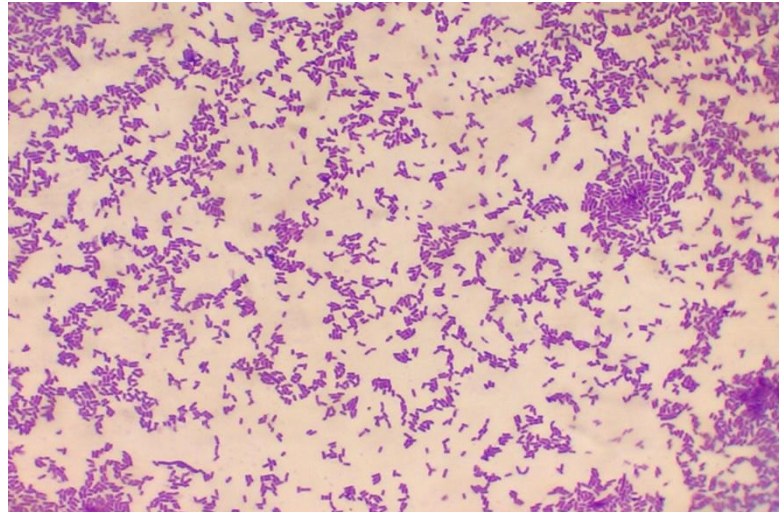
Tabel 2. Rataan Jumlah Koloni BAL pada Berbagai Tingkat Pengenceran (CFU/g)

No.	Tingkat Pengenceran	Jumlah Koloni BAL
1	10^{-4}	$3,8 \times 10^7$
2	10^{-5}	$1,0 \times 10^7$
3	10^{-6}	$1,3 \times 10^7$
4	10^{-7}	$8,1 \times 10^6$
5	10^{-8}	$6,0 \times 10^6$
6	10^{-9}	$6,2 \times 10^6$

Jumlah koloni bakteri asam laktat yang dihasilkan pada pengenceran 10^{-4} – 10^{-9} berkisar antara $6,0 \times 10^6$ - $3,8 \times 10^7$ CFU/g. Hasil ini sesuai dengan ketentuan pangan probiotik menurut FAO/WHO bahwa penambahan pangan probiotik harus memperhatikan kesehatan inang tempat bakteri hidup dan konsentrasi itu berkisar antara 10^6 - 10^7 CFU/mL dengan tujuan agar terjadi keseimbangan mikroflora di usus (Nur 2005).

Identifikasi Isolat BAL dengan Pewarnaan Gram

Identifikasi isolat BAL dari tempoyak dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis. Secara makroskopis pengamatan meliputi uji katalase, bentuk koloni dan warna koloni, sedangkan secara mikroskopis berupa pewarnaan gram untuk mengamati bentuk sel bakteri (Gambar 1).



Gambar 1. Isolat Bakteri Berbentuk Batang (Basil)

Semua isolat menunjukkan karakteristik khusus yang dimiliki bakteri asam laktat, seperti Gram positif (+), reaksi katalase negatif dan tidak membentuk endospora. Identifikasi BAL yang didapat hampir seragam dengan bentuk koloni bulat, warna koloni putih susu, sel berbentuk batang pendek. Surono (2004) menyatakan bahwa variasi karakteristik bakteri asam laktat normal terjadi, namun yang mutlak adalah sifatnya sebagai bakteri Gram positif.

Karakteristik koloni dan pengujian gram semuanya menunjukkan hasil positif, karena selnya berwarna ungu tua. Hasil ini ditunjang oleh pendapat Urnemi *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa salah satu teknik pewarnaan yang paling penting untuk mengidentifikasi bakteri adalah dengan metode Gram atau pewarnaan Gram. Tujuan identifikasi dengan pewarnaan Gram adalah untuk mengelompokkan bakteri berdasarkan reaksi kimia. Pewarnaan Gram akan membagi bakteri menjadi dua kelompok

yaitu Gram positif dan Gram negatif. Perbedaan ini disebabkan karena adanya lapisan dinding sel bakteri yang berbeda. Menurut Sneath *et al.*, (1986) dan Hayakawa (1992), kelompok bakteri asam laktat yang berbentuk batang (rod) termasuk juga kokobasili dan batang kurus, katalasenya negatif maka tergolong *Lactobacillus*,. sedangkan bakteri yang berbentuk bulat dengan susunan rantai panjang maupun pendek termasuk kedalam genus *Streptococcus* (Fardiaz 1992).

Uji katalase merupakan salah satu uji untuk mengidentifikasi mikroba yang mampu menghasilkan enzim katalase yang digunakan untuk memecah hydrogen peroksida yang terbentuk dari proses respirasi aerob dan bersifat toksik terhadap bakteri, menjadi dihidrogenoksida (H_2O) dan oksigen (O) yang tidak bersifat toksik lagi. Hasil uji katalase isolate penelitian memperlihatkan semuanya negatif. Djide dan Wahyudin (2008) menjelaskan bahwa reaksi katalase menunjukkan hasil positif

bila terbentuk gelembung udara yang mengindikasikan terbentuknya gas O₂ dan hasil negatif jika tidak menunjukkan adanya gelembung gas.

Pertumbuhan Isolat BAL Tempoyak pada Suhu Ruang

Proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh adanya pertumbuhan bakteri asam laktat. Beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan asam laktat adalah kadar

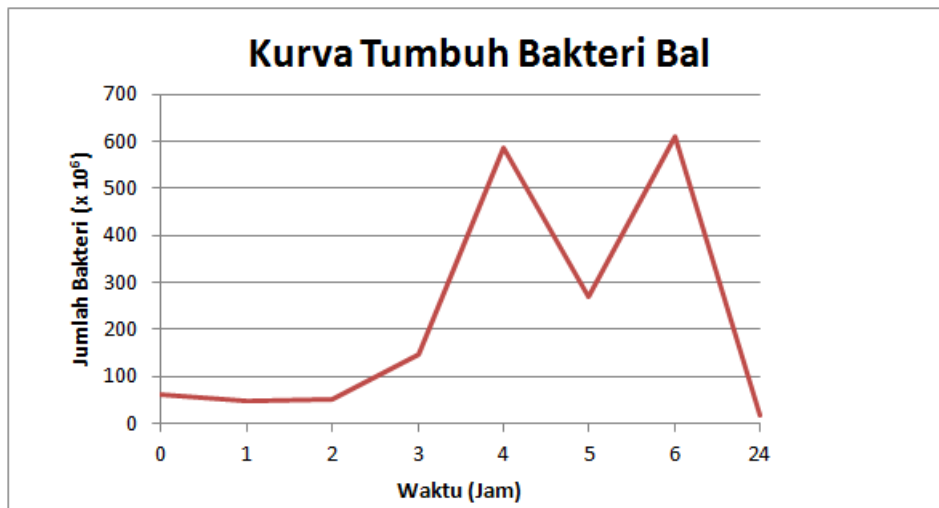
garam, suhu, pH dan tersedianya karbohidrat sebagai sumber makanan (Pelczar dan Chan, 2005). Untuk pertumbuhan yang ideal bagi bakteri asam laktat perlu dibuat suatu kondisi yang optimal. Untuk mengetahui kurva tumbuh kultur atau isolat di inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Pertumbuhan isolat bakteri asam laktat diuji cobakan pada suhu kamar dan didapatkan hasilnya seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pertumbuhan BAL Penelitian (CFU/g) Berdasarkan Waktu Inkubasi Pada Suhu Kamar

Waktu Inkubasi (jam)	Jumlah Bakteri		
	Isolat BAL 1	Isolat BAL 2	Rata-rata
0	62 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶	61 x 10 ⁶
1	46 x 10 ⁶	47 x 10 ⁶	46 x 10 ⁶
2	50 x 10 ⁶	52 x 10 ⁶	51 x 10 ⁶
3	152 x 10 ⁶	145 x 10 ⁶	148 x 10 ⁶
4	582 x 10 ⁶	594 x 10 ⁶	588 x 10 ⁶
5	273 x 10 ⁶	266 x 10 ⁶	269 x 10 ⁶
6	612 x 10 ⁶	610 x 10 ⁶	611 x 10 ⁶
24	20 x 10 ⁶	16 x 10 ⁶	18 x 10 ⁶

Tabel 3. menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL mencapai titik optimum pada penyimpanan 4 jam kemudian terjadi penurunan pada jam ke 5 kemudian secara perlahan naik lagi pada 6 jam berikutnya dan selanjutnya terus turun sampai pada penyimpanan 24 jam. Pada penyimpanan 6 jam, rata-rata jumlah BAL yang didapat adalah 612 x 10⁶ CFU/g. Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang berisi isolat BAL mampu berkembang dan dibiarkan pada suhu ruang sampai 4 jam

dan 6 jam penyimpanan kemudian sampel tersebut dapat disimpan pada suhu -5 °C (refrigerator) untuk menghindari kematian BAL secara bertahap setelah 6 jam penyimpanan. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil Mardalena *et al.*, (2015) bahwa pertumbuhan BAL kulit nenas mencapai titik optimum pada penyimpanan 6 jam kemudian terjadi penurunan secara drastis. Pada penyimpanan 6 jam, rata-rata jumlah BAL yang didapat adalah 102 x 10⁸ CFU/g.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Kultur BAL

Grafik pada Gambar 2 diatas terlihat bahwa fase pertumbuhan BAL terdiri dari 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Urnemi *et al*, 2012). Pada fase lag peningkatan jumlah bakteri berlangsung lambat hal ini disebabkan bakteri sedang melakukan proses aklimatisasi terhadap kondisi lingkungan (pH, suhu dan nutrisi). Fase lag pada BAL potensial penelitian terjadi selama jam ke-0 sampai jam ke-4. Fase selanjutnya adalah fase eksponensial yang merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat. Pada pertumbuhan isolat BAL penelitian, fase eksponensial terjadi pada jam ke 4 sampai jam ke 7. Fase berikutnya adalah fase stasioner pada fase ini tidak terjadi penambahan bakteri karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Fase pertumbuhan stasioner terjadi mulai jam ke-8 sampai jam ke-24. Penurunan ini disebabkan karena nutrisi

dalam media dan cadangan energi mulai menipis.

KESIMPULAN

Isolat bakteri asam laktat tempoyak asal Jambi menunjukkan karakteristik khusus yang dimiliki bakteri asam laktat dengan bentuk koloni bulat, warna koloni putih susu, Gram positif (+), reaksi katalase negatif, sel berbentuk batang pendek dan selnya berwarna ungu tua. Isolat BAL mampu dibiarkan pada suhu kamar hanya selama 6 jam penyimpanan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Kementerian Riset dan Teknologi yang telah menyediakan dana program penelitian Hibah Bersaing Tahun pertama dengan Nomor Kontrak: 107/UN21/PL/2014 Tanggal 10 Maret 2014

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M.A., J. Zakiah, and Ng.L. Khim. 2004. Effect of salt on tempoyak fermentation and sensory evaluation. *Journal of Biology Science*, 4: 650-653.
- Amiza, M.A., J. Zakiah, Ng.L. Khim, and K.W. Lay. 2006. Fermentation of tempoyak using isolated tempoyak culture *Research Journal of Microbiology*, 1: 243-254.
- Antarababa, M.A., N.K. Tero, T.J. Hariadi dan B. Santoso. 2009. Pengaruh taraf iInokulum bakteri asam laktat dari ekstrak rumput terfermentasi terhadap kualitas fermentasi silase rumput raja. *JITV*. 14 (4) : 278-283.
- Battcock, M. and S.A. Ali. 1998. Fermented fruits and vegetables, a globalperspective *FAO Agricultural Services Bulletin No 134*, Rome, Italy.
- Djide, M.N dan E. Wahyuddin. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu dan Potensinya dalam Penurunan Kadar Kolesterol Secara *In-vitro*. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 12 (3).
- Dwidjoseputro, D. 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan
- Fardiaz, S., 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Gandjar, I. 2000. Fermentations of the far east. In RK Robinson,.C.A. Batt P.D. Patel, (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. New York: Academic Press. 767-773.
- Hanum, S. 1989. Tinjauan Awal pada Komposisi Kimia tempoyak yang Beredar di Pasar Kotamadya Palembang. Laporan Penelitian Universitas Sriwijaya, Palembang
- Hayakawa, K. 1992. Classification and Actions of Food Microorganism with Particular Reference to Fermented Foods and Lactic Acid Bacteria. dalam Yuji Nakazawa and Akiyoshi Hosono (Ed.). *Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Sciences*. London: Elsevier Science Publishers, Ltd.
- Ketsa, S. and T. Daengkanit. 1998. Physiological changes during postharvest ripening of durian fruit (*Durio zibethinus* Murray), *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73: 575-577.
- Leisner, J.J., M. Vancanneyt, G. Rusul, B. Pot, K. Lefebvre, A. Fresi, and L.K. Tee. 2001. Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 149-157.
- Leisner, J.J., M.Vancanneyt, K. Lefebvre, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, N.E. Vilalta, G. Rusul, and J. Swings. 2002. *Lactobacillus durianis* sp.nov., isolated from an acid-fermented condiment (tempoyak) in Malaysia. *International Journal of. Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 927-931.

- Mardalena, S. Syarif dan S. Erina. 2015. Karakteristik dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Limbah Nenas sebagai Kandidat Probiotik untuk Ternak Ruminansia. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun 2015. LPPM Universitas Jambi.
- Mustopa, A. 2009. Koleksi Protokol Laboratorium Virologi Molekuler. Pusat Penelitian Bioteknologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.
- Nur, H. S., 2005. Pembentukan asam organik oleh isolat bakteri asam laktat pada media ekstrak daging buah durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Bioscientiae*, 2 (1): 15-24.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan Jr, and N. R. Krieg. 1993. *Microbiology*. 5th ed. New Delhi (India): Tata McGraw-Hill.
- Purwati, E., S. Syukur dan Z. Hidayat. 2005. *Lactobacillus* sp. Isolasi dari Bioviphitomega sebagai Probiotik. Di dalam Prooceding LIPI, Jakarta.
- Ridwan, R., S. Ratnakomala, G. Kartina dan Y. Widyastuti. 2005. Pengaruh penambahan dedak padi dan *Lactobacillus plantarum* IBL-2 dalam pembuatan silase rumput gajah (*Pennisetum purpureum*). *Media Peternakan*. Hal : 117-123.
- Santoso, B., B. J.T. Hariadi, H. Manik dan H. Abubakar. 2009. Pengaruh penambahan bakteri asam laktat yang dipreparasi dari ekstrak rumput terfermentasi terhadap kualitas silase rumput raja dan benggala. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, M.E., Holt, J.G. (ed.) 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Surono, I.S. 2004. Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan. PT Zitri. Cipta Karya, Jakarta.
- Urnemi. 2012. Isolasi, penentuan antimikrobal dan karakterisasi molekuler bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* Lin) asal Sumatera Barat dan aplikasinya untuk menunjang kesehatan masyarakat. Disertasi Universitas Andalas Padang.
- Urnemi, S. Syukur, E. Purwati, I. Sanusi, Jamsari. 2012. Potensi bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik penghasil bakteriosin terhadap mikroba patogen asal fermentasi kakao varietas *Criollo*. *Jurnal Riset teknologi Industri (LIPI)*. 6 (13).