

INAKTIVASI TERMAL SPORA *BACILLUS SUBTILIS* DALAM JUS NANAS

Sakinah Rhajani¹⁾, Evelyn²⁾, Sri Rezeki Muria³⁾

¹⁾Mahasiswa Jurusan Teknik Kimia, ²⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia, ³⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia

Laboratorium Teknologi Bioproses

Program Studi Sarjana Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Riau

Kampus Bina Widya Jl. HR. Soebrantas KM 12,5 Pekanbaru, 28293

E-mail : sakinah.rhajani4455@gmail.com

ABSTRACT

Bacillus subtilis is a spore-forming bacterium and has been identified as spoilage in fruit-based medium such as pineapple and tomato. Spores of *B. subtilis* are heat resistant bacteria. Food preservation by thermal processing is a conventional method and is still used today. The purpose of this study was to determine the effect of temperature (T: 90 °C, 95 °C, 100 °C) and soluble solid 12 °Brix on the thermal inactivation of *B. subtilis* spores. Then, the kinetics of first order was also investigated in thermal process of *B. subtilis* in pineapple juice (D-value and the z- value). The D-values obtained at SS 12 ° Brix and temperatures of 90, 95, 100 °C were 13.38; 6.75, and 2.11 minutes. It was shown that higher temperature resulted in the decreasing of the time needed to inactivate the spores. Higher resistance of the spores were observed at higher SS. The results of this study indicate the importance of temperature and soluble solid for heat resistance of *B. subtilis* spores in pineapple juice.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Inactivation, Pineapple juice, Resistance, Spores

1. PENDAHULUAN

Bacillus subtilis pertama kali dideskripsikan oleh Cohn pada tahun 1872 yang disebut *Vibrio subtilis* oleh Ehrenberg pada 1835 yang selanjutnya disebut dengan *B. subtilis*. Cohn menunjukkan bahwa spora dari bakteri tersebut mempunyai resistensi yang lebih dibandingkan sel vegetatifnya (Hatmanti, 2000). *B. subtilis* merupakan bakteri gram positif yang dapat membentuk endospora yang berbentuk oval di bagian sentral sel. Spesies ini dapat bertahan pada kondisi lingkungan tertentu, yaitu pada suhu -5°C sampai 75°C, dengan tingkat keasaman (pH) antara 2-8. Pada kondisi yang sesuai dan mendukung, populasinya akan menjadi dua kali banyaknya selama waktu tertentu (Djaenuddin dan Muis, 2015).

Simpson (2009) melaporkan dalam bukunya “*Engineering Aspects of Thermal Food Processing*” bahwa beberapa jenis bakteri *bacillus* penghasil endospora yang mempunyai sifat tahan terhadap panas, diantaranya adalah *B.*

subtilis, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, dan *B. coagulans*. Sifat tahan panas (*heat resistance*) memiliki dampak buruk terhadap produk minuman ringan dan produk buah-buahan karena bakteri tersebut masih dapat hidup setelah diberikan perlakuan panas dan menyebabkan kerusakan pada produk.

Menurut Rodriguez dkk (1993), spesies *bacillus* adalah kontaminan umum tanah dan dapat ditemukan pada tomat, sayuran dan buah-buahan lainnya. Ketahanan panas spora bakteri dipengaruhi oleh banyak faktor seperti spesies, *strain*, media sporulasi, dan pH. Biasanya spora yang ditemukan di alam lebih tahan panas daripada spora yang diproduksi di laboratorium. Spesies *bacillus* dan beberapa spesies jamur dapat meningkatkan pH tomat dan jus tomat menjadi lebih besar dari pH 4,8 (produk tomat normal memiliki pH mulai dari 4 hingga 4,7). Oleh karena itu, kelangsungan hidup dan pertumbuhan spesies *bacillus* dalam produk tomat dapat meningkatkan

pH pada asam rendah.

Pada industri pengolahan jus buah, teknik pasteurisasi yang umum dilakukan adalah pada temperatur 90 °C selama 1,5 menit untuk jus nanas, temperatur 90 °C - 95 °C selama 15 – 30 detik untuk jus jeruk, dan 77 °C - 88 °C selama 25 – 30 detik untuk jus apel (Petruzzi dkk., 2017). Kondisi pasteurisasi ini belum tentu cukup untuk menginaktivasi spora dari *B. subtilis*, sehingga bakteri ini kemungkinan dapat tetap hidup dan tumbuh dalam produk sehingga mengkontaminasi buah-buahan dan merusak produk. Oleh karena itu, diperlukan pengolahan yang tepat pada industri jus nanas, mengingat Provinsi Riau mempunyai potensi penghasil buah nanas yang cukup tinggi menempati urutan keempat dengan jumlah total produksi mencapai 1,7 juta ton per tahun (BPS, 2015).

Inaktivasi spora *B. subtilis* pada beberapa olahan buah-buahan dapat dilakukan dengan beberapa proses, salah satunya adalah dengan proses termal. Proses termal merupakan metode konvensional yang paling banyak diaplikasikan baik skala industri maupun skala rumah tangga hingga saat ini. Kelebihan dari proses ini adalah operasionalnya yang murah, sederhana dan dapat diaplikasikan oleh masyarakat.

2. BAHAN DAN METODOLOGI

2.1 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur bakteri *Bacillus subtilis* koleksi INA-CC LIPI Cibinong Jawa Barat, Nutrient Agar (NA), MnSO₄, *Buffered Peptone Water*, aqua DM, buah nanas alkohol dan spritus. Sedangkan alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *waterbath*, termometer, *Autoclaf All America* model 1925/KY-23D, *Vortex Mixer Genie 2TM*, inkubator, *blender*, *centrifuge*, mikropipet, lampu bunsen, batang L, pH meter, jarum ose, cawan petri, *glass wolle*, timbangan analitik, tabung reaksi dan alat-alat standar laboratorium lainnya sesuai prosedur kerja.

2.2 Produksi Spora *B. subtilis*

Sporulasi ini menggunakan metode dari Evelyn dan Silva (2015a). Larutan MnSO₄ disiapkan sebanyak 0,3% dengan cara melarutkan padatan MnSO₄ ke dalam aquades. Kemudian disiapkan 100 ml *Nutrient Agar* (NA) ke dalam erlenmeyer dan sterilisasi pada 121°C selama 15 menit. Media yang telah cair didinginkan sampai suhu 50°C. Pada kondisi steril tambahkan 0,1 ml MnSO₄. Media yang telah dicampurkan dengan MnSO₄ dituangkan ke dalam cawan petri. Media diinkubasi selama 3 hari pada suhu 35°C dan dipastikan tidak ada tanda-tanda kontaminasi. Selanjutnya bakteri *B. subtilis* diinokulasi pada media dan diinkubasi untuk melihat pertumbuhan sel vegetatif selama 2 hari. Tahap sporulasi (pembentukan spora) dimulai dengan menginkubasi bakteri *B. subtilis* pada media selama 14 hari pada suhu 35°C sampai spora dihasilkan. Spora yang dihasilkan dapat dipanen dengan cara sentrifugasi pada 4000 rpm untuk 10 menit dan dicuci dengan *sterile distilled water* sampai larutannya bening. Pelet/endapan spora disimpan dalam 100 ml *sterile distilled water* dan dimasukkan ke dalam *refrigerator* pada temperatur 2-4°C hingga digunakan.

2.3 Proses Termal

Metode ini dilakukan pada tiga suhu berbeda yaitu 90, 95 dan 100 °C. Pertama, *waterbath* dipanaskan dengan jus nanas 12 °Brix yang telah diinokulasi dengan spora bakteri *B. subtilis* pada tabung reaksi dan dimasukkan ke dalam *waterbath*. Kemudian dilakukan pengambilan sampel dalam waktu tertentu. Kemudian sampel-sampel didinginkan dalam air es lalu dilakukan penghitungan/pencacahan spora. Eksperimen diulang kembali pada masing-masing temperatur dua kali pengulangan eksperimen dengan sampel duplo tiap kalinya.

2.4 Pencacahan Spora

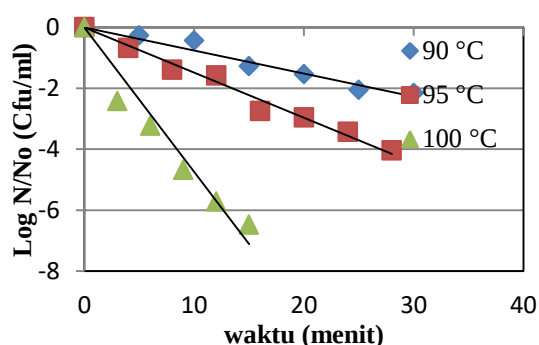
Sampel suspensi dari inokulasi spora *B. subtilis* dalam jus nanas hasil

proses termal dihitung konsentrasi spora atau jumlah koloni dengan metode *spread plate* pada *Nutrient Agar* (NA). Sebelumnya dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan larutan *Buffered Peptone Water* (BPW). Sebanyak 1 ml suspensi spora dimasukkan kedalam 9 ml *Buffered Peptone Water* (BPW) 0.1% (w/v). Setiap pengenceran tabung dicampur berulang kali menggunakan *mixer vortex* berkecepatan tinggi untuk menghasilkan suspensi spora homogen. Cawan petri yang terdapat *Nutrient Agar* (NA) yang diinokulasi dengan *B. subtilis* kemudian dibalik dan diinkubasi pada 35°C selama 2 hari hingga koloni terbentuk pada kisaran 30 hingga 300 koloni (Evelyn dan Silva, 2015a). Koloni yang terbentuk dihitung konsentrasinya dan dinyatakan dalam CFU/ml jus.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Temperatur terhadap Reduksi Logaritmik Spora *Bacillus subtilis*

Pada penelitian ini menggunakan metode *spread plate* untuk pencacahan jumlah spora. Dalam proses termal tersebut digunakan 90 °C, 95 °C, dan 100 °C dengan tingkat kemanisan 12 °Brix. Adapun hasil reduksi logaritmik spora akibat pengaruh temperatur dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh Temperatur Terhadap Reduksi Logaritmik Spora *B. subtilis* dalam Jus Nanas 12 °Brix.

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat bahwa waktu yang dibutuhkan untuk pengurangan jumlah log spora *B. subtilis* yang sama pada jus nanas semakin

cepat dengan meningkatnya temperatur. Pada SS 12 °Brix, untuk mereduksi 1 log spora dalam jus nanas dibutuhkan waktu 13,39 menit pada temperatur 90 °C; 6,75 menit pada temperatur 95 °C dan 2,11 menit pada temperatur 100 °C.

Rodriguez dkk. (1993) melakukan penelitian reduksi spora *B. subtilis* dalam jus tomat (tanpa penambahan sukrosa), dimana untuk mereduksi 1 log spora *B. subtilis* di dalam jus tomat tersebut dibutuhkan waktu 29,5 menit pada temperatur 90 °C; 15,8 menit pada temperatur 95 °C dan waktu 5,7 menit pada temperatur 100 °C. Ini menunjukkan bahwa spora *B. subtilis* memiliki tingkat resistensi terhadap panas yang lebih besar dibandingkan pada penelitian ini (jus nanas 12 °Brix). Namun, hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Condon dkk. (1989) pada *meat ball*, yaitu waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi 1 log spora *B. subtilis*, pada temperatur 95 °C adalah 7,10 menit dan 1,39 menit untuk temperatur 100 °C. Hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa reduksi spora dalam makanan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis bakteri, temperatur, jenis makanan (*food matrix*), dan metode termal yang digunakan.

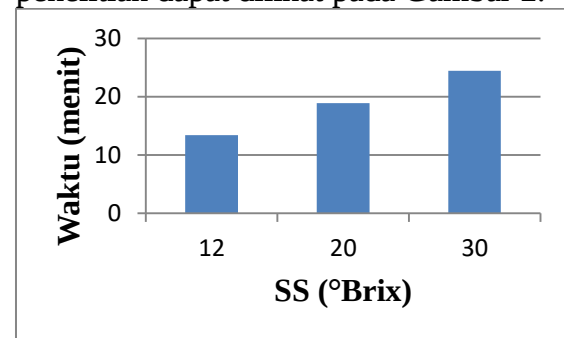
Berdasarkan hasil dari penelitian dapat dilihat bahwa peningkatan temperatur pemanasan sangat mempengaruhi jumlah spora *B. subtilis* di dalam jus nanas, artinya pemberian panas dapat mempengaruhi komponen-komponen penyusun sel/spora. Menurut Murwani (2015), di dalam spora terdapat kalsium, air dan asam dipikolinik (*dipicolinic acid*). Asam dipikolinik ini merupakan bahan kimiawi 5 - 15% dari berat kering spora dan bertanggungjawab dalam resistensi spora terhadap panas. Pemanasan menyebabkan kematian spora dan pelepasan DPA dari dalam inti sel. Mekanisme kematian spora terjadi apabila spora kehilangan senyawa DPA yang berlangsung lambat selama perlakuan panas, selanjutnya terjadi perubahan mendadak dalam struktur protein spora.

Dapat disimpulkan bahwa, hal yang memungkinkan terjadi pada proses kematian spora *B. subtilis* oleh panas adalah adanya pelepasan DPA yang berlangsung secara lambat dan denaturasi protein sehingga dinding sel kehilangan nutrisi yang menyebabkan kematian pada spora. Akibatnya, semakin tinggi panas yang diberikan maka akan semakin cepat proses inaktivasi spora *B. subtilis* di dalam jus, namun proses pengolahan juga harus mempertimbangkan efek atau pengaruh perlakuan panas terhadap kualitas jus nanas. Pada industri pengolahan jus buah, teknik pasteurisasi yang umum dilakukan adalah pada temperatur 90 °C selama 1,5 menit untuk jus nanas, temperatur 90 °C - 95 °C selama 15 – 30 detik untuk jus jeruk, dan 77 °C - 88 °C selama 25 – 30 detik untuk jus apel (Petruzzi dk., 2017). Ini menandakan bahwa teknologi yang biasa digunakan di industri belum cukup untuk inaktivasi spora mikroorganisme (pada penelitian ini untuk temperatur 90 °C dengan SS 12 °Brix dibutuhkan waktu 13,39 menit untuk mereduksi 1 log spora). Sehingga diperlukan proses yang sesuai supaya proses inaktivasi dalam industri menghasilkan produk yang berkualitas tinggi.

3.2 Pengaruh Soluble Solid (SS) atau Tingkat Kemanisan terhadap Reduksi Logaritmik Spora *B. subtilis*

Pada penelitian ini menggunakan variasi Soluble Solid (SS) yaitu 12 °Brix, 20 °Brix dan 30 °Brix untuk temperatur 90 °C. Dimana SS merupakan total kandungan gula terlarut dari suatu larutan yang dalam hal ini adalah total kandungan gula sukrosa di dalam jus nanas. Proses ini bertujuan untuk menyelidiki pengaruh inaktivasi spora terhadap pemberian variasi SS di dalam jus nanas. Menurut Evelyn dan Silva (2016a), umumnya sebesar 2 atau 3D (pengurangan mikroorganisme dalam siklus logaritma) mikroorganisme ditemukan mengkontaminasi jus buah sehingga sebaiknya minimal 3 log spora harus

direduksi atau diinaktivasi. Adapun hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh Variasi SS Terhadap Reduksi 3 Logaritmik (3D) Spora *B. subtilis* pada temperatur 90 °C.

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat waktu pengurangan sebesar 3 log spora *B. subtilis* dalam jus nanas pada temperatur 90 °C; SS 12 °Brix terjadi selama 40,16 menit; 56,60 menit untuk SS 20 °Brix dan 73,35 menit untuk SS 30 °Brix. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi SS maka semakin tinggi ketahanan panas spora *B. subtilis* di dalam jus nanas, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk mengurangi populasi spora menjadi semakin lama dengan meningkatnya SS pada temperatur yang sama. Penelitian tentang inaktivasi spora *B. subtilis* dengan variasi SS pada berbagai media sampai saat ini belum pernah dilakukan. Namun beberapa penelitian terdahulu dengan spora jenis lainnya telah menunjukkan bahwa resistensi spora semakin meningkat dengan pengaruh kenaikan SS. Silva dkk. (1999) telah melakukan penelitian pada *A. acidoterrestris* dengan temperatur 85 - 90 °C, ini membuktikan bahwa saat SS dinaikkan (5-60 °Brix) maka ketahanan panas *A. acidoterrestris* didalam malt extract broth meningkat. Kecenderungan seperti ini juga ditunjukkan oleh spora *Bischoffomyces nivea* dan *Neosartorya fischeri* di dalam jus nanas dan pepaya, dimana ketahanan panas dapat meningkat saat SS dinaikkan (13-27 °Brix) (Souza dkk., 2017).

Penambahan sukrosa merupakan hal yang umum dilakukan dalam industri

buah. Penambahan sukrosa kedalam jus nanas bertujuan untuk mengurangi *water activity* (a_w), dimana a_w merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi ketahanan termal spora mikroorganisme. *Water activity* yang tinggi menunjukkan kadar air yang juga meningkat. Kadar air dinyatakan dalam persen (%) pada skala 0 - 100, sedangkan nilai a_w dinyatakan dalam angka decimal pada skala 0 - 1,0. Menurut Buckle dkk. (2007) bahwa penambahan sukrosa kedalam bahan akan mengurangi a_w yang ada didalamnya. Semakin besar konsentrasi sukrosa yang ditambahkan akan menyebabkan jumlah air yang terikat oleh sukrosa semakin tinggi, sehingga a_w semakin rendah.

Peneliti lain menunjukkan pengaruh a_w pada *S. Typhimurium* dalam larutan sukrosa dengan nilai a_w pada penelitian tersebut adalah sebesar 0,98 dibutuhkan waktu 0,12 menit untuk temperatur 68,3 °C dan jika nilai a_w diturunkan menjadi 0,83 dengan temperatur yang sama maka dibutuhkan waktu 40,2 menit (Doyle dan Mazzota, 2000). Begitu juga dengan penelitian yang dilakukan Villa-Rojas dkk. (2013) pada *S. Enteritidis* dalam *almond* dimana nilai a_w awalnya adalah sebesar 0,95, dibutuhkan waktu 0,42 menit untuk temperatur 68 °C dan waktunya meningkat menjadi 15,2 menit (36 kali) untuk temperatur 70 °C ketika a_w berkurang menjadi 0,60. Ini menunjukkan bahwa semakin besar a_w maka waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi jumlah spora semakin cepat dan begitu juga sebaliknya semakin kecil a_w maka waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi jumlah spora semakin lama. Dari penelitian ini, pada saat a_w jus nanas diturunkan dari 0,993 (12 °Brix) menjadi 0,981 (30 °Brix), maka waktu yang dibutuhkan untuk inaktivasi *B. subtilis* dalam jus nanas pada temperatur 90 °C adalah 40,16 - 73,35 menit.

3.3 Kinetika *First Order* (Nilai *D* dan *z*) Spora *B. subtilis*

Tabel 1. menunjukkan nilai *D* dan *z* spora *B. subtilis* berbagai makanan yang diperoleh dari perhitungan.

Referensi	Produk	Temperatur (°C)	Nilai <i>D</i> (menit)	Nilai <i>z</i> (°C)
Penelitian ini (2019)	<i>Pineapple juice</i>	90	13,39	12,45
		95	6,75	
		100	2,11	
Condon S dkk., (1989)	<i>Meat Ball</i>	90	36,39	7,04
		95	7,10	
		100	1,39	
Condon S dkk., (1992)	<i>Mcllvaine Buffer</i>	90	50,93	9,11
		95	14,39	
		100	4,06	
Molin N dan Snygg B. G. (1967)	<i>Phospate Buffer</i>	90	40,46	12,90
		95	16,58	
		100	6,79	
Lilie M. (2008)	<i>Distilled Water</i>	90	19,10	7,90
		95	4,45	
		100	1,04	
Ababouch L. H dkk., (1995)	<i>Olive Oil</i>	90	2714,6	21,98
		95	1607,7	
		100	952,1	
Ababouch L. H dkk., (1995)	<i>Oil</i>	90	2862,2	17,30
		95	1471,3	
		100	756,3	
Molin N dan Snygg B. G. (1967)	<i>Soya Oil</i>	90	2556,2	21,41
		95	1493,1	
		100	872,2	

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa *B. subtilis* memiliki ketahanan panas atau nilai *D* yang sangat tinggi di dalam makanan. Hasil penelitian ini sebanding dengan Lilie M. (2008) dalam *ditilled water*, namun ketahanan panas *B. subtilis* lebih rendah dibandingkan dengan penelitian lainnya. Ini menunjukkan ketahanan panas sangat dipengaruhi oleh *food matrix*. Dapat dilihat juga bahwa ketahanan spora atau nilai *D* berbanding terbalik dengan temperatur dimana dengan naiknya temperatur maka nilai *D* akan

turun. Sehingga dapat disimpulkan bahwa temperatur memegang peranan penting dalam inaktivasi spora. Adapun hasil perolehan nilai z pada penelitian ini (10 – 13 °C). Nilai z tersebut masih dalam rentang nilai z untuk jus buah pada umumnya, dimana nilai z untuk jus buah berada pada rentang 7,2 – 24,1 °C (Agcam dkk., 2018). Data-data yang diperoleh dari penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi untuk menghitung kecukupan termal pasteurisasi yang dibutuhkan dalam industri.

4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Pengurangan log spora *Bacillus subtilis* semakin cepat dengan meningkatnya temperatur dimana pada SS 12 °Brix untuk mereduksi 1 log spora dalam jus nanas dibutuhkan waktu 13,39 menit pada temperatur 90 °C dan 2,11 menit pada temperatur 100 °C. Namun pengurangan log spora semakin lama dengan meningkatnya SS dimana pengurangan 3 log spora pada temperatur 90 °C; SS 12 °Brix terjadi selama 40,16 menit dan 73,35 menit untuk SS 30 °Brix. Ketahanan panas spora atau *D-value* berbanding terbalik dengan temperatur dimana dengan naiknya temperatur maka nilai *D* akan turun. Nilai *D* pada SS 12 °Brix untuk temperatur 90, 95, dan 100°C berturut - turut adalah 13,38; 6,75, dan 2,11 menit. Sedangkan nilai z yang diperoleh adalah pada rentang 10 -13 °C.

UCAPAN TERIMA KASIH

penulis menyampaikan terima kasih kepada dosen pembimbing dan pihak yang bersangkutan karena telah memberikan masukan dan arahan serta bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ababouch, L. H., Gमित, L., Eddafry, R., & Busta, F. F. 1995. Thermal Inactivation Kinetics of *Bacillus Subtilis* Spore Suspended in Buffer and Oils.. *Journal of Applied Bacteriology*. 78: 669-676.

- Agcam, E., Akyildiz, A & Dundar, B. 2018. *Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices*. Cukurova university, Turkey.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2015. *Produksi Tanaman Buah-buahan*. Badan Pusat Statistika, Jakarta.
- Condon, S & Sala, F. J. 1992. Heat Resistance of *Bacillus subtilis* in Buffer and Foods of Different pH. *Journal of Food Protection*. 55(8): 605-608.
- Condon, S., Bayarte, M & Sala, F. J. 1992. Influence Of The Sporulation Temperature Upon the Heat Resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 73: 251-256.
- Condon, S., Lopez, P., Oria, R & Sala, F. J. 1989. Thermal Death Determination Design and Evaluation of a Thermoresistometer. *Journal of Food Science*. 54: 451-457.
- Djaenuddin, N & Muis, A. 2015. Karakteristik Bakteri Antagonis *Bacillus subtilis* dan Potensinya Sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit Tanaman. *Prosiding Seminar Nasional Serealia*. 489-494.
- Doyle, M.E., Mazzotta, A. S. 2000. Review of Studies on the Thermal Resistance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*. 63(6):779–95.
- Evelyn & Silva, F. V. M. 2015a. Inactivation of *Byssoschlamys Nivea* Ascospores in Strawberry Puree by High Pressure, Power Ultrasound and Thermal Processing. *International Journal of Food Microbiology*. 214: 129-136.
- Evelyn & Silva, F. V. M. 2016a. High Pressure Thermal Processing for the Inactivation of *Clostridium Perfringens* Spores in Beef Slurry. *Innov. Food Science. Emerg. Technol*. 33: 26-31.

- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* SPP. *Oseana*. 27(1): 31-41.
- Lilie, M. 2008. Effect of NaCl on the Resistance of Four *Bacillus* / *Geobacillus* Species. *Journal of Applied Bacteriology*. 73: 251-256.
- Molin, N & Snygg, B. G. 1967. Effect of Lipid Materials on Heat Resistance of Bacterial Spores. *Journal of Applied Bacteriology*. 15(6): 1422-1426.
- Murwani, S. 2015. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. S., Sinigaglia, & Bevilacqua, A. 2017. Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1: 2011-2015.
- Rodriguez, J. H., Cousin, M. A & Nelson, P. E. 1993. Thermal Resistance and Growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in Tomato Juice. *Journal of Food Protection*. 56(2): 165-168.
- Silva, F. M., Gibbs, P., Vieira, M. C & Silva, L. M. 1999. Thermal Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores Under Different Temperature, Soluble Solids and pH Conditions for the Design of Fruit Processes. *International Journal of Food Microbiology*. 51: 95-103.
- Simpson, R. 2009. *Engineering Aspects of Thermal Food Processing*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Souza, B. A., Poltronieri, K. F., Alvarenga, V. O & Pena, E. L. 2017. Modelling of *Byssochamyis nivea* and *Neosartorya fischeri* in Papaya and Pineapple Juices as a Function of Temperature and Soluble Solids Content. *LWT-Food Science and Technology*. 82: 90-95.
- Villa-Rojas, R., Tang, J., Wang, S., Gao, M., Knag, D. H., Mah, J. H., Gray, P., Sosa-Morales, M. E & Lopez-Malo, A. 2013. Thermal Inactivation of *Salmonella enteritidis* PT 30 in Almond Kernels as Influenced by Water Activity. *Journal of Food Protection*. 76(1):26-32.