AKTIFITAS ANTIBAKTERI VINEGAR BERAS KETAN MERAH DAN KETAN PUTIH TERHADAP BAKTERI GRAM POSITIF DAN GRAM NEGATIF

[1]Inawaty Sidabalok

[1]Staff Pengajar Fakultas Pertanian Universitas Ekasakti, Padang
inawatysidabalok@gmail.com

ABSTRAK

Vinegar merupakan senyawa berbentuk cairan, tak berwarna, berbau menyengat, memiliki rasa asam yang tajam. Penelitian ini menggunakan beras ketan merah dan beras ketan putih sebagai substrat fermentasi untuk dijadikan tapai dan memproduksi alkohol yang selanjutnya akan diubah menjadi asam asetat (vinegar). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sifat antibakteri vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih terhadap pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April – Mei 2019. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli, Salmonella, Bacillus* sp dan *S. aureus*. Nilai zona hambat vinegar beras ketan merah terhadap bakteri *E. coli* sebesar 30,5 mm, bakteri *S. aureus* sebesar 35,5 mm, bakteri *Salmonella* sebesar 35,3 mm dan bakteri *Bacillus* sp sebesar 31,1 mm. Sedangkan nilai zona hambat vinegar beras ketan putih terhadap bakteri *E. coli* sebesar 13,1 mm, bakteri *S. aureus* sebesar 13,7 mm, bakteri *Salmonella* sebesar 8,7 mm dan bakteri *Bacillus* sp sebesar 19 mm.
.

***Kata kunci**: Vinegar, antibakteri, bakteri gram positif, bakteri gram negatif*

ABSTRACT

Vinegar is a liquid, colorless, pungent, has a sharp sour taste. This research uses red sticky rice and white sticky rice as a fermentation substrate to be tapai and produce alcohol which will then be converted into acetic acid (vinegar). The purpose of this study was to determine the antibacterial properties of vinegar red glutinous rice and white glutinous rice on the growth of gram-positive and gram-negative bacteria. This research was conducted in April - May 2019. The results showed that vinegar of red and glutinous rice and white glutinous rice were able to inhibit the growth of E. coli, Salmonella, Bacillus sp and S. aureus bacteria. The inhibition zone value of red glutinous rice vinegar against E. coli bacteria was 30.5 mm, S. aureus bacteria was 35.5 mm, Salmonella bacteria was 35.3 mm and Bacillus sp bacteria was 31.1 mm. While the inhibition zone value of white glutinous rice vinegar against E. coli bacteria was 13.1 mm, S. aureus bacteria was 13.7 mm, Salmonella bacteria were 8.7 mm and Bacillus sp bacteria were 19 mm..

***Keywords**: Vinegar, antibacterial, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria*

I. PENDAHULUAN

Vinegar merupakan Asam asetat atau lebih dikenal sebagai asam cuka (CH_3COOH) suatu senyawa berbentuk cairan, tak berwarna, berbau menyengat, memiliki rasa asam yang menyengat dan larut didalam air, alkohol, gliserol, eter (Hardoyo, Tjahjono, Primarini Hartono dan Musa, 2007). Vinegar atau asam asetat dapat dibuat dari bahan–bahan yang mengandung gula. Perubahan karbohidrat menjadi asam cuka dapat dilakukan dengan cara fermentasi seperti pada pembuatan tapai. Tapai merupakan salah satu produk hasil fermentasi. Beras, ketan, jagung dan ketela pohon, dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan tape. Pembuatan cuka memerlukan dua tahapan proses fermentasi yaitu, tahap pertama perubahan gula menjadi alkohol oleh khamir atau ragi dan tahap kedua perubahan alkohol menjadi asam cuka, dilakukan bakteri asam cuka (Priasty, Hasanuddin dan Dewi, 2013).

Fermentasi asam asetat dilakukan dengan menggunakan bakteri dari genus *Acetobacter* dalam kondisi aerobik. Salah satu spesies yang banyak digunakan untuk fermentasi asam asetat adalah *Acetobacter aceti*. Kebanyakan spesies bakteri pembentuk asam asetat termasuk dalam jenis *Acetobacter* dan *Gluconobacter*. Kedua jenis bakteri tersebut dapat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat. Spesies bakteri yang lebih sering dan umum digunakan dalam industri pembuatan asam asetat yaitu Acetobacter acetii dan Gluconobacter suboxydans (Fardiaz, 1992).

Beberapa teknologi telah dikembangkan dan diaplikasikan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, baik dengan perlakuan fisik (proses pemanasan), perlakuan kimia (pencucian dengan klorin, asam paracetat, dan H_2O_2), perlakuan mikrobiologis (bakteri asam laktat), maupun dengan penambahan senyawa antimikroba (rempah-rempah, asam organik). Bahan pengawet yang berasal dari bahan kimia membuat khawatir sebagian masyarakat sehingga penggunaan senyawa antimikroba alami menjadi alternatif yang dapat diperhitungkan. Asam organik yang dapat digunakan sebagai antimikroba antara lain asam laktat, asam asetat, asam sitrat (Jamilah, Abbas dan Rahman, 2008).

Beberapa penelitian pembuatan vinegar diantaranya yaitu penelitian Kwartiningsih dan Mulyati (2005), menggunakan buah nanas sebagai bahan baku pembuatan vinegar. Juniawati, Miskiyah dan Widaningrum menggunakan kulit buah pisang sebagai bahan baku pembuatan vinegar. Priasty, Hasanuddin dan Dewi (2013), memproduksi vinegar dengan menggunakan bahan baku air kelapa tua. Pratama, Husindan Trusda (2015) memproduksi cuka dengan menngunakan sari buah apel. Rahayu dan Suparti (2015) memproduksi vinegar dengan menggunakan buah salak. Untuk vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih belum banyak dilakukan penelitian. Berdasarkan uraian di atas untuk mengetahui perbandingan aktivitas antibakteri vinegar beras merah dan vinegar beras putih penulis tertarik untuk melakukan penelitian Aktifitas antibakteri vinegar beras ketan merah dan ketan putih terhadap bakteri gram positif dan gram negatif.

II. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Universitas Ekasakti dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Hasil Pertanian Universitas Andalas pada bulan April – Mei 2019. Penelitian ini menggunakan rancangan eksploratif dengan menggunakan isolat bakteri

gram negatif (*Eschericia coli* dan *Salmonella*) dan bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus dan Bacillus* .sp*)* koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Andalas. Vinegar diperoleh dari proses fermentasi beras ketan merah dan beras ketan putih dengan menggunakan bakteri *Acetobacter aceti*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah beras ketan merah dan beras ketan putih, ragi tapai yang diperoleh dari Pasar Raya Kota Padang, air, isolat bakteri *Acetobacter aceti*. *Nutrient agar* (NA) sebagai media pertumbuhan, amoxilin, akuades, H_2SO_4, $BaCl_2.2H_2O$, garam fisiologis.

Peralatan yang digunakan yaitu wadah fermentasi, daun pisang, oven, jarum ose, lampu Bunsen, Erlenmeyer 250 ml, tabung reaksi, pipet mikro, vortex, inkubator, *hot plate stirrer*, jangka sorong, kapas, plastik wrap, aluminium foil dan pinset

2.1 Pembuatan vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih modifikasi (Berlian, Aini dan Ulandari, 2016)

Beras ketan merah dan beras Ketan putih sebanyak 500 gram dibersihkan/dicuci. Kemudian dimasak dengan panci atau bisa menggunakan *magic com*. Setelah masak kemudian didinginkan di wadah. Selanjutnya timbang beras ketan merah dan beras ketan putih dibagi menjadi 3 bagian masing-masing seberat 100 gram. Taburkan serbuk ragi masing-masing sebanyak 1 % b/b selanjutnya diaduk sampai rata. Langkah selanjutnya dimasukkan kedalam wadah yaitu dari daun pisang ditutup rapat. Difermentasi selama 3 hari pada suhu kamar (28 – 30 ^oC). Setelah fermentasi 3 hari selanjutnya ditambahkan starter *Acetobacter aceti* sebanyak 10% dan dilanjutkan fermentasi selama 10 hari hingga terbentuk asam asetat.

2.2 Pengujian Aktifitas Zona Hambat Bakteri *E. Coli* dan *S. aureus* (Muljono, Fatimawali dan Manapiring, 2016).

2.2.1 Pembuatan Media

Media agar miring dibuat dengan cara melarutkan *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 2 gram dalam 100 ml aquades menggunakan erlenmeyer. Setelah itu dihomogenkan dengan *stirer* diatas *hot plate stirrer* sampai mendidih. Sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan *aluminium foil.* Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121^oC selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30^o. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri.

Media dasar dibuat dengan cara ditimbang *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 6 gram, lalu dilarutkan dalam 300 ml aquades menggunakan erlenmeyer. Setelah itu, media dihomogenkan dengan *stirer* diatas *hot plate stirer* sampai mendidih. Media- media yang sudah homogen ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121^oC selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai suhu ± 45-50^oC. Media ini siap digunakan dengan memasukkan bakteri sebanyak 0,2 ml setiap 100 ml media.

2.2.2 Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan (Larutan *McFarland)*

Larutan H_2SO_4 0,36 N sebanyak 99,5 ml dicampurkan dengan larutan $BaCl_2.2H_2O$ 1,175% sebanyak 0,5 ml dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji.

2.2.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,85% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji.

2.2.4 Pembuatan Media Pengujian

Lapisan dasar dibuat dengan menuangkan masing-masing 75 ml NA dan ditambahkan dengan suspense bakteri. Dibiarkan hingga media memadat pada *laminar air flow*. Selanjutnya, dibuat sumur sumur sesuai banyak nya sampel dengan menggunakan pangkal pipet steril hingga terbentuklah sumur-sumur yang akan digunakan dalam uji antibakteri.

2.2.5 Uji Aktivitas Antibakteri secara *In-vitro*

Larutan uji vinegar sebagai sampel, larutan akuades sebagai kontrol negatif; larutan amoxilin sebagai kontrol positif masing-masing diteteskan pada sumur yang berbeda sebanyak 0,2 ml. Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24 jam.

2.3 Pengamatan dan Pengukuran

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara diameter keseluruhan dikurangi diameter sumuran. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis and Stout (1971).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian aktifitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode sumuran dengan mengamati zona bening yang dihasilkan. Pengujian antibakteri dengan metode difusi sumuran dilakukan menggunakan produk vinegar, kontrol positif yang digunakan berupa amoxilin dan kontrol negatif berupa aquades steril. Kontrol positif berfungsi sebagai pembanding apakah layak atau tidak sampel vinegar digunakan sebagai antibakteri. Vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih terdapat pada Gambar 1.

Vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih memiliki senyawa antibakteri, vinegar mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif yang terlihat dari zona bening yang dihasilkan. Data hasil pengujian antibakteri *Eschericia coli, Bacillus* sp*, Salmonella* dan *Staphylococcus aereus* terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis aktibakteri vinegar terhadap bakteri gram positif dan gram negatif.

Perlakuan	Diameter (mm) *E. coli*	Diameter (mm) *S. aureus*	Diameter (mm) *Salmonella*	Diameter (mm) *Bacillus* sp
Vinegar beras ketan merah	30,5	35,3	35,3	31,1
Vinegar beras ketan putih	13,1	13,7	8,7	19
Kontrol positif	19,2	18,9	5,3	19,2
Kontrol negative	0	0	0	0

Keterangan : kontrol positif amoxilin dan kontrol negatif akuades steril

Tabel 1 menunjukkan bahwa vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli, Salmonella, Bacillus* sp dan *S. aureus*. Nilai zona hambat vinegar beras ketan merah terhadap bakteri *E. coli* sebesar 30,5 mm, bakteri *S. aureus* sebesar 35,5 mm, bakteri *Salmonella* sebesar 35,3 mm dan bakteri *Bacillus* sp sebesar 31,1 mm. Sedangkan nilai zona hambat vinegar beras ketan putih terhadap bakteri *E. coli* sebesar 13,1 mm, bakteri *S. aureus* sebesar 13,7 mm, bakteri *Salmonella* sebesar 8,7 mm dan bakteri *Bacillus* sp sebesar 19 mm.

Pengelompokkan daya antibakteri ini didasarkan menurut pendapat Davis dan Stout (1971), kriteria kekuatan daya antibakteri yaitu diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5 – 10 mm dikategorikan sedang. Zona hambat 10 – 20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan data diatas vinegar beras ketan merah dikategorikan memiliki daya antibakteri sangat kuat, baik terhadap bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Sementara untuk vinegar beras ketan putih pengelompokan daya antibakteri berbeda-beda. Pada bakteri *Bacillus* sp., vinegar beras ketan putih termasuk kedalam kelompok yang memiliki daya antibakteri sangat kuat. Pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus* vinegar beras ketan putih termasuk kedalam kelompok yang memiliki daya antibakteri kuat dan pada bakteri *Salmonella* vinegar beras ketan putih termasuk kedalam kelompok yang memiliki daya antibakteri lemah.

Pengujian aktifitas antibakteri vinegar terhadap bakteri gram negatif (*E. coli* dan *Salmonella*) menghasilkan zona hambat yang lebih kecil jika diabndingkan dengan gram positif (*S. aureus* dan *Bacillus* sp.). Bakteri gram negatif yang bersifat cenderung lebih resiten terhadap senyawa aktif. Hal inilah yang kemungkinan menyebabkan senyawa bioaktif yang ada pada vinegar tidak dapat menembus membran sel lebih besar dari pada bakteri *S. aureus*, sehingga penghambatan pertumbuhan lebih kecil. Sedangkan *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang struktur dinding selnya lebih sederhana. Bakteri ini cenderung lebih rentan terhadap aktifitas komponen antibakteri seperti senyawa fenolik dan penisilin. Struktur dinding sel yang sederhana menyebabkan senyawa antibakteri mudah untuk masuk kedalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Bakteri Gram negatif umumnya lebih tahan terhadap antibakteri dan desinfektan dibandingkan bakteri Gram positif yang tidak berspora dikarenakan bakteri Gram negatif memiliki lapisan lipopolisakarida pada membran selnya sehingga bisa menghalangi masuknya antibakteri dan kedalam sel (Anggraini dan Yuniningsih, 1999).

Gambar 1. Vinegar beras ketan putih dan beras ketan merah

Vinegar beras ketan putih memiliki daya antibakteri yang lebih lemah dibandingkan dengan vinegar beras ketan merah. Hal ini terjadi karena beras ketan merah memiliki senyawa aktif berupa fenol, flavonoid dan antioksidan

yang lebih tinggi. Senyawa fenol menghambat pertumbuhan populasi bakteri dengan memperpanjang fase lag secara proporsional di dalam tubuh atau di dalam produk sedangkan kecepatan pertumbuhan dalam fase eksponensial tetap tidak berubah kecuali konsentrasi fenol sangat tinggi, menambahakan senyawa yang sangat berperan sebagai antimikrobial dalam vinegar adalah senyawa fenol dan asam asetat, sifat antimikroba akan meningkat jika ada asam organik bersama dengan senyawa fenol (Kondo, Gunawan dan Rizke, 2017)

Laporan penggunaan vinegar sebagai bahan antibakteri bekerja dengan cara seperti hasil penelitian Zasshi, Entani, Asai, Tsujihata, Tsukamoto dan Ohta (1997), yang menyatakan aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal dari vinegar mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen di antaranya *E.coli* dan *Salmonella*. Menurut Daulay dan Rahman (1992) mengatakan bahwa cuka memiliki daya simpan yang lama disebabkan kandungan asetatnya. Asam asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk spora penyebab keracunan makanan dan dapat mencegah kapang penghasil metoksin. Waryat (2018), melaporkan bahwa penggunaan vinegar dapat memperpanjang umur simpan produk olahan seperti bakso, daging ayam dan tahu selama penyimpanan. Vinegar mampu berperan sebagai pengganti formalin dalam pengawetan bahan pangan.

(A)

(B)

Gambar 2. Pengujian vinegar terhadap bakteri gram positif dan gram negatif; A (Vinegar beras ketan merah; B (Vinegar beras ketan putih)

Vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih mengandung senyawa fenol yang bersifat antimikroba. Senyawa fenol merusak sel mikroba dengan mengubah permeabilitas membran sitoplasma, menyebabkan kebocoran bahan bahan intraseluler. Senyawa fenol yang terdapat pada vinegar antara lain *gallic acid, catechin, epicatechin,chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid* (Budak, Dogue, Savas, Seydim, Tas, Ciris dan Seydim, 2011). Komponen fenol juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap germinasi spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam proses germinasi.

IV. KESIMPULAN

Vinegar beras ketan merah dan beras ketan putih mempunyai potensi sebagai bahan antibakteri terhadap *E. coli, Salmonella, Bacillus* sp dan *S. aureus*. Nilai zona hambat vinegar beras ketan merah terhadap bakteri *E. coli* sebesar 30,5 mm, bakteri *S. aureus* sebesar 35,5 mm, bakteri *Salmonella* sebesar 35,3 mm dan bakteri *Bacillus* sp sebesar 31,1 mm. Sedangkan nilai zona hambat vinegar beras ketan putih terhadap bakteri *E. coli* sebesar 13,1 mm, bakteri *S. aureus* sebesar 13,7 mm, bakteri *Salmonella* sebesar 8,7 mm dan bakteri *Bacillus* sp sebesar 19 mm. Vinegar beras ketan merah memiliki potensi sebagai antibakteri yang lebih baik jika dibandingkan dengan vinegar beras ketan putih.

DAFTAR PUSTAKA

Anggraini, A. S. P dan Yuniningsih, S. 1999. Liquid smoke purification process forBenzo (A) pyrene levels lowering on food Ssafety. *J. Agric. Food Technol.*, 3 (12) 1–4.

Berlian, Z., Aini, F dan Ulandari, R. 2016. Uji kadar alkohol pada tapai ketan putih dan singkong melalui fermentasi dengan dosis ragi yang berbeda. Jurnal Biota Vol. 2 No. 1. 106-111.

Budak, H. N., D. K. Dogue, C. M. Savas, A. C. Seydim, T. K. Tas, I. M. Ciris, and Z. B. Guzel-Seydim. 2011. Effect of apple cider vinegar produced with different techniques on blood lipids in high cholesterol fed rats. J. Agric. Food Chem. 59 : 6638-6644.

Daulay, D dan A. Rahman.1992. Teknologi Fermentasi Sayur-Sayuran dan Buah-buahan. Bogor. IPB.

Davis, W. W dan Stout, T. R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Appl. Microbiol.*, 22 (4) 659–665.

Fardiaz, S. 1992. Analisis mikrobiologi pangan. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta

Hardoyo, Tjahjono, A. E., Primarini, D., Hartono dan Musa. 2007. Kondisi optimum fermentasi asam asetat menggunakan *Acetobacter aceti* B 166. J. Sains MIPA, Edisi Khusus Tahun 2007, Vol. 13, No. 11. 7-20

Jamilah, M. B., K. A. Abbas, and R. A. Rahman. 2008. A review on some organic acids additives as shelf life extenders of fresh beef cuts. American J. Agric. Biol. Sci. 3: 566-574.

Juniawati, Miskiyah dan Widaningrum. 2017. Aplikasi vinegar sebagai biopreservative untuk menghambat pertumbuhan *salmonella typhimurium* pada daging ayam segar. *Buletin Peternakan Vol. 41 (2): 187-196*

Kondo, S. A., Gunawan, W dan Rizke, C. 2017. Pengaruh pemberian asap cair pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan streptococcus sanguis penyebab gingivitis. *JKD* 6 (1) 106–113.

Kwartiningsih, E dan Mulyati, L. N. S. 2005. Fermentasi sari buah nanas menjadi *vinegar*. Ekuilibrium. Vol. 4. No. 1: 8–12.

MC Donnell, G dan Russel, D. A. 1999. Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance. *Clin. Microbiol* 12 (1) 147–179.

Muljono, P., Fatimawali dan Manampiring, A. E. 2016. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun mayana jantan (*Coleus astropurpureus* Benth) terhadap pertumbuhan bakteri Streptococcus Sp. dan Pseudomonas Sp. *J. e-Biomedik* 4 (1) 164–172.

Pratama, R. I., Husindan, U. A dan Trusda, S. A. D. 2015. Efek antibakteri cuka sari apel terhadap *Salmonella Typhi*. Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba (Kesehatan) 6001-606.

Priasty, E. W., Hasanuddin dan Dewi, K. H. 2013. Kualitas asam cuka kelapa (*Cocos nucifera L.*) dengan metode lambat (*slow methods*) Jurnal Agroindustri, Vol. 3 No. 1, Mei 2013: 1 – 13

Rahayu, F. I dan Suparti. 2015. Pemanfaatan salak (*Salacca zalacca*) sebagai bahan alternatif pembuatan cuka buah dengan penambahan konsentrasi *Acetobacter aceti* yang berbeda. Universitas MuhammadiyahSurakarta.

Zasshi K., E. Entani, M. Asai, S. Tsujihata, Y. Tsukamoto, and M. Ohta. 1997. Antibacterial action of vinegar against food borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 Part 1. Examination of Bacteriostatic and Bactericidal Activities. 71: 443-450.