

UJI SIFAT PROBIOTIK BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI KANDIDAT BAHAN PANGAN FUNGSIONAL

[Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria as Candidate for Functional Food]

Ida Susanti, Retno W. Kusumaningtyas, dan Fatim Illaningtyas

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri – BPPT
Jl. MH Thamrin 8 Jakarta 10340

Diterima 16 Juli 2007 / Disetujui 8 November 2007

ABSTRACT

Lactic acid bacteria have been reported to be useful as a health adjunct and are commonly added to food as delivery mechanism. As a probiotic, lactic acid bacteria should have the ability to survive in the digestion process such as resistance towards acidic pH, varieties of bile salt concentrations and enteric pathogen. In this study, lactic acid bacteria were isolated from various sources. Twenty isolates of lactic acid bacteria selected for their resistancy towards acidic pH (pH 2.5), 0.3% bile salt and their antagonistic activity against enteric pathogen (Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus). The result showed that most of all strains had good resistance to acidic pH and there were no significant difference among them ($p>0,05$). More over, all strains showed tolerance to 0,3% bile salt concentration (varieties among isolates were significant $p>0,05$). All strains showed inhibition activity against enteric pathogen bacteria, this was estimated from the size of the diameter of the inhibition zones. (The inhibition were significantly different among them ($p>0,05$)). The best five strains that fulfilled these properties were L casei FNCC262, L. acidophilus FNCC116, KL-3 isolate, Da-1 isolate, and Db-2 isolate. These strains could be used as probiotics in further and applications.

Key words : acid-tolerant, bile tolerant, antagonistic activity, lactic acid bacteria.

PENDAHULUAN

Probiotik, berdasarkan definisi yang umum diterima, merupakan suplemen pangan yang berasal dari mikroba hidup yang menguntungkan kesehatan inangnya dengan cara memperbaiki komposisi mikrobiota usus. Bakteri asam laktat, khususnya yang bersifat sebagai probiotik, banyak digunakan sebagai suplemen pangan dengan berbagai manfaat bagi kesehatan. Bakteri ini, khususnya dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* memiliki banyak efek positif seperti aktivitas antimikroba, aktivitas antikolesterol, efek stimulasi sistem imun, meningkatkan penyerapan laktosa oleh tubuh, mencegah diare serta aktivitas antimitogenik sehingga dapat mencegah penyakit kanker khususnya kanker usus (Fuller, R., 1992, Surono, I., 2004 dan Hill, M.J., 1995).

Perubahan gaya hidup, pola makan dan kondisi sakit dapat merubah stabilitas ekosistem flora usus. Untuk memperbaiki kondisi ini dapat dilakukan dengan cara manajemen flora usus dengan cara meningkatkan proporsi bakteri yang baik untuk menekan bakteri patogen. Manajemen flora usus dapat dilakukan dengan mengkonsumsi pangan fungsional yang mengandung bakteri probiotik serta menyediakan nutrisi yang sesuai untuk mendukung pertumbuhannya (Surono, I., 2004).

Ada beberapa karakteristik yang harus dipertimbangkan untuk menentukan apakah suatu

mikroba berpotensi untuk menjadi kultur probiotik. Diantaranya adalah ketahanan terhadap asam dan garam empedu, sebab untuk dapat bertahan dan tumbuh di dalam saluran pencernaan, kultur probiotik harus melewati beberapa rintangan seperti keasaman lambung yang tinggi dan sekresi garam empedu pada usus yang dapat berpengaruh buruk bagi kultur mikroba. Disamping itu bakteri tersebut juga harus mampu bersaing dengan bakteri enterik patogen dalam saluran pencernaan (Gilliland, et al, 1984 dan Salminen, 1993).

METODOLOGI

Bakteri dan media

Beberapa galur *Lactobacillus* yang digunakan, diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection, Gajah Mada University, Yogyakarta. Sedangkan beberapa isolat bakteri asam laktat yang dipergunakan adalah hasil isolasi dari berbagai sumber nabati dan bahan berbasis susu (Tabel 1). Semua strain ditumbuhkan secara fakultatif-aerob pada media deMan Rogosa and Sharp Broth (Oxoid) pada 37°C selama 18-20 jam. Kultur stok dibuat dengan menumbuhkan strain selama 18-20 jam, kemudian dipanen dengan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 15 menit. Pelet dicuci dua kali dengan 0.1% pepton water, kemudian direkonstitusi dengan larutan 10% susu skim + 1% MSG steril, dan ditambahkan 20% glycerol. Setiap cryo-tubes segera

dibekukan dan disimpan pada suhu -80°C untuk pemakaian selanjutnya. Setiap percobaan menggunakan kultur stok untuk diinokulasikan ke dalam media. Masing-masing bakteri disubkultur dalam MRSB dua kali sebelum digunakan dalam pengujian.

Untuk pengujian aktivitas antagonistik digunakan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. Ketiga bakteri enterik patogen ini diperoleh dari PAU Pangan dan Gizi, IPB Bogor.

Analisis

Pengujian ketahanan terhadap asam

Pengujian ketahanan terhadap asam dilakukan dengan metode hitungan cawan seperti yang dilakukan oleh Chou dan Weimer (1999) dengan modifikasi pada kondisi sentrifugasi dan pH media untuk uji keasaman. Kultur bakteri asam laktat dalam 10 ml MRSB berumur 24 jam dipanen dengan sentrifugasi pada 3,500 rpm, 15 menit, 4°C . Pelet dicuci dengan NaCl 0.85% steril, kemudian resuspensi sel dimasukkan 1% (v/v) dalam 10 ml MRSB (kontrol) dan MRSB yang diatur pada pH 2,5 menggunakan HCl pekat, selanjutnya diinkubasi pada 37°C , 90 menit. Setelah inkubasi, dilakukan plating MRSA dengan metode tuang, dan diinkubasi pada 37°C , 48jam. Ketahanan terhadap asam dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh pada kondisi kontrol dengan perlakuan pengaturan pH 2,5. Semakin kecil selisih semakin tahan galur yang diuji terhadap pH rendah.

Pengujian ketahanan terhadap garam empedu

Pengujian terhadap garam empedu dilakukan menurut Klaenhammer dan Kleeman (1981). Sebanyak 1

ml kultur bakteri asam laktat dalam MRSB berumur 20 jam dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl 0,85%. Setelah dilakukan pengenceran berseri, dilakukan hitungan cawan pada MRSA yang mengandung 0.3% oxgall (Oxoid) / garam empedu, dan pada MRSA sebagai kontrol, dengan metode tuang lalu diinkubasi pada 37°C , 24-48 jam. Ketahanan terhadap garam empedu dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh pada kondisi kontrol dengan perlakuan adanya garam empedu. Semakin kecil selisih semakin tahan galur yang diuji terhadap garam empedu.

Pengujian aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen

Untuk mendeteksi aktivitas antagonistik dilakukan pengujian difusi agar seperti yang dilakukan oleh Jin et.al (1996), dengan modifikasi pada penuangan kultur bakteri patogen. Media Nutrient agar (Oxoid) steril diatur pada 45°C , kemudian diinokulasi dengan kultur bakteri patogen berumur 24 jam dalam Nutrient Broth sebanyak 0.2% dan dicampur sampai homogen. Sebanyak 20 ml NA yang telah diinokulasi dituang ke dalam cawan petri secara merata dan dibiarkan pada suhu 4°C , 1 jam. Dibuat lubang berdiameter 6 mm pada agar dalam cawan petri sebanyak 5 lubang setiap petri. Galur bakteri asam laktat berumur 18-20 jam dalam MRSB dimasukkan sebanyak 50 μl setiap lubang. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diukur jari-jari area bening disekeliling lubang. Aktivitas antagonistik bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen dinyatakan sebagai diameter area bening yang terbentuk.

Tabel 1. Bakteri asam laktat yang digunakan

Strain	Asal galur
<i>Lactobacillus acidophilus</i> FNCC 116	Moromi kecap
<i>Lactobacillus casei</i> FNCC 262	Tape ketan
<i>Lactobacillus brevis</i> FNCC 021	Tidak tahu
<i>Lactobacillus mesenteroides</i> FNCC 023	Tidak tahu
<i>Lactobacillus plantarum</i> FNCC 027	Growol
KL-1	Air kelapa
KL-2	Air kelapa
<i>Lactobacillus plantarum</i> KL-3	Air kelapa
Da-1	Dadih
Da-2	Dadih
Da-3	Dadih
Db-1	Dadih
Db-2	Dadih
Db-3	Dadih
KJ-1	Keju
KJ-2	Keju
KJ-3	Keju
KJ-4	Keju
F-2	Feses bayi umur 18 hari
F-3	Feses bayi umur 18 hari

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketahanan terhadap asam

Kebanyakan bakteri asam laktat tidak hanya tumbuh lebih lambat pada pH rendah, tetapi mungkin juga mengalami kerusakan dan hilangnya viabilitas jika selnya berada pada kondisi pH rendah. Akan tetapi toleransi relatif dari mikroorganisme terhadap lingkungan asam tergantung dari galur bakteri tersebut. Pada penelitian ini ketahanan isolat bakteri terhadap pH rendah dilakukan pada pH ekstraseluler 2.5 selama 30 menit. Hasil tercantum pada Gambar 1. Hampir semua galur memiliki ketahanan yang baik untuk tumbuh pada pH rendah dan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada ketahanan terhadap asam dari galur bakteri asam laktat yang diuji. Selisih log jumlah koloni pada pH rendah dibandingkan kontrol pada isolat F-2, F-3 KL-1, dan KL-3 kurang dari 1 unit log/ml. Sementara galur/isolat yang lain mengalami penurunan tidak lebih dari 3 unit log/ml. Hasil tersebut seiring dengan beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa bakteri asam laktat terutama laktobasili termasuk bakteri yang paling tahan terhadap kondisi asam (Kashket 1987, Russel dan Diaz-Gonzales 1998).

Kondisi yang sangat asam dapat mengakibatkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler yang dapat menyebabkan kematian. Bakteri yang tahan asam memiliki ketahanan yang lebih besar terhadap kerusakan membran akibat penurunan pH ekstraseluler dibandingkan dengan bakteri yang tidak tahan terhadap asam. Toleransi bakteri asam laktat yang cukup tinggi terhadap asam biasanya juga disebabkan karena bakteri tersebut mampu mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali daripada pH ekstraseluler (Nannen dan Hutkins, 1991). Untuk mempertahankan pH sitoplasma lebih basa, sel harus memiliki membran yang merupakan barier yang membatasi pergerakan senyawa/proton. Komposisi asam lemak dan protein penyusun membran yang beragam di antara spesies bakteri, diduga mempengaruhi keragaman ketahanan bakteri terhadap pH rendah.

Untuk bertahan di lingkungan asam, bakteri asam laktat harus mempertahankan pH intraseluler yang lebih tinggi dibanding pH ekstraseluler. Tidak seperti bakteri yang tidak tahan asam yang menjaga pH intraselulernya mendekati netral, pada bakteri asam laktat terjadi perubahan yang dinamis pada pH intraselulernya seiring dengan terjadinya penurunan pH ekstraseluler (Nannen dan Hutkins, 1991), sehingga dapat mempertahankan tingkat perbedaan pH yang konstan dengan pH ekstraselulernya.

Ketahanan terhadap garam empedu

Untuk dapat bertahan dan tumbuh pada saluran pencernaan, bakteri asam laktat sebagai kultur probiotik harus mampu melewati berbagai kondisi

lingkungan yang menekan. Salah satunya adalah pada saat bakteri memasuki bagian atas saluran usus, dimana empedu disekresikan ke dalam usus. Cairan empedu merupakan campuran dari asam empedu, kolesterol, asam lemak, fosfolipid, pigmen empedu dan sejumlah xenobiotik terdetoksifikasi. Kombinasi tersebut bersifat bakterisidal bagi mikroorganisme komensal dalam tubuh, kecuali beberapa genus penghuni usus yang tahan terhadap garam empedu (Hill, 1995). Hasil penelitian terhadap pengaruh garam empedu terdapat pada Gambar 2. Hasil menunjukkan bahwa semua galur yang diuji memiliki ketahanan untuk tumbuh dalam media yang mengandung 0,3% oxgall, dan terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$). Semua galur mempunyai selisih jumlah koloni antara perlakuan dibandingkan dengan kontrol, sebesar kurang dari 1 unit log CFU/ml.

Pada penelitian ini terlihat bahwa galur/isolat yang diisolasi dari sumber yang sama tidak memberikan karakteristik ketahanan terhadap garam empedu yang sama. Misalnya isolat Da-1 dan Da-2 yang diisolasi dari dadih menunjukkan ketahanan yang berbeda. Sehingga dapat dilihat bahwa keragaman toleransi bakteri asam laktat terhadap garam empedu tidak berhubungan dengan perbedaan spesies, akan tetapi tergantung dari masing-masing galur (*strain dependent*) (Gilliland et al., 1984; Usman dan Hosono, 1999). Derajat tahan terhadap garam empedu merupakan karakteristik yang penting bagi bakteri asam laktat, sebab berpengaruh terhadap aktivitasnya dalam saluran pencernaan (Gilliland et al., 1984).

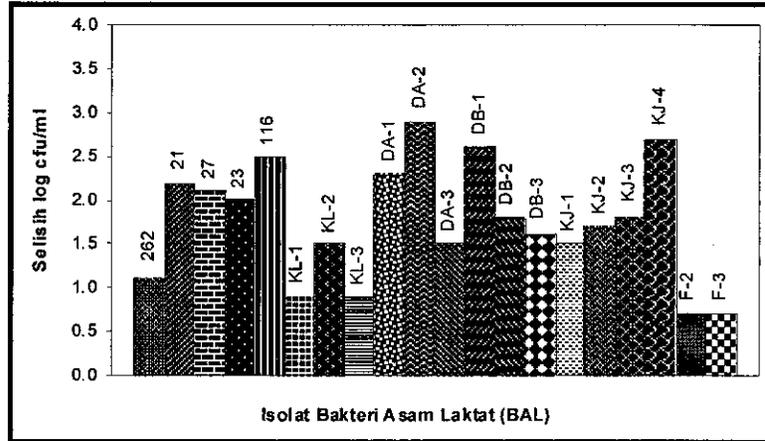
Garam empedu berpengaruh terhadap permeabilitas sel bakteri. Sel bakteri asam laktat yang tahan terhadap garam empedu, bila diinkubasi pada larutan penyangga yang mengandung oxgal masih terjadi pertumbuhan dan tidak mengalami lisis, namun mengalami peningkatan kebocoran materi intraseluler. Hal ini berarti terjadi perubahan sifat permeabilitas pada membran sel bakteri. Pada bakteri yang tidak tahan garam empedu, perubahan permeabilitas sel dan kebocoran materi intraseluler lebih besar, sehingga sel mati karena lisis (Noh dan Gilliland, 1993). Empedu bersifat sebagai senyawa aktif permukaan. Sifat ini pula yang menyebabkan aktifnya enzim lipolitik yang disekresikan pankreas (Hill, 1995). Enzim ini bereaksi dengan asam lemak pada membran sitoplasma bakteri, sehingga mengakibatkan perubahan struktur membran dan sifat permeabilitasnya. Keragaman struktur asam lemak pada membran sitoplasma bakteri menyebabkan perbedaan permeabilitas dan karakteristiknya sehingga mungkin mempengaruhi ketahanannya terhadap garam empedu.

Aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen

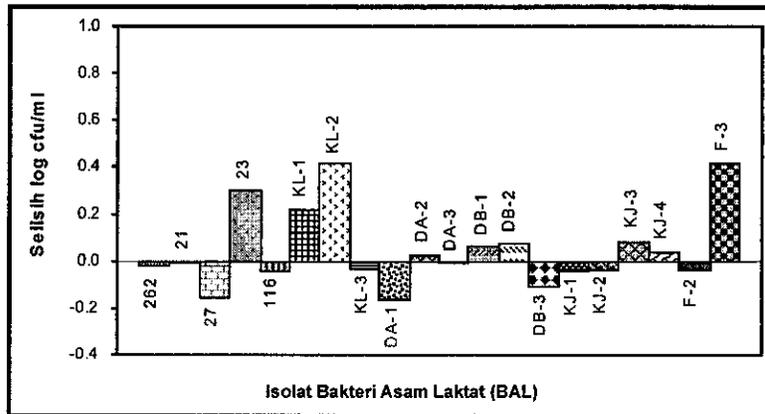
Salah satu kriteria yang diinginkan dari bakteri asam laktat yang digunakan sebagai kultur probiotik adalah kemampuannya untuk menghambat bakteri patogen sehingga mampu berkompetisi dengan bakteri

patogen untuk mempertahankan keseimbangan mikroflora normal usus (Fuller 1989). Pada penelitian ini digunakan tiga spesies bakteri patogen yaitu *S. aureus*, *B. cereus* dan *E. coli* yang berturut-turut mewakili bakteri

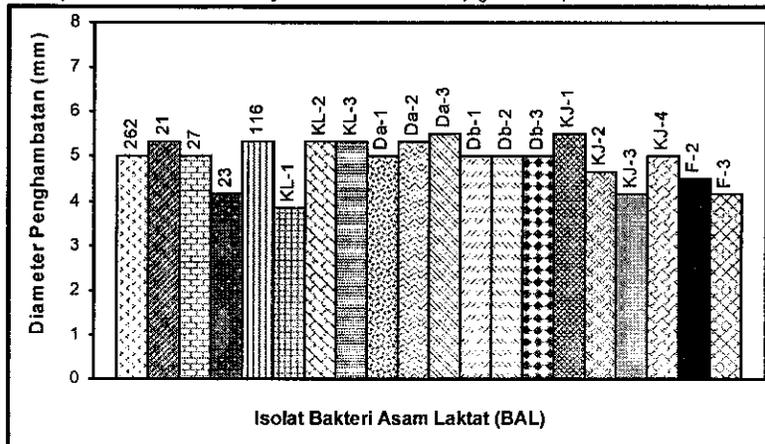
Gram positif tidak membentuk spora, Gram positif pembentuk spora serta bakteri Gram negatif. Aktivitas antagonistik bakteri asam laktat terhadap *S. aureus*, *B. cereus* dan *E. coli* tercantum pada Gambar 3 sampai 5.



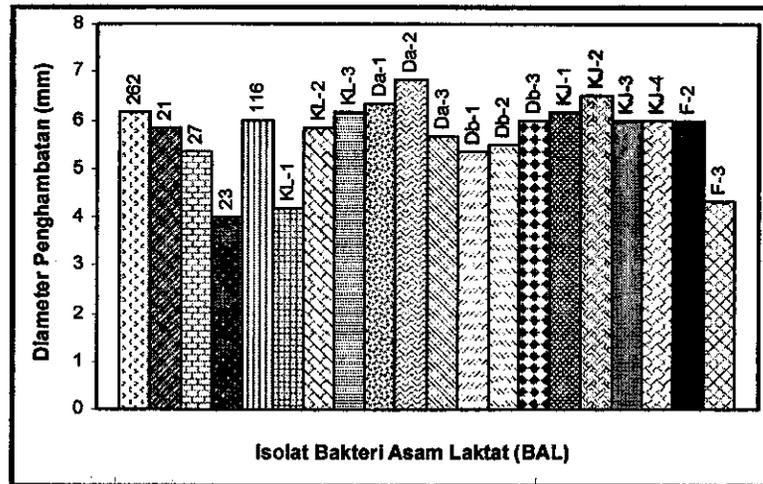
Gambar 1. Hasil uji ketahanan BAL terhadap asam (pH rendah). Selisih log CFU/ml merupakan indikasi ketahanan BAL terhadap pH rendah, makin kecil selisihnya makin tahan terhadap pH rendah.



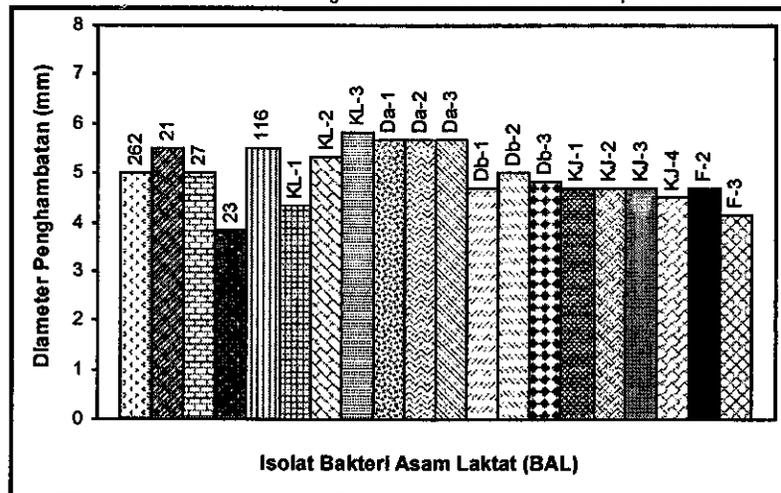
Gambar 2. Hasil Uji Ketahanan BAL Terhadap Garam Empedu. Selisih log CFU/ml merupakan indikasi ketahanan BAL terhadap garam empedu, makin kecil selisihnya makin tahan terhadap garam empedu.



Gambar 3. Aktivitas antagonistik bakteri asam laktat terhadap *Staphylococcus aureus*.



Gambar 4. Aktivitas antagonistik bakteri asam laktat terhadap *Bacillus cereus*.



Gambar 5. Aktivitas antagonistik bakteri asam laktat terhadap *Escherichia coli*.

Hasil di atas menunjukkan bahwa semua galur bakteri asam laktat yang diuji memiliki aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen dengan derajat penghambatan yang berbeda secara nyata ($p > 0,05$). Kisaran diameter penghambatan terhadap *S. aureus*, *B. cereus* dan *E. coli* berturut-turut adalah 3,8 – 5,5 ; 4,0 – 6,8 dan 3,8 – 5,8 mm.

Pada pengujian aktivitas antagonistik terhadap *S. aureus*, isolat KJ-1 (dari keju) dan Da-3 (dari dadih) menunjukkan aktivitas penghambatan yang terbesar, yaitu 5,5 mm. Sedangkan isolat KL-1 (dari air kelapa) menunjukkan aktivitas terkecil yaitu sebesar 3,8 mm. Aktivitas antagonistik yang tertinggi terhadap *B. cereus*, ditunjukkan oleh isolat Da-2 (dari dadih) dengan diameter penghambatan sebesar 6,8 mm. Sedangkan galur *Lactobacillus mesenteroides* FNCC023 memberikan penghambatan yang kecil terhadap *B. cereus* yaitu

sebesar 4,0 mm. Hasil pengujian penghambatan terhadap *E. coli* menunjukkan bahwa isolat KL-3 (dari air kelapa) menunjukkan aktivitas penghambatan yang terbesar, yaitu 5,8 mm. Sedangkan galur *Lactobacillus mesenteroides* FNCC023 memberikan penghambatan yang kecil terhadap *E. coli* yaitu sebesar 3,8 mm.

Dari hasil tersebut terlihat bahwa aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen oleh bakteri asam laktat yang diisolasi dari sumber yang sama ternyata menunjukkan derajat penghambatan yang berbeda (bersifat strain dependent). Bakteri asam laktat menghasilkan senyawa antimikroba diantaranya adalah asam-asam organik, hidrogen peroksida, dan senyawa protein atau kompleks protein spesifik yang disebut bakteriosin (Salminen dan Wright 1993). Dalam penelitian ini tidak diidentifikasi jenis senyawa antimikroba apa yang dihasilkan, tetapi beberapa

penelitian telah membuktikan bahwa bakteri asam laktat menghasilkan beberapa senyawa yang menghambat pertumbuhan mikroba. Akumulasi senyawa tersebut di dalam sel terjadi karena bakteri asam laktat tidak menghasilkan enzim katalase (Salminen dan Wright, 1993).

Pemilihan galur probiotik

Dari hasil uji probiotik terhadap 20 galur/isolat bakteri asam laktat, dipilih beberapa isolat yang menunjukkan aktivitas antagonistik yang besar terhadap bakteri enterik patogen, serta memiliki ketahanan yang baik pada pH rendah dan garam empedu. Diagram

pemilihan galur dengan sifat probiotik dapat dilihat pada Gambar 6. Pada diagram tersebut dipilih galur-galur yang potensial pada setiap pengujian. Galur yang potensial pada uji ketahanan terhadap pH rendah dan garam empedu adalah galur yang menunjukkan selisih jumlah koloni yang kecil pada uji tersebut. Sedangkan uji aktivitas antagonistik terhadap patogen, galur yang dianggap potensial adalah yang menunjukkan diameter penghambatan yang besar.

Tabel 6, ada 5 galur yang terpilih bersifat probiotik yaitu *L. casei* FNCC 262, *L. acidophilus* FNCC 116, isolat KL-3, DA-1 dan DB-2.

Tabel 6. Pemilihan galur bakteri dengan sifat probiotik

Uji ketahanan terhadap pH rendah	Uji ketahanan terhadap Garam empedu	Uji ketahanan terhadap <i>S. aureus</i>	Uji ketahanan terhadap <i>B. cereus</i>	Uji ketahanan terhadap <i>E. coli</i>
	DA-1	DA-3	DA-2	<u><i>L. plantarum</i></u> KL-3
Antara galur tidak berbeda nyata	<i>L. plantarum</i> FNCC 027	KJ-1	KJ-2	DA-1
	DB-3	KL-2	DA-1	DA-2
	KJ-1	<u><i>L. plantarum</i></u> KL-3	<u><i>L. casei</i></u> FNCC 262	DA-3
Semua galur	KJ-2	DA-2	<u><i>L. plantarum</i></u> KL-3	<u><i>L. acidophilus</i></u> FNCC 116
potensial	<u><i>L. acidophilus</i></u> FNCC 116	<i>L. brevis</i> FNCC 021	<u><i>L. acidophilus</i></u> FNCC 116	KL-2
	<u><i>L. plantarum</i></u> KL-3	<u><i>L. acidophilus</i></u> FNCC 116	KJ-1	<i>L. brevis</i> FNCC 021
	F-2	<u><i>L. casei</i></u> FNCC 262	<i>L. brevis</i> FNCC 021	<u><i>L. casei</i></u> FNCC 262
	<u><i>L. casei</i></u> FNCC 262	DA-1	KJ-4	DB-2
		DB-2	F-2	<i>L. plantarum</i> FNCC 027
		DB-1	KL-2	
		DB-3	DB-2	

KESIMPULAN

Dari hasil uji sifat probiotik terhadap 20 galur/isolat bakteri asam laktat pada ketahanannya terhadap asam, garam empedu dan aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen, dilakukan analisa menggunakan analisis ragam untuk mengetahui galur/isolat yang berpotensi sebagai kandidat probiotik. Dari masing-masing kriteria uji terpilih beberapa isolat yang potensial, dan sebagai hasilnya dipilih 5 isolat yang memenuhi kriteria seleksi di atas yaitu *L. casei* FNCC262, *L. acidophilus* FNCC116, isolat KL-3, isolat DA-1 dan isolat DB-2.

DAFTAR PUSTAKA

Chou L.Z. and Weimer B. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *L. acidophilus*. J Dairy Sci 82:23-31

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66:365-378

Fuller R. 1992. Probiotics: The Scientific Basis. Chapman & Hall. New York. NY

Gilliland SE., Stanley TE, and Bush LJ. 1984. Importance of bile tolerance of *L. acidophilus* used as a dietary adjunct. J Dairy Sci 67:3045-3051

Hill MJ. 1995. Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology. New York: Taylor and Francis.

- Jin LZ, Ho YW., Abdullah N, Ali MA and Jalaludin S. 1996.** Antagonistic effects of intestinal lactobacillus isolates on pathogens of chicken. *Lett Appl Microbiol* 23:67-71
- Kashket ER. 1987.** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev* 46:233-244.
- Klaenhammer TR, and Kleeman EG. 1981.** Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *L. acidophilus*. *Appl and Environmental Microbiology* 41:1461-1467.
- Nannen NL and Hutkins RW. 1991(a).** Intracellular pH effect in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 74:741-746
- Nannen NL and Hutkins RW. 1991(b).** Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 74:747-751
- Noh DO and Gilliland SE. 1993.** Influence of bile on cellular integrity and β -galactosidase activity of *L. acidophilus*. *J Dairy Sci* 76:1253-1259
- Russel JB, and Diaz-Gonzales. 1998.** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol* 39:205-234
- Salminen S, and von-Wright A. 1993.** *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker.
- Surono, I, 2004.** *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta : Tri Cipta Karya.
- Usman and Hosono A. 1999.** Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *L. gasseri* Strains. *J Dairy Sci* 82:243-248.