

VOLUME 15, NOMOR 1 MARET 2021

ISSN: 1907-8056  
e-ISSN: 2527-5410

# AGROINTEK

JURNAL TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
UNIVERSITAS TRUNOJOYO MADURA

## **AGROINTEK: Jurnal Teknologi Industri Pertanian**

Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian is an open access journal published by Department of Agroindustrial Technology, Faculty of Agriculture, University of Trunojoyo Madura. Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian publishes original research or review papers on agroindustry subjects including Food Engineering, Management System, Supply Chain, Processing Technology, Quality Control and Assurance, Waste Management, Food and Nutrition Sciences from researchers, lecturers and practitioners. Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian is published four times a year in March, June, September and December.

Agrointek does not charge any publication fee.

Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian has been accredited by ministry of research, technology and higher education Republic of Indonesia: 30/E/KPT/2019. Accreditation is valid for five years. start from Volume 13 No 2 2019.

### **Editor In Chief**

Umi Purwandari, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

### **Editorial Board**

Wahyu Supartono, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Michael Murkovic, Graz University of Technology, Institute of Biochemistry, Austria

Chananpat Rardniyom, Maejo University, Thailand

Mohammad Fuad Fauzul Mu'tamar, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Khoirul Hidayat, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Cahyo Indarto, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

### **Managing Editor**

Raden Arief Firmansyah, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

### **Assistant Editor**

Miftakhul Efendi, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Heri Iswanto, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Safina Istighfarin, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

### **Alamat Redaksi**

DEWAN REDAKSI JURNAL AGROINTEK

JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS TRUNOJOYO MADURA

Jl. Raya Telang PO BOX 2 Kamal Bangkalan, Madura-Jawa Timur

E-mail: [Agrointek@trunojoyo.ac.id](mailto:Agrointek@trunojoyo.ac.id)

## POTENSI *CHITOSAN* DAN *ESSENTIAL OIL* BAWANG PUTIH (*Allium sativum*) YANG DIINKORPORASIKAN PADA *EDIBLE COATING* SEBAGAI PENGAWET BAKSO

Setyaningrum Ariviani<sup>\*1,2</sup>, Miladyah Kusumawati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Pangan, Gizi dan Kesehatan Masyarakat (P4GKM), Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia

### Article history

Diterima:  
15 Juli 2020  
Diperbaiki:  
3 November 2020  
Disetujui:  
10 November 2020

### Keyword

edible coatings;  
chitosan; garlic EO,  
beef meatballs;  
preservatives

### ABSTRACT

Beef Meatball is a processed meat product that is susceptible to microbiological damage, thus requiring preservatives to extend their shelf life. Natural preservatives incorporated into edible coatings are more effective than those added directly to the food. This study aims to investigate the potential of chitosan and garlic (*Allium sativum*) essential oil (EO) incorporated into edible coatings as a natural preservative alternative of beef meatballs. Beef meatballs were coated with 4 variations of edible coatings, namely without incorporation (control), with the incorporation of chitosan, garlic EO, and chitosan-garlic EO. These coated beef meatballs were stored at  $4 \pm 10$  °C and further analyzed for the evaluation of total microbe level (Total Plate Count) and texture measurement in the storage period of 0, 5, 10, 14, and 18 days. The potential of chitosan and EO of garlic as an antimicrobial agent was determined by MIC (Minimum Inhibitory Concentration) analysis of *E.coli*. The results showed that the chemical characteristics of beef meatballs which include the levels of moisture, ash, fat, and protein met to the National Standard of Indonesia (SNI). Garlic EO has a lower MIC value than chitosan, so the garlic EO incorporated in the edible coating is more effective as a preservative of meatballs than chitosan. The chitosan-garlic EO incorporation in edible coating provides an antagonistic effect in inhibiting the microbial growth of beef meatballs during storage. All treatments showed not significantly different on the rate of texture change of the beef meatballs during storage, although the differences in the total microbial levels were observed. The research results have important consequences in the use of natural preservatives to extend the shelf life of beef meatballs through incorporation into edible coatings.

© hak cipta dilindungi undang-undang

\* Penulis korespondensi

Email : [setyaningrum\\_ariviani@staff.uns.ac.id](mailto:setyaningrum_ariviani@staff.uns.ac.id)

DOI 10.21107/agrointek.v15i1.7898



## PENDAHULUAN

Bakso merupakan produk olahan daging sapi yang digemari sebagian besar masyarakat Indonesia. Menurut Badan Standarisasi Nasional Indonesia, bakso yang berkualitas memiliki kriteria kadar air maksimal 70 %, protein minimal 11 %, lemak maksimal 10 %, abu maksimal 3 % serta cemaran mikroba ALT (Angka Lempeng Total) maksimal  $10^5$  koloni/g (SNI 2014). Kandungan nutrisi dan kadar air yang tinggi menyebabkan bakso memiliki masa simpan yang singkat yaitu 12 jam hingga 1 hari pada penyimpanan suhu ruang (Wicaksono, 2007) dan selama 14 hari pada suhu  $4 \pm 1$  °C dengan ALT  $3,09 \pm 0,06$  log CFU/g (Sinhamahapatra *et al.*, 2013). Salah satu mikroba pada bakso adalah *E. coli* (Arief *et al.*, 2012; Fitrianto *et al.*, 2015) yang memiliki sifat membentuk asam sehingga menurunkan pH. Penurunan pH mempengaruhi WHC (*Water Holding Capacity*) sehingga membuat olahan daging lunak/lembek (Muhtahdi *et al.*, 2013).

Menurut Abdulmumeen *et al.* (2012), bahan pengawet merupakan salah satu zat aditif yang dapat menghambat kerusakan produk pangan. Penambahan bahan pengawet dapat dilakukan secara langsung ke dalam produk pangan maupun ditambahkan ke dalam kemasan (*active packaging*). Zat pengawet yang diinkorporasikan dalam kemasan lebih efektif menghambat pertumbuhan mikroba dibanding penambahan zat pengawet secara langsung ke dalam produk pangan (Appendini dan Hotchkiss, 2002; Schillinger *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2009; Chumchalová *et al.*, 1998). Penelitian Rezaei dan Shahbazi (2018) membuktikan bahwa penambahan pengawet alami yang diinkorporasikan dalam *edible coating* lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada fillet ikan selama penyimpanan dibandingkan penambahan secara langsung maupun

inkorporasi dalam *biodegradable film*. *Edible coating* lebih mudah dan memerlukan waktu lebih singkat dalam proses pembuatannya dibandingkan *edible film*, karena tidak membutuhkan proses pencetakan (langsung diaplikasikan pada produk saat masih berupa larutan) (Bourtoom, 2008).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa beberapa bahan alami dapat digunakan sebagai pengawet alami untuk bakso seperti ekstrak daun sirih hijau (Putri *et al.*, 2013), *chitosan* (Kanatt *et al.*, 2013), dan *essential oil* (Pesavento *et al.*, 2015). Penambahan ekstrak daun sirih hijau 1 % mampu memperpanjang umur simpan bakso selama 1 hari namun penerimaan terhadap rasa, aroma dan warna lebih rendah daripada bakso kontrol. Aplikasi larutan *chitosan* (1 %) sebagai *coating* bakso ayam memiliki umur simpan 2 kali lebih lama (14 hari) tanpa mempengaruhi sifat sensorisnya. Penggunaan *chitosan* sebagai *edible coating* lebih efektif menghambat pertumbuhan mikroba daripada ditambahkan dalam adonan bakso (Wicaksono, 2007). *Essential oil* (EO) dari oregano, timi (*Thymus vulgaris*), dan rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) pada konsentrasi 0,5 % efektif menghambat pertumbuhan mikroba pada bakso tanpa mempengaruhi sifat sensoris dibanding konsentrasi lain (1 % dan 2 %)

Bawang putih merupakan bumbu yang umum ditambahkan pada pembuatan bakso. Menurut Mnayer *et al.* (2014), EO bawang putih (*Allium sativum*) mengandung komponen *diallyl disulfide* (turunan allisin) sebesar 37,9 %. Penelitian Du *et al.* (2009) membuktikan *edible film* tomat yang diinkorporasi EO bawang putih konsentrasi 0,5 % (w/w) optimal menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (*E. coli*, *S. enterica*) maupun gram positif (*L. monocytogenes*) daripada konsentrasi lain (1 %; 1,5 %; dan 3 % w/w).

Kelemahan pengawet alami yaitu apabila konsentrasi penambahan terlalu tinggi menyebabkan *off flavour*, sehingga mempengaruhi daya terima konsumen terhadap produk (Kristam *et al.*, 2016; Wahyuni dan Nugroho, 2014; Winarti *et al.*, 2012). Selain itu, efektivitas pengawet alami dapat menurun saat berinteraksi dengan komponen tertentu dalam produk pangan serta kestabilannya yang rendah pada suhu tinggi (Gutierrez *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2009). Kombinasi lebih dari satu bahan pengawet diperlukan untuk mengatasi kelemahan yang dimiliki tersebut.

Kombinasi dua atau lebih agensi antimikroba dapat memberikan beberapa efek yaitu sinergis, antagonis maupun aditif (Bassolé dan Juliani, 2012). Hasil penelitian Fu *et al.* (2007) membuktikan kombinasi EO *S. aromaticum* dan *R. officinalis* sebagai agensia antimikroba memberikan efek aditif dalam menghambat *S. aureus*, *S. epidermis*, *B. Substillis*, *E. coli*, *P. vulgaris* dan *P. aeruginosa*; sinergis untuk *Candida albicans*; dan antagonis untuk *A. niger*. Yuan *et al.* (2016) melaporkan bahwa inkorporasi EO cengkeh, kayu manis, timi (*Thymus vulgaris*), maupun oregano pada *edible coating chitosan* mampu meningkatkan penghambatan pertumbuhan mikroba kontaminan dan memperpanjang umur simpan produk daging dan ikan dibanding perlakuan *coating chitosan* saja. Pada penelitian sebelumnya, Ariviani *et al.* (2019) menunjukkan bahwa kombinasi *chitosan*-EO bawang putih yang diinkorporasikan dalam *edible coating* bakso daging sapi menghasilkan efek sinergis dalam menangkap radikal bebas (DPPH *Radical Scavenging*) dan antagonis pada kemampuan mereduksi (*Reducing Power*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi *chitosan* (1 %), EO bawang putih (0,5 %) serta kombinasi

*chitosan*-EO bawang putih yang diinkorporasikan pada *edible coating* sebagai pengawet alami bakso daging sapi. Potensi ditentukan dengan pengukuran total mikroba kontaminan dan tekstur bakso selama 18 hari penyimpanan pada suhu  $4 \pm 1$  °C. Karakteristik kimiawi bakso daging sapi ditentukan dengan pengukuran komponen makronutrien yang meliputi kadar air, mineral total (abu), protein, lemak, dan karbohidrat. Potensi antimikroba *chitosan* dan EO bawang putih yang digunakan dalam penelitian ditentukan dengan pengukuran MIC terhadap *E.coli*. Fitrianto *et al.* (2015) menunjukkan bahwa kontaminasi *E.coli* pada bakso lebih tinggi dibanding *Staphylococcus aureus*. Inkorporasi *chitosan*, EO-bawang putih maupun kombinasinya dalam *edible coating* diharapkan akan menghambat pertumbuhan mikroba kontaminan dan mempertahankan tekstur bakso daging sapi selama penyimpanan. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai alternatif teknik pengawetan bakso yang aman, mudah, dan tanpa resiko *off-flavor* karena menggunakan bahan-bahan alami yang tersedia di pasaran, tidak berasa dan beraroma (*chitosan*) dan merupakan bumbu yang umum digunakan dalam pembuatan bakso (bawang putih).

## METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi tiga, yaitu bahan pembuatan bakso daging sapi, bahan pembuatan *edible coating* dan bahan untuk analisis. Pembuatan bakso daging sapi membutuhkan daging sapi bagian gandum (*silver side*), tepung tapioka “*Rose brand*”, garam “*Refina*” dan air es. Bahan untuk pembuatan *edible coating* meliputi: tepung maizena “*Maizenaku*”, gliserol dan CH<sub>3</sub>COOH (Merck, Darmstadt, Jerman), *chitosan* (CV. Bio Chitosan Indonesia, Jakarta), *essential oil* bawang putih (CV.

Happy Garden, Jakarta), akuades. Bahan untuk analisis: *E. coli* FNCC 0090 (Laboratorium PSPG UGM, Yogyakarta), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mueller Hinton Broth* (MHB), *Plate Count Agar* dari Oxoid (Basingstoke, UK), NaCl (Merck, Darmstadt, Jerman).

### Metode

Penelitian merupakan penelitian eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu perlakuan *coating* yang terdiri dari 4 taraf yaitu kontrol (tanpa inkorporasi komponen aktif), dengan inkorporasi *chitosan*, inkorporasi EO bawang putih, dan inkorporasi kombinasi *chitosan*-EO bawang putih. Untuk mengetahui efektivitas *chitosan*, EO bawang putih maupun kombinasinya yang diinkorporasikan dalam *edible coating* sebagai pengawet alami bakso daging sapi, dilakukan analisis laju pertumbuhan mikrobia kontaminan dan perubahan tekstur bakso daging sapi selama penyimpanan pada suhu  $4\pm 1$  °C.

### Pembuatan Bakso Daging Sapi

Pembuatan bakso daging sapi mengacu pada metode (Ulupi dan Hendrarti, 2005). Daging sapi gandum dipotong-potong dan dihaluskan menggunakan blender (Philips HR2939) dengan penambahan air es (20 % v/b). Selanjutnya ditambahkan garam (3 % b/b), tepung tapioka (20 % b/b), dan dicampur hingga homogen. Prosentase bahan-bahan yang ditambahkan adalah berbasis bobot daging. Adonan yang dihasilkan dicetak bulat dengan berat tiap bulatan 15 g. Perebusan bakso dalam air mendidih hingga matang (30 menit setelah mengapung), kemudian dilakukan penirisan.

### Pembuatan *Edible Coating*

*Edible coating* dibuat dengan metode yang sebelumnya dijelaskan oleh Amaliya dan Putri (2014) dengan sedikit modifikasi.

Secara singkat, dispersi maizena dalam air pada konsentrasi 5 % ditambahkan dengan 1 % (v / v) gliserol dan kemudian dipanaskan dan diaduk menggunakan *hotplate magnetic stirrer* (Heidolph MR 3001 R) selama 30 menit (75 °C, 50 rpm). Larutan *edible coating* ini selanjutnya didinginkan hingga suhu 37 °C. Dalam penelitian ini, *edible coating* dibuat menggunakan 4 formula, yaitu kontrol (tanpa penambahan apa pun), dengan inkorporasi *chitosan*, inkorporasi EO bawang putih, dan inkorporasi kombinasi *chitosan*-EO bawang putih. Inkorporasi *chitosan* dilakukan dengan penambahan larutan *chitosan* konsentrasi 1 % (dalam larutan asam asetat 1 %) sebanyak 1 % (v/v) sebelum perlakuan pemanasan. Inkorporasi EO bawang putih dilakukan dengan penambahan EO sebanyak 0,5 % (v/v) setelah suhu larutan *edible coating* mencapai 37 °C.

### Aplikasi *edible coating* pada Bakso Daging Sapi

Metode yang digunakan untuk aplikasi *edible coating* pada bakso daging sapi mengacu pada Hadi (2008). Bakso dicelupkan ke dalam larutan *edible coating* selama 60 detik. Selama proses pencelupan bakso, larutan tetap diaduk menggunakan *magnetic stirrer* (*Thermo scientific*) agar tetap homogen. Bakso kemudian dipindahkan dan dikeringkan dengan bantuan *hairdryer* selama 20 menit. Bakso selanjutnya disimpan pada suhu terkontrol yaitu  $4\pm 1$  °C. Pengujian jumlah mikrobia kontaminan (TPC) dan tekstur dilakukan selama penyimpanan pada hari ke 0, 5, 10, 14 dan 18.

### Analisis karakteristik kimia bakso daging sapi

Analisis karakteristik kimia dilakukan untuk mengetahui apakah bakso daging sapi yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi syarat bakso daging sapi yang berkualitas menurut SNI. Analisis karakteristik kimia dilakukan dengan

pengukuran kadar air (AOAC 985.14), mineral total (abu) (AOAC 942.05), lemak (AOAC 960.39), protein (AOAC 992.15, 2005), dan karbohidrat *by difference* (AOAC 986.25). keseluruhan metode yang digunakan mengacu pada AOAC (2005). Peralatan yang digunakan meliputi peralatan gelas, oven, neraca analitik, desikator, *muffle furnace*, *soxhlet extractor*, labu kjeldahl, kompor listrik, *fume hood*, seperangkat alat destilasi dan titrasi.

#### **Analisis Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Wiegand et al., 2008)**

Analisis MIC dari komponen aktif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *chitosan* dan EO bawang putih ditujukan untuk mengetahui potensi antimikrobia, khususnya dalam menghambat mikroba kontaminan yang dominan ada dalam bakso yaitu *E. Coli*. Prinsip analisis MIC adalah menentukan konsentrasi minimal komponen antimikrobia yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba sebesar 80 %. Tahapannya meliputi (1) persiapan suspensi *E.coli* hingga diperoleh suspensi dengan jumlah bakteri  $10^8$  CFU/ml, (2) pengujian MIC dengan pengukuran OD (*Optical Density*) menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-1800*) pada  $\lambda$  600 nm dari suspensi bakteri  $10^6$  CFU/ml yang ditambah berbagai konsentrasi *chitosan* atau EO bawang putih (0,25 ppm – 128 ppm), (3) penentuan MIC, yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 80 % pertumbuhan *E.coli*.

#### **Penentuan jumlah mikroba kontaminan dengan analisis TPC metode *Pour Plate* (AOAC 990.12)(AOAC 1990)**

Sampel bakso daging sapi dengan Prinsip uji *Total Plate Count* adalah membuat suatu seri pengenceran bahan dengan kelipatan 10, kemudian dari

masing-masing pengenceran diambil 1 ml dan dibuat taburan dalam petridish (*pour plate*) dengan medium PCA (*Plate Count Agar*). Setelah diinkubasi selama 2 hari pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dihitung jumlah koloni tiap petridish sehingga dapat ditentukan jumlah kontaminan tiap ml atau gram bahan. Laju pertumbuhan ditentukan berdasarkan kurva hubungan antara jumlah mikroba dengan waktu penyimpanan. Slope dari persamaan regresi kurva ini merupakan laju pertumbuhan yang dinyatakan dalam satuan  $\log \text{CFUg}^{-1}\text{hari}^{-1}$ . Presentase penghambatan pertumbuhan mikroba kontaminan ditentukan dengan berbasis perlakuan kontrol yang diasumsikan tidak ada penghambatan. Presentase penghambatan ditentukan dengan formula:  $[(\text{slope control} - \text{slope perlakuan}) / \text{slope kontrol}] \times 100 \%$ .

#### **Analisis Tekstur menggunakan *Universal Testing Machine***

Prinsip analisis tekstur dengan menggunakan alat *Universal Testing Machine* ini adalah dengan memberikan variasi gaya untuk mengetahui gaya maksimum yang dibutuhkan untuk dapat melalui suatu produk. Laju perubahan tekstur ditentukan dengan membuat kurva hubungan antara tekstur dan lama penyimpanan. Slope dari persamaan kurva ini merupakan laju perubahan tekstur yang dinyatakan dalam satuan Newton/hari.

#### **Analisis data**

Data yang diperoleh dianalisis dengan *Software IBM SPSS Statistics 22* (SPSS Inc., Chicago, USA) menggunakan metode *Analysis of Variances* (ANOVA). Bila terdapat perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada  $p < 0,05$ .



## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Kimiawi Bakso Daging Sapi

Syarat mutu kimiawi (makronutrien) bakso daging sapi diatur pada SNI 3818:2014 (Tabel 1). Hasil analisis karakteristik kimiawi bakso daging sapi yang meliputi kadar air, mineral total, protein, lemak dan karbohidrat disajikan pada Tabel 1.

Data pada Tabel 1 menunjukkan komponen makronutrien bakso daging sapi yang digunakan dalam penelitian ini sudah sesuai standar SNI 3818:2014. Bakso daging sapi yang telah dibuat kemudian digunakan untuk pengujian efektivitas *edible coating* dengan inkorporasi *chitosan* dan EO bawang putih sebagai pengawet alami. Sebelum diinkorporasi dalam *edible coating*, *chitosan* maupun EO bawang putih ditentukan potensinya dalam menghambat mikroba.

Tabel 1. Karakteristik Kimiawi Bakso Daging Sapi

Komposisi Kimia	Kadar SNI (% b/b)	Kadar (% b/b)
Air	Maks.70	68,71 ± 1,00
Protein	Min. 11	13,06 ± 0,85
Lemak	Maks. 10	8,15 ± 0,06
Abu (mineral total)	Maks. 3	1,86 ± 0,32
Karbohidrat	-	8,22 ± 0,94

### Potensi *Chitosan* dan EO Bawang Putih sebagai Antimikroba

*Chitosan* dan EO bawang putih yang digunakan pada penelitian ini diuji kemampuan antimikrobanya. Analisis *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dengan metode makrodilusi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi antimikroba yang dibutuhkan dalam menghambat pertumbuhan mikroba kontaminan sebesar

80 % (Lee *et al.*, 2007). Mikroba yang mengakibatkan kontaminasi produk olahan daging dapat berupa bakteri gram-negatif (contohnya: *E.coli*) dan bakteri gram-positif (*Staphylococcus* sp.) (Mukartini *et al.*, 1995; Koswara, 2009). *E. coli* merupakan mikroba patogen dominan yang terdapat pada bakso daging sapi (Fitrianto *et al.*, 2015) sehingga digunakan sebagai bakteri dalam pengujian MIC pada penelitian ini. Hasil analisis MIC *chitosan* dan EO bawang putih dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. *Minimum Inhibitory Concentration/ MIC* (ppm) *Chitosan* dan EO Bawang Putih terhadap *E.coli*

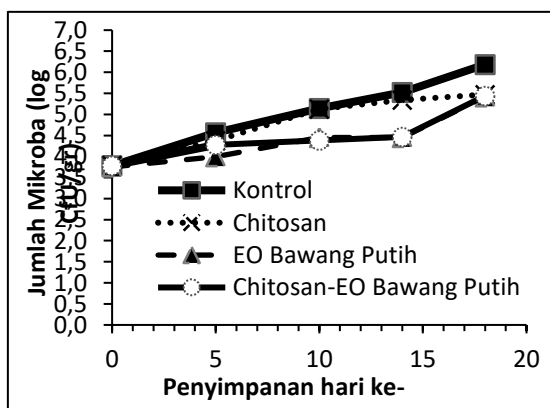
Komponen Bioaktif	MIC (ppm)
<i>Chitosan</i>	95,24
EO Bawang Putih	85,70

Tabel 2 membuktikan bahwa aktivitas antimikroba EO bawang putih lebih tinggi daripada *chitosan*. Hasil tersebut tidak sejalan dengan hasil penelitian Yusman (2006) dan Johnson *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa *chitosan* lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (*E.coli*) dibanding EO bawang putih. Konsentrasi 1000 ppm *chitosan* dengan derajat deasetilasi (DD) 73 % memiliki zona hambat *E.coli* dengan diameter 10 mm, dan dibutuhkan EO bawang putih dengan konsentrasi 525 x 10<sup>3</sup> ppm untuk mendapatkan zona hambat dengan diameter yang sama. Hasil yang berbeda pada penelitian ini dikarenakan stabilitas dari *chitosan* yang menurun akibat lama penyimpanan. Menurut No *et al.* (2006), semakin lama waktu penyimpanan *chitosan* semakin menurun kemampuan antimikroba yang dimiliki. Pertumbuhan *E.coli* pada *chitosan* (BM 2025 kDa) konsentrasi 1 % (w/v) dalam 1 % (v/v) asam asetat sebelum penyimpanan sebesar 5,44 log CFU/ml dan mencapai 6,29 log CFU/ml setelah disimpan pada suhu 4 °C selama 15 minggu.

Potensi *Chitosan* dan EO Bawang Putih yang diinkorporasi dalam *Edible Coating* untuk menghambat pertumbuhan mikrobia kontaminan (TPC) Bakso Daging Sapi Selama Penyimpanan Suhu  $4\pm 1$  °C.

Bakso daging sapi merupakan produk yang rentan terhadap kerusakan mikrobiologis dikarenakan kandungan nutrisi yang tinggi (Tabel 1). Penggunaan bahan pengawet alami pada bakso mengalami perkembangan dikarenakan larangan penggunaan pengawet boraks dan formalin karena efek negatif yang ditimbulkan sesuai SK Menteri Kesehatan RI No. 722/MEN.KES/PER/IX88 dan Peraturan Menteri Kesehatan No 722/1988, Peraturan Menteri Kesehatan No. 1168/Menkes/PER/X/1999, UU No 7/1996 dan UU No. 8/1999.

Kemampuan *Chitosan* dan EO bawang putih yang diinkorporasikan dalam *edible coating* untuk menghambat pertumbuhan mikroba pada bakso daging sapi ditentukan dengan pengukuran jumlah total mikrobia selama penyimpanan (Gambar 1) dan laju pertumbuhan mikrobia kontaminan serta prosentase penghambatannya dibandingkan kontrol (bakso dengan *edible coating* tanpa inkorporasi *chitosan* ataupun EO bawang putih) (Tabel 3).



Gambar 1 Pertumbuhan Mikroba Kontaminan Bakso Daging Sapi selama Penyimpanan Suhu  $4\pm 1$  °C.

Tabel 3 Laju Pertumbuhan serta Penghambatan Mikroba pada Bakso Daging Sapi selama Penyimpanan Suhu  $4\pm 1$  °C

Edible Coating	Laju Pertumbuhan Mikroba (log CFUgr <sup>-1</sup> hari <sup>-1</sup> )	Penghambatan Kontaminasi Mikroba (%)
Kontrol	0,128±0,01 <sup>c</sup>	-
<i>Chitosan</i> EO Bawang Putih	0,098±0,00 <sup>b</sup>	23,91±3,39 <sup>a</sup>
<i>Chitosan</i> -EO Bawang Putih	0,077±0,00 <sup>a</sup>	35,15±2,02 <sup>b</sup>
Bawang Putih	0,083±0,00 <sup>a</sup>	40,25±0,30 <sup>c</sup>

*Superscript* yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil yang disajikan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pada semua perlakuan *edible coating* terjadi peningkatan jumlah mikroba pada bakso daging sapi seiring lamanya waktu penyimpanan. Selama 18 hari penyimpanan, sampel bakso kontrol memiliki jumlah mikroba yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Hal ini membuktikan inkorporasi *chitosan*, EO bawang putih maupun kombinasinya pada *edible coating* mampu menghambat pertumbuhan mikroba pada bakso daging sapi. Menurut SNI 3818:2014, nilai maksimal angka lempeng total pada bakso daging sapi adalah 5 log CFU/g. Sampel kontrol dan sampel dengan formula *chitosan* hanya dapat bertahan hingga hari ke-10, sedangkan sampel dengan formula EO bawang putih dan *chitosan*-EO bawang putih dapat bertahan hingga hari ke-18 (Gambar 1).

Kemampuan *chitosan* yang diinkorporasi dalam *edible coating* dalam menghambat mikrobia pada bakso daging sapi sejalan dengan penelitian Wicaksono

(2007). Muatan polikationik pada *chitosan* dapat berikatan dengan muatan negatif dari membran sel bakteri melalui interaksi elektrostatis, sehingga mempengaruhi permeabilitas membran sel dan menyebabkan kebocoran sel. Mekanisme lain dari *chitosan* sebagai antimikrobia yaitu dengan mengikat DNA mikrobia sehingga menghambat sintesis mRNA dan protein. *Chitosan* juga dapat mengkelat logam sehingga terbentuk kompleks *chitosan*-logam sehingga aliran nutrisi esensial untuk pertumbuhan menjadi terhambat (Goy *et al.*, 2009).

Kemampuan EO bawang putih dalam menghambat pertumbuhan mikrobia telah ditunjukkan oleh Du *et al.* (2009). EO bawang putih memiliki senyawa *diallyl disulfide* (37,9 %) yang berperan sebagai antimikrobia (Mnayer *et al.*, 2014). Beberapa peneliti menyebutkan komponen *diallyl disulfide* pada *essential oil* bawang putih komersial sebesar 25,3 % (Zhao *et al.*, 2013) dan 25,9 % (Lawson *et al.*, 1991). Mekanisme *diallyl disulfide* sebagai antimikroba adalah bereaksi dengan protein intraseluler yang memiliki gugus SH- bebas (Kim *et al.*, 2004; Tsao dan Yin, 2001). Mekanisme antimikrobia EO secara umum adalah masuknya molekul EO ke dalam sel dan kemudian berinteraksi dengan komponen sel. Beragam interaksi EO di dalam sel antara lain EO mengubah profil lemak sel, komponen EO berikatan dengan protein intraseluler sel, serta komponen EO dapat menghambat ATPase dalam sel. Dampak dari interaksi ini adalah kematian sel (Nazzaro *et al.*, 2013).

Tabel 3 menunjukkan bahwa bakso daging sapi perlakuan kontrol memiliki laju pertumbuhan mikrobia yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Sampel dengan inkorporasi EO bawang putih lebih efektif menghambat pertumbuhan mikroba kontaminan daripada *chitosan* karena memiliki laju pertumbuhan mikroba kontaminan yang

signifikan lebih rendah dan dengan demikian memiliki penghambatan pertumbuhan yang signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan *chitosan*. Hal ini sesuai dengan hasil analisis MIC *E.coli* pada Tabel 1 yang menunjukkan MIC EO bawang putih lebih rendah dibandingkan *chitosan*.

Interaksi dari kombinasi dua atau lebih komponen bioaktif sebagai penghambat pertumbuhan mikrobia dapat memberikan berbagai efek. Efek aditif terjadi apabila efek yang dihasilkan oleh kombinasi komponen sama dengan jumlah dari efek masing-masing komponen. Kombinasi komponen menghasilkan efek antagonis apabila efek yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan jumlah dari masing-masing komponen. Interaksi menyebabkan efek sinergis apabila efek yang dihasilkan lebih besar daripada jumlah efek yang dihasilkan masing-masing komponen (Bassolé dan Juliani, 2012; Choe dan Min, 2009). Tabel 3 menunjukkan interaksi antara *chitosan* dan EO bawang putih sebagai antimikroba apabila dikombinasikan. Kombinasi *chitosan*-EO bawang putih menunjukkan interaksi antagonis dikarenakan nilai penghambatan yang dimiliki jauh lebih kecil dibandingkan jumlah yang dihasilkan masing-masing komponen (*chitosan* dan EO bawang putih).

Interaksi antagonis yang terjadi dikarenakan kedua komponen (*chitosan* dan EO bawang putih) memiliki mekanisme antimikrobia yang mirip yaitu dengan masuk ke dalam sel sehingga mempengaruhi permeabilitas membran sel (Goy *et al.*, 2009; Nazzaro *et al.*, 2013). Kompetisi antara *chitosan* dan EO bawang putih untuk masuk ke dalam sel mikrobia menyebabkan efek antagonistik dalam menghambat pertumbuhan mikrobia pada bakso daging sapi selama penyimpanan.

### Tekstur Bakso Daging Sapi selama Penyimpanan pada Suhu $4\pm 1$ °C.

Kontaminasi mikroba pada produk olahan daging mempengaruhi WHC (*Water Holding Capacity*) sehingga tingkat kekerasan pada produk menjadi menurun. Laju penurunan tingkat kekerasan pada bakso daging sapi selama penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 4.

Perubahan tekstur (tingkat kekerasan) pada sampel bakso selama penyimpanan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada semua perlakuan (Tabel 4). Hasil ini mengindikasikan bahwa pertumbuhan mikroba ternyata tidak mempengaruhi perubahan tingkat kekerasan pada bakso daging sapi jika dikorelasikan dengan hasil yang didapatkan pada Tabel 3. Hal ini dikarenakan perubahan pada penurunan WHC yang menyebabkan perubahan tekstur terjadi saat jumlah mikroba kontaminan  $10^7$  CFU/g (Centre For Food Safety 2014; Lund *et al.*, 2000). Hasil pengamatan pada Gambar 1 menunjukkan pada hari ke-18 jumlah mikroba belum mencapai 7 log CFU/g.

Tabel 4 Laju Penurunan Kekerasan Bakso Daging Sapi selama Penyimpanan pada Suhu  $4\pm 1$  °C

<i>Edible Coating</i>	Laju penurunan kekekrasan (Newton/hari)
Kontrol	0,0078 $\pm$ 0,0060 <sup>a</sup>
<i>Chitosan</i>	0,0034 $\pm$ 0,0032 <sup>a</sup>
EO Bawang Putih	0,0099 $\pm$ 0,0056 <sup>a</sup>
<i>Chitosan</i> - EO Bawang Putih	0,0047 $\pm$ 0,0009 <sup>a</sup>

*Superscript* yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (p <0,05)

### KESIMPULAN

EO bawang putih maupun *chitosan* yang diinkorporasikan pada *edible coating* berpotensi sebagai pengawet alami bakso daging sapi. EO bawang putih yang

diinkorporasikan dalam *edible coating* menunjukkan penghambatan pertumbuhan mikroba kontaminan bakso daging sapi yang signifikan lebih tinggi dibanding *chitosan*. Hasil ini sejalan dengan nilai MIC EO bawang putih yang lebih rendah dibanding *chitosan*. Penggunaan kombinasi *chitosan*-EO bawang putih memberikan efek antagonistik dalam menghambat laju pertumbuhan mikroba kontaminan bakso daging sapi selama penyimpanan. Inkorporasi *chitosan*, EO bawang putih maupun kombinasi *chitosan*-EO bawang putih tidak berpengaruh terhadap laju perubahan tekstur bakso selama penyimpanan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdulmumeen, H.A., A.N. Risikat, A.R. Sururah. 2012. Food: Its preservatives, additives and applications. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences* 1:36–47.
- Amaliya, R.R., W.D.R. Putri. 2014. Karakterisasi Edible Film dari Pati Jagung dengan Penambahan Filtrat Kunyit Putih sebagai Antibakteri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2:43–53.
- AOAC. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15th edition. Association Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- AOAC. 2005. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 18th edition. Association of Official Analytical Chemist, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Appendini, P., J.H. Hotchkiss. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3:113–126.

- Arief, I.I., B.S.L. Jenie, T. Suryati, G. Ayuningtyas, A. Fuziawan. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin from indigenous *Lactobacillus plantarum* 2C12 and its application on beef meatball as biopreservative. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 37:90–96.
- Ariviani, S., M. Kusumawati, W. Atmaka. 2019. Chitosan-garlic essential oil incorporation on beef meatball edible coatings as antioxidant-based functional food. Pages 1–7 IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.
- Bassolé, I.H.N., H. R. Juliani. 2012. Essential Oils in Combination and their Antimicrobial Properties. *Molecules* 17:3989–4006.
- Bourtoom, T. 2008. Edible films and coatings: Characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15:1–13.
- Castro, M.P., A.M. Rojas, C.A. Campos, L.N. Gerschenson. 2009. Effect of preservatives, tween 20, oil content and emulsion structure on the survival of *Lactobacillus fructivorans* in model salad dressings. *LWT - Food Science and Technology* 42:1428–1434.
- Centre For Food Safety. 2014. Microbiological Guidelines for Food: for Ready-to-eat Food in General and Specific Food Items. Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department.
- Choe, E., D.B. Min. 2009. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8:345–358.
- Chumchalová, J., J. Josephsen, M. Plocková. 1998. The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO<sub>3</sub> and lysozyme. *International Journal of Food Microbiology* 43:33–38.
- Du, W.-X., C.W. Olsen, R.J. Avena-Bustillos, T.H. McHugh, C.E. Levin, R. Mandrell, M. Friedman. 2009. Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. *Journal of Food Science* 74:M390–M397.
- Fitrianto, E., D. Rosyidi, I. Thohari. 2015. The effect of long storage time on the microbiology quality meatball Turkey. Universitas Brawijaya.
- Friedman, M., C.E. Levin, S.H. Choi, S.U. Lee, N. Kozukue. 2009. Changes in the composition of raw tea leaves from the korean Yabukida plant during high-temperature processing to pan-fried kamairi-cha green tea. *Journal of Food Science* 74:C406–C412.
- Fu, Y., Y. ZU, L. Chen, X. Shi, Z. Wang, S. Sun, T. Efferth. 2007. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. *Phytotherapy Research* 21:989–994.
- Goy, R.C., D. De Britto, O.B.G. Assis. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 19:241–247.
- Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, P. Bourke. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124:91–97.
- Hadi, H.N.S.S. 2008. Aplikasi Kitosan dengan Penambahan Ekstrak Bawang Putih Sebagai Pengawet dan Edible Coating Bakso Sapi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Johnson, O., G. Ayoola, T. Adenipekun. 2013. Antimicrobial Activity and the Chemical Composition of the Volatile Oil Blend from *Allium*

- sativum (Garlic Clove) and Citrus reticulata (Tangerine Fruit). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 5:187–193.
- Kanatt, S.R., M.S. Rao, S.P. Chawla, A. Sharma. 2013. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology* 53:321–326.
- Kim, J.W., J.E. Huh, S.H. Kyung, K.H. Kyung. 2004. Antimicrobial Activity of Alk(en)yl Sulfides Found in Essential Oils of Garlic and Onion. *Food Science and Biotechnology* 13:235–239.
- Koswara, S. 2009. *Teknologi Praktis Pengolahan Daging*. eBookPangan.com.
- Kristam, P., N.M. Eswarapragada, E.R. Bandi, S.R. Tumati. 2016. Evaluation of edible polymer coatings enriched with green tea extract on quality of chicken nuggets. *Veterinary World* 9:685–692.
- Lawson, L.D., Z.-Y.J. Wang, B.G. Hughes. 1991. Identification and HPLC Quantitation of the Sulfides and Dialk(en)yl Thiosulfinates in Commercial Garlic Products. *Planta Medica* 57:363–370.
- Lee, S.M., J.M. Kim, J. Jeong, Y.K. Park, G.-H. Bai, E.Y. Lee, M.K. Lee, C.L. Chang. 2007. Evaluation of the broth microdilution method using 2,3-diphenyl-5-thienyl- (2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing. *Journal of Korean Medical Science* 22:784–790.
- Lund, B.M., T.C. Baird-Parker, G.W. Gould. 2000. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Page (B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, and G. W. Gould, Eds.). Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Mnayer, D., A.S. Fabiano-Tixier, E. Petitcolas, T. Hamieh, N. Nehme, C. Ferrant, X. Fernandez, F. Chemat. 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules* 19:20034–20053.
- Muhtahdi, T.R., Sugiyono, A. Fitriyono. 2013. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Ketiga. CV. Alfabeta, Bandung.
- Mukartini, S., C. Jehne, B. Shay, C.M. Harper. 1995. Microbiological Status of Beef Carcass Meat in Indonesia. *Journal of Food Safety* 15:291–303.
- Nazzaro, F., F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola, V. De Feo. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 6:1451–1474.
- No, H.K., S.H. Kim, S.H. Lee, N.Y. Park, W. Prinyawiwatkul. 2006. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydrate Polymers* 65:174–178.
- Pesavento, G., C. Calónico, A.R. Bilia, M. Barnabei, F. Calesini, R. Addona, L. Mencarelli, L. Carmagnini, M.C. Di Martino, A. Lo Nostro. 2015. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control* 54:188–199.
- Putri, P.M., Wignyanto, Nimas Mayang S.S. 2013. Hasil Ekstraksi Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L) sebagai Pengawet alami pada Bakso Sapi. Universitas Brawijaya Malang.
- Rezaei, F., Y. Shahbazi. 2018. Shelf-life extension and quality attributes of sauced silver carp fillet: A comparison among direct addition, edible coating and biodegradable

- film. LWT - Food Science and Technology 87:122–133.
- Schillinger, U., R. Geisen, W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends in Food Science and Technology 7:158–164.
- Sinhamahapatra, M., D. Bhattacharyya, S. Biswas. 2013. Extension of Shelf Life of Chicken Meat Ball by Adopting Combination of Packaging Technique and Storage Temperature. International Journal of Development Research 3:61–66.
- SNI. 2014. Standar Nasional Indonesia 3818:2014 Bakso Daging. Page 35. Badan Standisasi Nasional, Indonesia.
- Tsao, S.M., M.-C. Yin. 2001. In-vitro Antimicrobial Activity of Four Diallyl Sulphides Occurring Naturally in Garlic and Chinese Leek Oils. Journal of Medical Microbiology 50:646–649.
- Ulupi, K.N. ., E.N. Hendrarti. 2005. Sifat Fisik Bakso Daging Sapi dengan Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) sebagai campuran Bahan Dasar. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wahyuni, R., M. Nugroho. 2014. Pengaruh Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah Terhadap Produk Mie kering. Jurnal Teknologi Pertanian 15:93–102.
- Wicaksono, D.A. 2007. Pengaruh metode aplikasi kitosan, tanin, natrium metabisulfit dan. Institut Pertanian Bogor.
- Wiegand, I., K. Hilpert, R.E.W. Hancock. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3:163–175.
- Winarti, C., Miskiyah, Widaningrum. 2012. Teknologi Produksi dan Aplikasi Pengemas Edible Antimikrobia Berbasis Pati. Jurnal Litbang Pertanian 31:85–93.
- Yuan, G., X. Chen, D. Li. 2016. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. Food Research International 89:117–128.
- Yusman, D.A. 2006. Hubungan Antara Aktivitas Antibakteri Kitosan dan Ciri Permukaan Dinding Sel Bakteri. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Zhao, N.N., H. Zhang, X.C. Zhang, X.B. Luan, C. Zhou, Q.Z. Liu, W.P. Shi, Z.L. Liu. 2013. Evaluation of Acute Toxicity of Essential Oil Of Garlic (*Allium sativum*) and Its Selected Major Constituent Compounds Against Overwintering *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae). Journal of Economic Entomology 106:1349–1354.

## AUTHOR GUIDELINES

### Term and Condition

1. Types of paper are original research or review paper that relevant to our Focus and Scope and never or in the process of being published in any national or international journal
2. Paper is written in good Indonesian or English
3. Paper must be submitted to <http://journal.trunojoyo.ac.id/agrointek/index> and journal template could be download here.
4. Paper should not exceed 15 printed pages (1.5 spaces) including figure(s) and table(s)

### Article Structure

1. Please ensure that the e-mail address is given, up to date and available for communication by the corresponding author
2. Article structure for original research contains

**Title**, The purpose of a title is to grab the attention of your readers and help them decide if your work is relevant to them. Title should be concise no more than 15 words. Indicate clearly the difference of your work with previous studies.

**Abstract**, The abstract is a condensed version of an article, and contains important points of introduction, methods, results, and conclusions. It should reflect clearly the content of the article. There is no reference permitted in the abstract, and abbreviation preferably be avoided. Should abbreviation is used, it has to be defined in its first appearance in the abstract.

**Keywords**, Keywords should contain minimum of 3 and maximum of 6 words, separated by semicolon. Keywords should be able to aid searching for the article.

**Introduction**, Introduction should include sufficient background, goals of the work, and statement on the unique contribution of the article in the field. Following questions should be addressed in the introduction: Why the topic is new and important? What has been done previously? How result of the research contribute to new understanding to the field? The introduction should be concise, no more than one or two pages, and written in present tense.

Material and methods, “This section mentions in detail material and methods used to solve the problem, or prove or disprove the hypothesis. It may contain all the terminology and the notations used, and develop the equations used for reaching a solution. It should allow a reader to replicate the work”

**Result and discussion**, “This section shows the facts collected from the work to show new solution to the problem. Tables and figures should be clear and concise to illustrate the findings. Discussion explains significance of the results.”

**Conclusions**, “Conclusion expresses summary of findings, and provides answer to the goals of the work. Conclusion should not repeat the discussion.”



**Acknowledgment**, Acknowledgement consists funding body, and list of people who help with language, proof reading, statistical processing, etc.

**References**, We suggest authors to use citation manager such as Mendeley to comply with Ecology style. References are at least 10 sources. Ratio of primary and secondary sources (definition of primary and secondary sources) should be minimum 80:20.

#### Journals

Adam, M., Corbeels, M., Leffelaar, P.A., Van Keulen, H., Wery, J., Ewert, F., 2012. Building crop models within different crop modelling frameworks. *Agric. Syst.* 113, 57–63. doi:10.1016/j.agsy.2012.07.010

Arifin, M.Z., Probawati, B.D., Hastuti, S., 2015. Applications of Queuing Theory in the Tobacco Supply. *Agric. Sci. Procedia* 3, 255–261. doi:10.1016/j.aaspro.2015.01.049

#### Books

Agrios, G., 2005. *Plant Pathology*, 5th ed. Academic Press, London.