

Inaktivasi Termal Spora *Bacillus Subtilis* Dalam Jus Nanas

Khaira¹⁾, Evelyn²⁾, Chairul²⁾

¹⁾Mahasiswa Program Studi Teknik Kimia, ²⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia

Laboratorium Teknologi Bioproses

Program Studi Teknik Kimia S1, Fakultas Teknik Universitas Riau

Kampus Binawidya Jl. HR Subrantas Km 12,5 Simpang Baru, Panam,

Pekanbaru 28293

Email: Khairakhaira3108@gmail.com

ABSTRACT

Bacillus subtilis is a spore-forming bacterium and has been identified as spoilage in fruit-based medium such as pineapple. 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 pH (2 and 6) on the thermal inactivation of *B. subtilis* spores. 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 pH. The D-values obtained at pH 2 and temperatures of 90, 95, 100 °C were 11,24; 5,85, and 2.34 minutes, respectively. D-values at pH 6 were; 38,46, 13,70 and 3,55 minutes. The z-values obtained were in the range 9-14 °C. The results of this study indicate the importance of temperature and pH for heat resistance of *B. subtilis* spores in pineapple juice.

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

1. Pendahuluan

Nanas merupakan tanaman yang banyak ditanam di perkebunan Indonesia. Tanaman nanas bisa tumbuh di hampir semua jenis tanah pertanian, selain itu nanas juga dapat tumbuh pada iklim basah maupun kering. Provinsi Riau mempunyai potensi penghasil buah nanas yang cukup tinggi menempati urutan keempat dengan jumlah total produksi mencapai 1,7 juta ton per tahun, hal ini karena Riau memiliki iklim tropis basah dengan rata-rata curah hujan berkisar antara 2.598,7 Mm per tahun yang dipengaruhi oleh musim kemarau dan musim hujan (BPS, 2015). Jus nanas merupakan salah satu minuman buah populer yang dikonsumsi oleh masyarakat Riau. Nanas segar memiliki umur simpan yang pendek, yakni 4-6 hari. Jika pada nanas terdapat kerusakan di bagian permukaan

kulitnya jika disimpan pada suhu ruang akan segera membusuk (Hajare dkk, 2006).

Pembusukan pada jus buah juga dikarenakan terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen, jika manusia mengonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen akan menimbulkan keracunan makanan dan penyakit pada tubuh manusia. Kontaminasi tersebut dapat terjadi pada berbagai tahap seperti dalam proses pengolahan dan dapat pula diperoleh dari kontaminasi lingkungan termasuk polusi air, tanah atau udara (Shahbaz dkk, 2014). Spesies *Bacillus* adalah agen penyebab pembusukan makanan dan beragam penyakit, karena spesies *bacillus* memiliki kemampuan untuk membentuk spora yang sangat tahan panas (Lihua dkk, 2018). *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang umum ditemukan di tanah, air, udara dan

materi tumbuhan yang terdekomposisi. Bakteri ini termasuk kelompok bakteri gram positif, saprofitik, berbentuk batang, aerobik, mampu membentuk spora. Suhu optimal pertumbuhan *B. subtilis* adalah suhu 25–35 °C dan dengan pH 7-8 (Helmi, 2018).

Pasteurisasi termal adalah bentuk perlakuan panas yang relatif ringan yang digunakan untuk menonaktifkan mikroorganisme yang relatif sensitif terhadap panas, seperti bakteri vegetatif, ragi, dan jamur, yang bertanggung jawab atas pembusukan makanan atau keracunan makanan (Agcam dkk, 2018). Tujuan dari perlakuan termal ini adalah untuk membuat produk jus stabil selama periode penyimpanan yang direncanakan. Pasteurisasi termal diidentifikasi sebagai teknologi yang efektif untuk memperpanjang umur simpan produk jus (Aguilo dkk, 2009). Proses pasteurisasi ini juga dipilih karena proses ini dapat dioptimalkan sambil mempertahankan kualitas produk. Dengan demikian, umur simpan jus buah yang diproses secara termal dapat diperpanjang selama beberapa bulan tanpa masalah keamanan atau penurunan kualitas yang penting pada suhu rendah atau suhu kamar. Ketahanan sel terhadap pemanasan dinyatakan dalam nilai D dan nilai Z. Nilai D adalah waktu pada suhu tertentu yang dibutuhkan untuk menurunkan jumlah mikroorganisme sedangkan nilai Z adalah besarnya perubahan suhu yang diperlukan untuk merubah nilai D sebesar satu siklus logaritma.

2. Metodologi Penelitian

2.1 Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur bakteri *Bacillus subtilis* koleksi INA-CC LIPI Cibinong Jawa Barat, *Pepton*, NaCl, Agar, MnSO₄, Ekstrak Ragi, buah nanas dari desa Rimbo Panjang kecamatan Tambang provinsi Riau, dan bahan lainnya sesuai prosedur kerja.

2.2 Alat yang digunakan

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, pH meter model Mettler Toledo, refraktometer, jarum ose, cawan petri, batang L, timbangan analitik, tabung reaksi dan alat-alat standar laboratorium lainnya sesuai prosedur kerja.

2.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini melalui beberapa tahapan dalam pengerjaannya, yaitu:

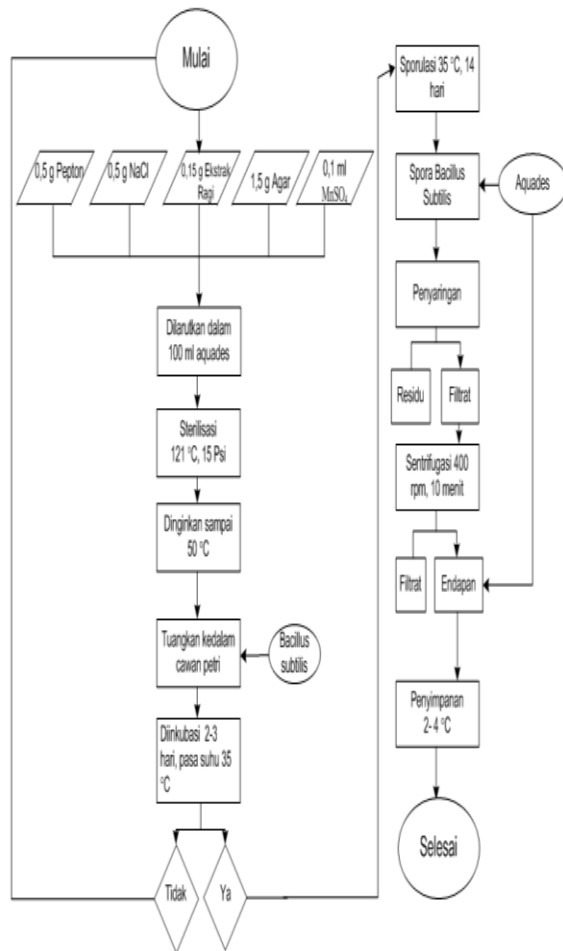
2.3.1 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri merupakan cara untuk merawat bakteri agar tetap baik. Peremajaan dilakukan dengan cara memindahkan bakteri dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru, media pertumbuhan bakteri dibuat dengan campuran 0,5 gr pepton, 0,5 gr NaCl, 0,15 gr ekstrak ragi, dan 1,5 gr agar yang dilarutkan dalam 100 ml aquades. Kemudian campuran disterilisasi pada 121 °C dan tekanan 15 Psi, kemudian diinkubasi selama 2-3 hari.

2.3.2 Sporulasi bakteri *Bacillus subtilis*

Pembentukan spora (sporulasi) pada bakteri sangat tergantung pada kondisi lingkungan, seperti ketersediaan nutrisi khususnya karbon, nitrogen dan fosfor, serta perubahan suhu dan juga pH. Proses sporulasi dapat dilihat pada Gambar 2.1. Persiapkan 0,5 gram pepton, 0,5 gram NaCl dan 0,15 gram ekstrak ragi juga 1,5 gram agar kemudian dilarutkan dalam 100 ml akades dan Persiapkan 0.3% larutan MnSO₄ dengan melarutkan padatan MnSO₄ dalam aquades, tambahkan 0,1 ml MnSO₄ yang telah dibuat dan panaskan sampai larut di dalam Erlenmeyer kemudian sterilisasi pada 121 °C selama 15 menit. Media yang telah cair dituangkan kedalam cawan petri. Media diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 35 °C untuk melihat pertumbuhan sel vegetatif dan

dipastikan tidak ada tanda-tanda kontaminasi.



Gambar 2.1 Blok diagram sporulasi bakteri *B. subtilis*

Tahap sporulasi (pembentukan spora) di mulai dengan menginkubasi pada media selama 14 hari pada suhu 35 °C sampai spora dihasilkan (pengamatan dengan mikroskop dimana lebih dari 90% sel vegetatif telah bersporulasi membentuk spora). Terakhir spora dipanen dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit dan dicuci 3 kali dengan akuades. Pelet/endapan spora di simpan dalam 100 ml akuades dan disimpan di *refrigerator* pada suhu 2-4 °C hingga digunakan.

2.3.3 Pembuatan Jus Nanas

Buah nanas segar dikupas lalu dibersihkan dari pengotor dan ditimbang sebanyak 1 kg. Dipotong kecil, lalu

dimasukkan kedalam *blender*. Kemudian diukur volume jus yang didapat dengan gelas ukur. Dilakukan uji pH dengan alat pH meter. Jus nanas ini digunakan sebagai media perlakuan inaktivasi spora *B. subtilis*.

2.3.4 Inokulasi Jus Nanas

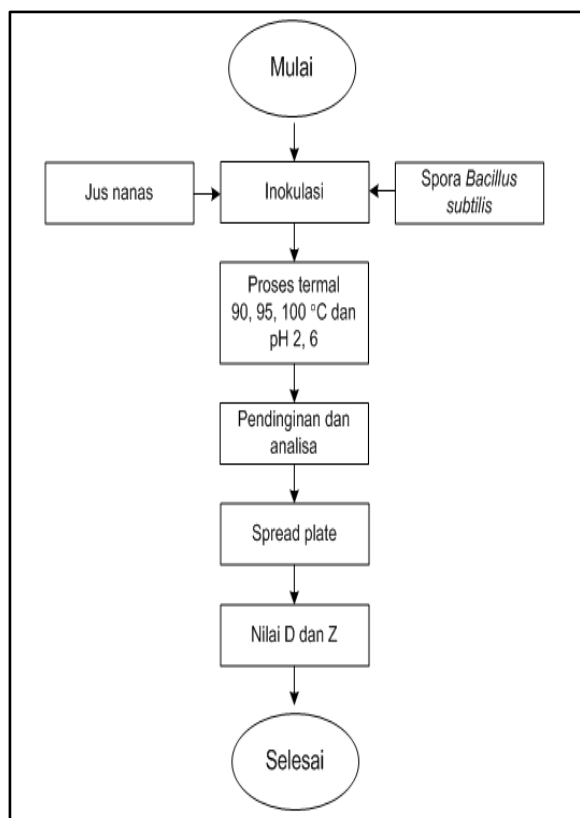
Jus nanas yang telah dibuat digunakan sebagai medium suspense untuk menginaktivasi spora *B. subtilis*. Spora *B. subtilis* diambil sebanyak 1 ml lalu diinokulasi kedalam 9 ml jus nanas sehingga didapat konsentrasi awal spora (N_0). Dan kemudian dilakukan perhitungan spora.

2.3.5 Inaktivasi Spora dengan Proses Termal

Metode ini dilakukan pada tiga suhu berbeda yaitu 90, 95 dan 100 °C. Pertama, *waterbath* dipanaskan hingga suhu 90 °C lalu sampel jus nanas pH 2 dan 6 yang telah diinokulasi dengan spora bakteri *B. subtilis* pada tabung reaksi, dimasukkan kedalam *waterbath* selama 0, 3, 6, 9, 12 hingga 21 menit. Kemudian sampel-sampel dikeluarkan dan didinginkan dalam air es lalu dilakukan penghitungan/ pencacahan spora. Prosedur diulang dengan variasi suhu 95 dan 100 °C dengan pH masing-masing 2, dan 6. Proses inaktivasi dapat dilihat pada Gambar 2.2.

2.3.6 Pencacahan Spora

Suspensi dari inokulasi spora *B. subtilis* dan jus nanas hasil proses termal digunakan untuk penentuan 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). Siapkan 6 tabung reaksi yang sudah diisi dengan 9 ml larutan BPW kedalam setiap tabung. Kemudian diambil sebanyak 1 ml suspense *B. subtilis* lalu dicampur dengan tabung



Gambar 2.2 Blok diagram inaktivasi termal spora bakteri *B. subtilis*

pengenceran 10^{-1} dan dihomogenkan menggunakan *mixer vortex*. Dari tabung 1 diambil sebanyak 1 ml dengan pipet *ependorf* kemudian dipindahkan ke tabung pengenceran 10^{-2} lalu dihomogenkan. Dan seterusnya hingga tabung terakhir dari seri pengenceran. Setelah itu diambil 0,1 ml hasil pengenceran menggunakan pipet *Eppendorf* dari pengenceran 10^{-6} sampai pengenceran 10^{-2} dan diteteskan pada cawan petri yang telah berisi *Nutrient Agar* (NA) untuk ditanam dengan metode *spread plate* kemudian diratakan dengan metode sebar menggunakan batang L dan diinkubasi pada 35°C selama 24–36 jam. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung koloni *B. subtilis* yang tumbuh pada media dengan *colony counter*. Tabung yang dipilih adalah tabung yang memiliki jumlah koloni yang terbentuk pada kisaran 30 hingga 300 koloni (Radji, 2010). Koloni yang terbentuk

dihitung konsentrasinya dan dinyatakan dalam CFU/ml jus.

2.3.6 Analisa Data

Jumlah koloni spora yang hidup hasil pencacahan dengan *spread plate* (dinyatakan dalam $\text{Log } N/N_0$, (CFU/ml)) diplotkan terhadap waktu pemanasan (t , menit) pada tiga suhu dan pH yang berbeda. Grafik regresi antara t vs. $\text{Log } N/N_0$ digunakan untuk menghitung nilai D yaitu waktu (menit) pada suhu tertentu yang diperlukan untuk menurunkan jumlah spora atau sel vegetative tertentu sebesar 90% atau sebesar satu logaritmik dalam siklus logaritma pengurangan mikroorganisme, dimana merupakan nilai invers dari *slope* pada kurva. Nilai Z yaitu besarnya perubahan suhu yang diperlukan untuk merubah nilai D sebesar 90% atau satu siklus logaritma yang diperoleh dari *inverse slope* plot antara suhu terhadap logaritmik nilai D . Untuk mendapatkan tingkat keakuratan data, jumlah koloni spora didapatkan dari rata-rata dua kali percobaan. Koefisien determinasi (R^2) dan standar error (SE) dalam penentuan nilai parameter kinetika *first order* (D dan Z) juga akan diberikan dengan menggunakan Microsoft Excel (2010).

3. Hasil dan Pembahasan

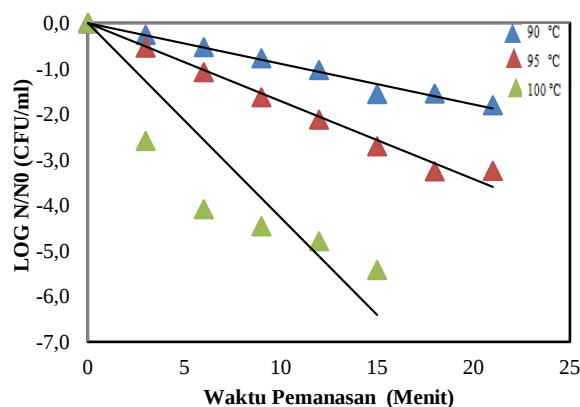
3.1 Pengaruh Suhu terhadap Reduksi Logaritmik Spora *Bacillus subtilis*

Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang mampu membentuk spora. Apabila kondisi tidak sesuai bagi pertumbuhannya misalnya karena suhu tinggi, tekanan fisik dan kimia, atau kadar nutrisi, bakteri akan membentuk spora. Proses terbentuknya spora pada *B. subtilis* akan dimulai ketika persediaan nutrisi untuk bakteri mulai habis atau kondisinya yang tidak sesuai (Higgins dan Dworkin, 2012).

Pada penelitian ini dilakukan proses termal berupa pemanasan di dalam unit *waterbath* bertujuan untuk melihat

kemampuan/ketahan spora terhadap perlakuan panas sekaligus untuk mereduksi jumlah populasi spora *Bacillus subtilis* di dalam jus nanas. Variasi suhu yang digunakan adalah 90 °C, 95 °C, dan 100 °C. Adapun hasil reduksi logaritmik spora terhadap variasi suhu dapat dilihat pada Gambar 3.1.

Berdasarkan Gambar 3.1 dapat dilihat bahwa yang dibutuhkan untuk mengurangi jumlah log spora *B.subtilis* yang sama pada jus nanas semakin cepat dengan meningkatnya suhu. Misalnya pada pH 2, untuk mereduksi 1 log spora dalam jus nanas dibutuhkan waktu 7,25 menit pada suhu 90 °C, 4,04 menit pada suhu 95 °C dan 1,87 pada suhu 100 °C.



Gambar 3.1 Pengaruh suhu terhadap reduksi logaritmik Spora *B. subtilis* dalam jus nanas.

Rodriguez dkk. (1993) melakukan penelitian reduksi spora *B. subtilis* dalam jus tomat (pH 4,4) dimana untuk mereduksi 1 log spora *B. subtilis* di dalam jus tomat tersebut dibutuhkan waktu 29,5 menit pada suhu 90 °C; 15,8 menit pada suhu 95 °C dan waktu 5,7 menit pada suhu 100 °C. Ini menunjukkan bahwa spora *B. subtilis* dalam jus tomat memiliki tingkat resistensi terhadap panas yang lebih besar dibandingkan pada penelitian ini (di dalam jus nanas. Namun, hasil penelitian pada jus nanas ini hampir sama dengan hasil penelitian Thomas dkk. (2005) pada jus jeruk (pH 3,8) yaitu waktu yang dibutuhkan

untuk mereduksi 1 log spora *B. subtilis*, pada suhu 90 °C selama 5,94 menit; 2,74 menit (95 °C) dan 1,27 menit untuk suhu 100 °C. Hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa reduksi spora dalam makanan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis bakteri, suhu, jenis makanan (*food matrix*), dan juga pH produk tersebut.

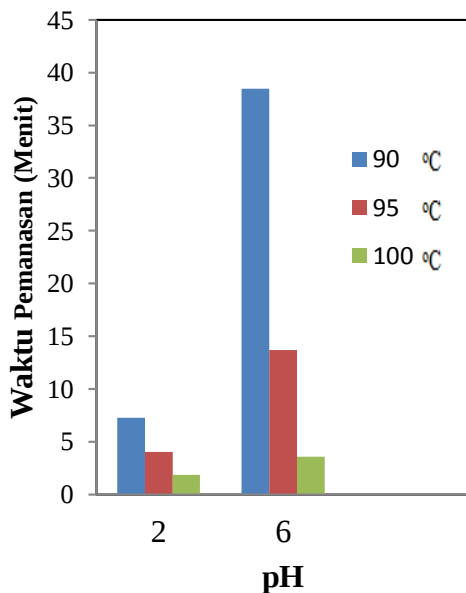
Berdasarkan hasil dari penelitian dapat dilihat bahwa peningkatan suhu pemanasan sangat mempengaruhi jumlah spora *B.subtilis* di dalam jus nanas, artinya pemberian panas dapat mempengaruhi komponen-komponen penyusun sel/spora. Menurut Murwani. (2015) di dalam spora terdapat kalsium, air dan asam dipikolinik (*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 suhu 90 °C selama 1,5 menit untuk jus nanas, suhu 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). Ini menandakan bahwa teknologi yang biasa digunakan di industri belum cukup untuk inaktivasi spora mikroorganisme.

3.2 Pengaruh pH Jus Nanas terhadap Waktu Reduksi satu Logaritmik Spora *B. subtilis*

Salah faktor utama yang mempengaruhi ketahanan panas adalah pH. Pengaruh pH terhadap resistensi termal spora, menurut data yang telah dipublikasikan sebagian besar penulis telah mengungkapkan bahwa pengasaman media menyebabkan penurunan resistensi panas mikroba (Palop dkk, 1999). Pengaruh pH terhadap reduksi logaritmik spora *B. subtilis* dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Pengaruh pH terhadap waktu reduksi logaritmik Spora *B. subtilis*

Berdasarkan Gambar 3.2 dapat dilihat waktu pengurangan sebesar 1 log spora *B. subtilis* dalam jus nanas menunjukkan bahwa semakin tinggi nilai pH maka akan semakin tinggi ketahanan panas spora *B. subtilis* di dalam jus nanas, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk mengurangi populasi spora menjadi semakin lama

dengan meningkatnya nilai pH pada suhu yang sama. Sewaktu bakteri mengalami pertumbuhan, pH dalam media mempengaruhi protein (enzim dan sistem transpor) yang terdapat di dalam membran sel. Struktur protein akan berubah bila pH dalam media berubah. Bakteri memiliki enzim yang berfungsi sempurna pada pH tertentu. Bila terjadi penyimpangan pH, pertumbuhan dan metabolisme bakteri dapat terhenti. Jika pH asam, maka terjadi penghambatan transport ion-ion esensial karena permeabilitas membran sel terhadap ion hydrogen naik. Akibatnya sel tidak dapat menghasilkan ATP, terjadi kegagalan proses respirasi, pertumbuhan lambat, hingga akhirnya mati (Intan, 2006).

Penelitian yang dilakukan oleh Palop dkk. (1999) sebanding hasilnya dengan yang dilakukan pada penelitian ini (dalam jus nanas). Besarnya pengaruh pH tergantung pada suhu perlakuan dan waktu reduksi logaritmik lebih besar pada suhu pemanasan yang lebih rendah.

3.3 Kinetika Orde Pertama (Nilai D dan Z) Spora *Bacillus Subtilis* dalam Jus Nanas

Proses pemanasan secara komersial umumnya didesain untuk menginaktivkan mikroorganisme (baik sel vegetatif atau spora) yang ada pada bahan pangan dengan cara mengurangi jumlah populasi mikroorganisme pembusuk ke tingkat yang rendah, sehingga peluang terjadinya kebusukan sangat rendah. Analisis ketahanan panas dinyatakan dalam dengan kinetika orde pertama yaitu nilai D dan nilai Z. Kinetika orde satu yang dipelajari pada setiap titik waktu pemanasan spora sehingga menghasilkan persamaan linear yang digunakan untuk menentukan nilai D dan Z. Nilai D merupakan waktu pada suhu tertentu yang diperlukan untuk menurunkan jumlah spora atau sel vegetatif tertentu sebesar satu logaritmik dalam siklus logaritma

pengurangan mikroorganisme. Sedangkan nilai Z adalah besarnya perubahan suhu yang diperlukan untuk merubah nilai D dalam satu siklus logaritma, nilai Z juga ditentukan untuk mengetahui seberapa besar ketergantungan suhu pemanasan terhadap inaktivasi spora *B.subtilis* dalam jus nanas.

Dari penelitian ini ketahanan panas spora atau nilai D berbanding lurus dengan pH. Misalnya nilai D pada suhu 90 °C diperoleh sebesar 7,25 menit untuk pH 2, 13,35 menit dan 38,31 menit pada pH 6. Kemudian nilai D berbanding terbalik dengan suhu. Misalnya, nilai D pada suhu 90 °C yang diperoleh sebesar 7,25 menit, 4,04 menit pada suhu 95 °C dan 1,87 menit pada suhu 100 °C. Penurunan nilai D akibat meningkatnya suhu, kemudian semakin tinggi pH maka suhu yang dibutuhkan untuk mendapatkan nilai D akan semakin rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rodriguez dkk. (1993) melakukan penelitian inaktivasi termal spora *B.subtilis* pada jus tomat (pH 4,4).

4. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengurangan log spora *Bacillus subtilis* semakin cepat dengan meningkatnya suhu dimana pada pH 2 untuk mereduksi 1 log spora dalam jus nanas dibutuhkan waktu 7,25 menit pada suhu 90 °C dan 1,87 menit pada suhu 100 °C. Namun pengurangan log spora semakin lama dengan meningkatnya pH dimana untuk mengurangi 1 log spora pada suhu 90 °C; pH 2 terjadi selama 7,25 menit; dan pada pH 6 terjadi selama 38,31 menit.
2. Parameter D-value (ketahanan spora) berbanding terbalik dengan suhu dimana dengan naiknya suhu maka nilai D akan turun. Nilai D pada pH 2 untuk suhu 90, 95 dan 100 °C berturut-

turut adalah 7,25; 4,04 dan 1,87 menit. Nilai D pada pH 6 untuk suhu 90, 95 dan 100 °C adalah 38, 31; 19, 72 dan 5,18 menit. Sedangkan nilai Z yang didapatkan adalah pada rentang 11-16 °C.

Daftar Pustaka

- Agcam, E., Akyildiz, A., & Dundar, B. (2018). *Thermal pasteurization and microbial inactivation of fruit juices*. Turkey :Cukurova university.
- Aguilo, A.I., Oms, O.G., Soliva, F.R., & Martin, B.O. (2009). Changes in quality attributes throughout storage of strawberry juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *Food Science and Technology*, 42, 813–818.
- Badan Pusat Statistik. (2015). Produksi tanaman buah-buahan. *Badan Pusat Statistika*, Jakarta.
- Hajare, S. N., Dhokane, R., Saroj, S., Sharma, A., & Bandekar, J. (2006). Radiation processing of minimally processed pineapple *ananas comosus*: effect on nutritional and sensory quality. *Journal of Food Science*. 71, 501-505.
- Helmi, R.A. (2018). Efektivitas *bacillus subtilis* inacc dan *pseudomonas aeruginosa* inacc b290 dalam bioremediasi limbah logam berat artifisial serta uji bioassay menggunakan daphnio magna. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* Sporulation. *FEMS Microbiol Rev*, 36, 131-148.
- Intan. (2006). *Pengaruh konsentrasi NaCl, pH, dan suhu terhadap pertumbuhan bakteri laut yang berasosiasi dengan spoons*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan:Institut Pertanian Bogor.
- Lihua, F., Furong, H., Aliyu, I.M., Ritesh, B.W., Mingming, G., & Donghong, L.

- (2018). Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *bacillus subtilis* spores. *Food Research International*.
- Murwani, S. (2015). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Palop, A., Javier, R., Rafael, P., Santiago, C., & Francisco, J.S. (1999). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *Journal of Food Microbiology*, 46,243-249.
- 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, 165-168.
- Shahbaz, H.M., Jeong, U.K., Sun, H.K., & Jiyong P. (2018). *Advances in nonthermal processing technologies for enhanced microbiological safety and quality of fress fruit and juice product*, South Korea.Yonsei University
- Thomas, J.M., Rebecca, D., Tara, D.S., Marcelo, B., & Donald, W.S. (2005). Thermal resistance of spores from virulent strains of *bacillus anthracis* and potential surrogates. *Journal of Food Protection*, 68,2362-2366.