

PENGARUH INFEKSI *Escherichia coli* DAN PEMBERIAN *Lactobacillus plantarum* Dad 13 TERHADAP MIKROBIOTA FESES TIKUS WISTAR

The Effects of Infection of Escherichia coli and Addition of Lactobacillus plantarum Dad 13 to Wistar Rats Fecal Microbiota

Bekti Tri Sumaryati¹, Tyas Utami², Suparmo²

¹Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Yogyakarta 55281. ²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Yogyakarta 55281

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari aktivitas antibakteri *Lactobacillus plantarum* Dad 13 terhadap *Escherichia coli* patogen penyebab diare secara *in vitro*, dan pengaruh infeksi *E. coli* patogenik dan pemberian *L. plantarum* Dad 13 terhadap mikrobiota feses tikus Wistar. Tikus percobaan diberi pakan standar selama lima hari, kemudian dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama, tikus diinfeksi dengan 10^{10} CFU *E. coli* patogen, sedang tikus pada kelompok kedua diberi *L. plantarum* Dad 13 sebanyak 10^9 cfu selama satu minggu. Sebelum dan setelah perlakuan, dilakukan enumerasi *E. coli*, coliform, dan lactobacilli pada feses tikus. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa secara *in vitro* *Lactobacillus sp.* Dad 13 dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* patogenik. Infeksi dengan 10^{10} CFU *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin pada tikus Wistar tidak meningkatkan jumlah *E. coli* dan coliform, namun menurunkan jumlah lactobacilli sebesar 0,4 siklus log. Pemberian *L. plantarum* Dad 13 tidak dapat menurunkan jumlah *E. coli* dan coliform, namun dapat meningkatkan jumlah lactobacilli sebesar 1,2 siklus log. Infeksi *E. coli* dan pemberian *L. plantarum* Dad 13 mengubah rasio mikrobial dalam feses.

Kata kunci: *Lactobacillus plantarum* Dad 13, *Escherichia coli*, mikrobial feses

ABSTRACT

The antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* Dad 13 to pathogenic *Escherichia coli* was studied *in vitro* using well diffusion method. The effects of *E. coli* infection and addition of *L. plantarum* Dad 13 on fecal microbiota of Wistar rats were studied *in-vivo*. Rats were fed with standard feed. After five days they were divided into two groups. Rats in the first group were infected with 10^{10} CFU *E. coli* enterotoxigenic stable toxin and rats in the second group were fed with 10^9 CFU *L. plantarum* Dad 13 for a week. Samples were taken before and after treatment for enumeration of *E. coli*, coliform, and lactobacilli in the feses. The results showed that *L. plantarum* Dad 13 could inhibit pathogenic *E. coli* indicated by clear zones. *Escherichia coli* infection didn't significantly increased the count of *E. coli* and coliform in the feses, but reduced 0.4 log cycle of the total lactobacilli. *Lactobacillus plantarum* Dad 13 increased 1.2 log cycle of the total lactobacilli, but did not reduced the count of *E. coli* and coliform. Infection of *E. coli* and addition of *L. plantarum* Dad 13 changed the ratio among fecal microbiota of rats.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* Dad 13, *Escherichia coli*, fecal microbiota

PENDAHULUAN

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri penyebab diare di Indonesia. Diare masih merupakan salah satu penyakit utama pada bayi di Indonesia. Data dari Departemen Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan bahwa diare

menjadi penyebab kematian bayi dan anak di bawah lima tahun di Indonesia selain radang paru-paru. Berdasarkan profil kesehatan Indonesia 2003, penyakit diare menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di Rumah Sakit. Sanitasi yang

buruk merupakan penyebab banyaknya kontaminasi bakteri *Escherichia coli* yang dikonsumsi masyarakat (Adisasmito, 2007).

Hasil penelitian Ogawa dkk. (2001) menunjukkan bahwa pemberian bakteri probiotik *Lactobacillus casei* strain Shirota dalam susu dapat mencegah terjadinya diare akibat *E. coli* penghasil toksin pada kelinci yang masih bayi. Pemberian susu fermentasi yang mengandung *L. casei* DN-114 001 dapat mengurangi gejala dan lama waktu diare tikus berumur 2-10 hari yang belum disapih karena rotavirus (Guerin-Danan dkk., 2001). Adanya *Bifidobacterium bifidum* di dalam usus mencit mampu menghambat pembentukan toksin oleh *E. coli* O157:H7 (Asahara dkk., 2004). Zhao (1998) menemukan bahwa pemberian probiotik pada anak sapi dapat mengurangi jumlah *E. coli* O157:H7.

Probiotik merupakan makanan tambahan yang berupa sel mikrobial hidup yang dapat memberikan keuntungan bagi inangnya dengan memperbaiki keseimbangan mikrobiota dalam usus jika diberikan pada jumlah tertentu (Fooks dkk., 1999). Mikrobial dapat digolongkan sebagai probiotik jika menguntungkan bagi inang, bersifat non-patogen dan non-toksik, ketika dikonsumsi masih hidup dengan jumlah yang cukup besar, serta dapat bertahan hidup dan melakukan aktivitas metabolik di dalam saluran pencernaan (Fuller, 1989). Keberadaan probiotik dalam saluran pencernaan memacu kesehatan usus inang. Manfaat dari probiotik antara lain menyeimbangkan mikrobiota intestinum, menurunkan intoleransi terhadap laktosa, menekan terjadinya kanker kolon, menurunkan kolesterol darah, membantu pencernaan makanan, meningkatkan motilitas usus sehingga mencegah terjadinya konstipasi, dan mengurangi infeksi patogen dalam usus (Gorbach, 2000). Berbagai mikrobial berpotensi sebagai probiotik termasuk *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* (Holzapfel dan Schillinger, 2002).

Potensi bakteri asam laktat dari sumber lokal yang sudah diteliti antara lain adalah kemampuan menurunkan kolesterol (Ngatirah, 2000; Kusumawati dkk., 2003; Lestari, 2003), menurunkan kadar laktosa yoghurt (Kasmiati dkk., 2002), dan meningkatkan kesehatan ayam (Karyantina, 2004). *Lactobacillus plantarum* Dad 13 merupakan salah satu strain bakteri asam laktat yang mampu menurunkan kolesterol dan menurunkan kadar laktosa yoghurt. Bakteri ini relatif tahan pada pH 3,0 dan dapat hidup dan tumbuh pada kadar garam empedu 0,5 % (Utami dkk., 2009).

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari aktivitas antibakteri *L. plantarum* Dad 13 terhadap *E. coli* secara *in vitro*, dan mempelajari pengaruh infeksi *E. coli* patogenik dan pemberian *L. plantarum* Dad 13 terhadap mikrobiota feses tikus.

METODOLOGI

Bahan

Lactobacillus plantarum Dad 13 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC) Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Bakteri asam laktat disimpan dalam 10 % gliserol dan 10 % susu skim (1:1) pada suhu -20°C . Bakteri patogen yang digunakan adalah *Escherichia coli* FNCC 0091, *Salmonella typhimurium* FNCC 167, dan *Staphylococcus aureus* FNCC 157 (koleksi FNCC, Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM, serta *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin, *E. coli* enterotoksigenik labil toksin, *E. coli* enteropatogenik OK 111, dan *E. coli* enteropatogenik yang diperoleh dari Dinas Kesehatan Daerah Istimewa Yogyakarta. Tikus percobaan yang digunakan adalah Wistar jantan usia 4 minggu, yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. Media TBX agar, VRBA, dan Rogosa agar masing-masing digunakan untuk uji *E. coli*, coliform, dan *Lactobacilli*.

Uji Aktivitas Antibakteri Patogen Secara *in vitro*

Aktivitas anti-bakteri patogen diuji dengan metode difusi agar. Suspensi bakteri patogen diinokulasikan pada media NA lunak secara *pour plate* dalam cawan petri, dan disimpan dalam suhu 4°C selama 1-1,5 jam untuk mencegah pertumbuhan bakteri selama agar mengeras. Kemudian dibuat sumuran pada setiap kultur bakteri patogen dan suspensi *L. plantarum* Dad 13 diteteskan sebanyak 50 μl ke dalamnya, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemampuan penghambatan bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen ditunjukkan dengan adanya zona jernih di sekeliling sumuran (Davidson dan Parish, 1989).

Penentuan Waktu Transit

Delapan belas ekor tikus berumur 1 bulan diadaptasi, dengan diberi pakan menurut standar AIN-93 selama 2 hari, dengan komposisi (per kg pakan) adalah: 620,7 g pati jagung, 140 g kasein, 100 g sukrosa, 40 g minyak kedelai, 50 g selulosa, 35 g campuran mineral, 10 g campuran vitamin, 1,8 g L-sistin, dan 2,5 g kolin bitartrat (Reeves dkk., 1993). Kemudian tikus diberi pakan standar yang mengandung marker Cr_2O_3 selama 1 hari dan selanjutnya defekasi diamati pada jam ke-8 dan ke-18. Feses yang mengandung marker berwarna hijau kehitaman.

Penyiapan Suspensi Sel Bakteri *E. coli* dan *L. plantarum* Dad 13

Sebanyak 1 ml kultur stok *E. coli* (10 % v/v) diinokulasikan ke dalam 9 ml media Tryptic Soy Broth (TSB) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 22 jam. Perbanyak sel dilakukan secara bertahap menggunakan 10 % (v/v) inokulum dalam media dan kondisi inkubasi yang sama sampai diperoleh volume kultur 1.000 ml. Selanjutnya dilakukan enumerasi koloni bakteri menggunakan media NA. Untuk memisahkan pelet dari cairannya dilakukan sentrifugasi pada 1.811 g selama 20 menit (sentrifugator Heraeus sepatech). Pelet yang diperoleh dicuci 3 kali dengan larutan 0,85 % NaCl. Selanjutnya sel disuspensikan ke dalam 10 % susu skim sehingga diperoleh jumlah sel 10¹⁰ CFU/ml.

Penyiapan suspensi *L. plantarum* Dad 13 dilakukan dengan menginokulasikan 0,5 ml kultur stok ke dalam 4,5 ml media MRS cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Perbanyak sel dilakukan secara bertahap menggunakan 10 % (v/v) inokulum dalam media dan kondisi inkubasi yang sama sampai diperoleh volume kultur 500 ml. Selanjutnya dilakukan enumerasi koloni bakteri pada media PGY ditambah 1 % CaCO₃. Selanjutnya kultur tersebut disentrifugasi pada 1.811 g selama 20 menit, dan pellet yang diperoleh dicuci 3 kali dengan larutan 0,85 % NaCl. Sel tersebut kemudian disuspensikan dalam 10 % susu skim sehingga diperoleh jumlah sel 10¹⁰ CFU/ml. Suspensi sel *E. coli* dan *L. plantarum* Dad 13 masing-masing dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf steril dan disimpan pada suhu 4 °C.

Penentuan Dosis Infeksi

Sebanyak 18 ekor tikus yang telah diadaptasi dipuaskan selama satu malam. Pagi hari berikutnya tikus diberi pakan standar sebanyak setengah dari jumlah pakan sehari. Tikus kemudian dibagi menjadi tiga kelompok, kelompok pertama diinfeksi *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin, kelompok kedua diinfeksi *E. coli* enteropatogenik OK 111, dan kelompok ketiga diinfeksi *E. coli* enteropatogenik. Infeksi dilakukan secara *force feeding* dan dilakukan sore atau malam hari. Suspensi sel yang diberikan sebanyak 0,1 ml yang mengandung 10⁸ CFU dan 10¹⁰ CFU. Pengamatan defekasi dilakukan tiap 4 jam selama 20 jam setelah infeksi. Konsistensi feses diklasifikasikan menjadi 4 kelompok: 1 = feses padat (normal); 2 = semi padat, tidak memisah (diare ringan); 3 = lembek, tidak berbentuk, ada bekas feses di rektum dan kaki belakang (diare); 4 = berair, ada bekas feses di rektum, kaki belakang, dan ekor (diare parah) (Ogawa dkk., 2001).

Infeksi *E. coli* Enterotoksigenik Stabil Toksin dan Pemberian *L. plantarum* Dad 13 pada Tikus

Sebanyak 12 ekor tikus diadaptasi dengan pakan standar selama 5 hari, kemudian tikus dibagi dua, masing-masing

untuk perlakuan infeksi *E. coli* dan pemberian *L. plantarum* Dad 13. Pada perlakuan infeksi *E. coli*, tikus diberi 0,1 ml suspensi sel yang mengandung 10¹⁰ CFU *E. coli* dengan cara *force feeding*. Sebelum dan setelah 12 jam sejak pemberian *E. coli* dilakukan enumerasi *E. coli*, coliform, dan lactobacilli pada feses tikus. Pada perlakuan pemberian *L. plantarum* Dad 13, tikus diberi suspensi sel *L. plantarum* Dad 13 sebanyak 0,1 ml yang mengandung 10⁹ CFU secara *force feeding* setiap hari selama satu minggu. Sebelum dan setelah satu minggu perlakuan, dilakukan enumerasi *E. coli*, coliform, dan lactobacilli pada feses tikus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antibakteri Patogen

Berdasarkan uji secara *in vitro*, *L. plantarum* Dad 13 memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* (Tabel 1). Bakteri ini relatif lebih efektif menghambat bakteri patogen *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin, *E. coli* enterotoksigenik labil toksin, dan *E. coli* enteropatogenik OK 111 dibandingkan bakteri patogen yang lain yang diuji. Penghambatan terhadap patogen terjadi karena adanya senyawa antimikrobia. Masing-masing bakteri patogen memiliki sensitifitas yang berbeda-beda terhadap senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *L. plantarum* Dad 13. Bakteri asam laktat ini paling efektif menghambat *E. coli* enteropatogenik OK 111 yang merupakan bakteri penyebab diare, ditunjukkan dengan diameter zona jernih sebesar 7,2 mm.

Tabel 1. Diameter penghambatan *L. plantarum* Dad 13 terhadap bakteri patogen enterik

Bakteri patogen	Diameter penghambatan oleh <i>L. plantarum</i> Dad 13 (mm)
<i>Salmonella typhimurium</i> FNCC 167	2.4
<i>Staphylococcus aureus</i> FNCC 157	5.3
<i>E. coli</i> FNCC 0091	3.8
<i>E. coli</i> enterotoksigenik stabil toksin	6.1
<i>E. coli</i> enterotoksigenik labil toksin	6.0
<i>E. coli</i> enteropatogenik OK 111	7.2
<i>E. coli</i> enteropatogenik	4.3

Waktu Transit dan Dosis Infeksi

Transit time didefinisikan sebagai waktu yang diperlukan oleh pakan berada di dalam saluran pencernaan. Waktu transit pakan pada tikus ditunjukkan dengan waktu munculnya warna hijau kehitaman pada feses. Setelah 8 jam pemberian pakan, sembilan ekor tikus belum melakukan defekasi pakan yang diberikan, ditunjukkan dengan feses yang masih berwarna hitam, namun tujuh ekor tikus sudah melakukan defekasi pangan. Pada jam ke 18 sejak pemberian pakan, semua

tikus telah melakukan defekasi pakan, ditunjukkan dengan semua feses telah berwarna hijau kehitaman. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat dikatakan bahwa pada tikus normal waktu transit pakan dimulai setelah 8 jam pemberian pakan.

Sebagian besar tikus yang diinfeksi dengan ketiga strain *E. coli* dengan dosis 10^8 CFU tidak menunjukkan gejala diare (Tabel 2). Empat jam setelah diinfeksi dengan 10^8 CFU *E. coli* tidak ada tikus yang mengalami gejala diare. Bahkan tidak ada tikus yang menunjukkan gejala diare setelah diinfeksi dengan *E. coli* enteropatogenik. Sedang tikus yang menunjukkan gejala diare selanjutnya kembali normal setelah 20 jam sejak diinfeksi *E. coli*. Namun pada dosis yang lebih tinggi (10^{10} CFU), tikus menunjukkan gejala diare. Sebagian

besar feses berbentuk semi padat tidak memisah, dan hanya sedikit yang lembek tidak berbentuk, menunjukkan gejala diare ringan.

Penelitian yang dilakukan oleh Cizek dkk. (2000) menunjukkan bahwa tikus yang diinfeksi dengan 10^9 CFU *E. coli* O157 tidak menunjukkan gejala diare. Tingginya dosis infeksi *E. coli* pada tikus mungkin disebabkan karena jumlah bakteri ini dalam mikrobiota tikus sudah tinggi. Diantara ketiga *E. coli* patogen yang diuji, jumlah tikus yang paling banyak menunjukkan gejala diare adalah yang diinfeksi dengan *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin. Bakteri ini menyebabkan diare dengan cara menempel pada sel epitel intestin dan kemudian melepaskan toksinnya sehingga penyerapan air turun.

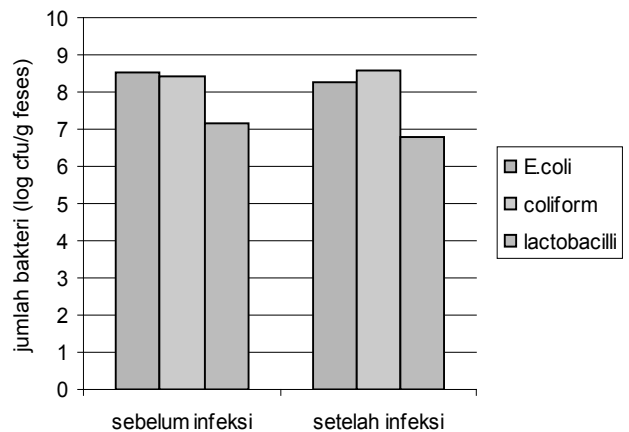
Tabel 2. Jumlah tikus yang diare setelah diinfeksi dengan 10^8 dan 10^{10} CFU *E. Coli*

<i>E. coli</i>	Jumlah tikus yang diare setelah infeksi <i>E. coli</i> pada jam ke									
	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
	Dosis infeksi 10^8 cfu					Dosis infeksi 10^{10} cfu				
ETEC-ST	0	0	1	0	0	2	5	4	3	0
EPEC-OK	0	1	2	1	0	3	1	2	2	2
EPEC	0	0	0	0	0	1	3	1	1	2

ETEC-ST: *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin; EPEC-OK: *E. coli* enteropatogenik OK 111; EPEC: *E. coli* enteropatogenik

Pengaruh Infeksi *E. coli* dan Pemberian *L. plantarum* Dad 13 terhadap Mikrobiota Feses Tikus

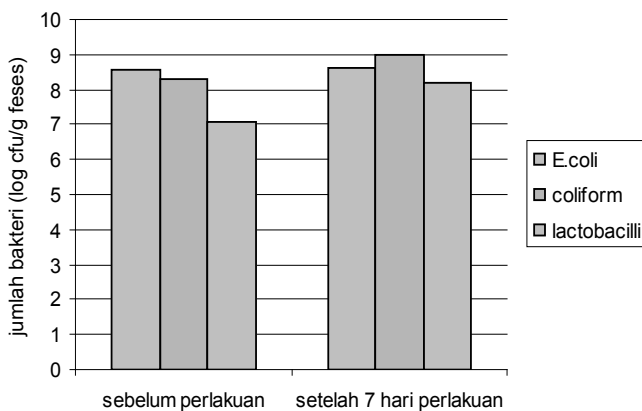
Dalam penelitian ini *E. coli* yang digunakan adalah *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin sebesar 10^{10} CFU. Pada Gambar 1 terlihat bahwa sebelum tikus diinfeksi dengan *E. coli*, jumlah *E. coli* dan coliform pada mikrobiota feses tikus relatif lebih tinggi, yaitu 8,54 siklus log dan 8,42 siklus log, dibandingkan jumlah lactobacillinya yang hanya 7,14 siklus log. Hasil penelitian Campbell dkk. (1997) juga menemukan bahwa jumlah lactobacilli pada feses tikus sekitar 7 siklus log/g feses, lebih rendah daripada jumlah bakteri aerob dan anaerob (8 siklus log/g feses). Komposisi mikrobiota ini diduga merupakan kondisi yang normal pada tikus. Setelah diinfeksi dengan *E. coli*, tidak terjadi kenaikan jumlah *E. coli* dan coliform, namun terjadi penurunan jumlah lactobacilli sebesar 0,3 siklus log. Hal ini dapat disebabkan karena jumlah *E. coli* dan coliform yang sudah tinggi sebelum diinfeksi, sehingga infeksi sebesar 10^{10} CFU tidak mempengaruhi jumlahnya. Infeksi *E. coli* ternyata mengakibatkan turunnya jumlah lactobacilli, yang menunjukkan bahwa infeksi tersebut mengganggu keseimbangan mikrobiota tikus. Penurunan ini kemungkinan terjadi karena adanya persaingan yang semakin besar dalam mendapatkan nutrient dan terganggunya metabolisme lactobacilli oleh toksin yang dihasilkan oleh *E. coli*.



Gambar 1. Jumlah bakteri pada feses tikus sebelum dan setelah infeksi 10^{10} CFU *E. coli* ETEC-ST

Pemberian *L. plantarum* Dad 13 selama satu minggu, tidak menurunkan jumlah *E. coli* dan coliform pada feses tikus (Gambar 2). Namun demikian, pemberian *L. plantarum* Dad 13 dapat meningkatkan jumlah lactobacilli pada feses, sehingga rasio lactobacilli terhadap *E. coli* dan coliform meningkat. *L. plantarum* Dad 13 terbukti memiliki potensi sebagai agensia probiotik. Hasil penelitian Lestari (2003) menun-

jukkan potensi bakteri asam laktat ini dalam menurunkan kadar kolesterol darah pada tikus. Mikrobial ini relatif tahan pada pH 3,0 selama 3 jam dan dapat hidup dan tumbuh pada kadar garam empedu 0,5 % (Utami dkk., 2009). Kemungkinan *L. plantarum* Dad 13 dapat melewati saluran pencernaan tikus. Dalam penelitian ini peningkatan jumlah lactobacilli tidak diiringi dengan penurunan jumlah *E. coli* dan coliform. Hal ini mungkin terjadi karena jumlah *E. coli* dan coliform pada awalnya sudah tinggi, sehingga meskipun *L. plantarum* Dad 13 dapat mencapai cecum dan tumbuh, namun tidak mempengaruhi jumlah *E. coli* dan coliform yang sudah ada secara alami. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Zhao (1998) yang menemukan bahwa pemberian probiotik pada anak sapi dapat mengurangi jumlah *E. coli* O157:H7 antara 1 sampai 5 siklus log. Dalam penelitiannya Zhao (1998) menggunakan isolat probiotik yang berasal dari ternak itu sendiri sehingga lebih mudah bagi bakteri tersebut untuk bertahan hidup di dalam saluran pencernaan ternak.



Gambar 2. Jumlah bakteri pada feses tikus sebelum dan setelah 7 hari pemberian *L. plantarum* Dad 13

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa secara *in vitro*, *L. plantarum* Dad 13 dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* penyebab diare, yaitu *E. coli* enterotoksigenik dengan toksin yang stabil, *E. coli* enterotoksigenik labil toksin, dan *E. coli* enteropatogenik OK 111. Infeksi dengan 10¹⁰ CFU *E. coli* enterotoksigenik stabil toksin pada tikus Wistar tidak meningkatkan jumlah *E. coli* dan coliform, namun menurunkan jumlah lactobacilli sebesar 0,4 siklus log. Pemberian *L. plantarum* Dad 13 tidak dapat menurunkan jumlah *E. coli* dan coliform, namun dapat meningkatkan jumlah lactobacilli sebesar 1,2 siklus log. Infeksi *E. coli* dan pemberian *L. pantarum* Dad 13 mengubah rasio mikrobial dalam feses tikus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing XIII Tahun 2006.

DAFTAR PUSTAKA

Adisasmito, W. (2007). Faktor risiko diare pada bayi dan balita di Indonesia: *Systematic Review* Penelitian Akademik Bidang Kesehatan Masyarakat. *Makara Kesehatan* 11: 1-10.

Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A. dan Takeda, Y. (2004). Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity* 72: 2240-2247.

Campbell, J.M., Fahey, G.C. dan Wolf, B.W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition* 127: 130-136.

Cizek, A., Literak, I. dan Scheer, P. (2000). Survival of *Escherichia coli* O157 in faeces of experimentally infected rats and domestic pigeons. *Letters in Applied Microbiology* 31: 349-352.

Davidson, P.M. dan Parish, M.E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43: 148-155.

Fooks, L.J., Fuller, R. dan Gibson, G.R. (1999). Prebiotics, probiotics dan human gut microbiology. *International Dairy Journal* 9: 53-61.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.

Guerin-Danan, C., Meslin, J., Chambard, A., Charpilienne, A., Relano, P., Bouley, C., Cohen, J. dan Andrieux, C. (2001). Food Supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. *Journal of Nutrition* 131: 111-117.

Gorbach, S.L. (2000). Probiotics and gastrointestinal health. *The American Journal of Gastroenterology* 95: S2-S4.

Holzapfel, W.H. dan Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International* 35: 109-116.

Karyantina, M. (2004). Aplikasi probiotik pada ayam untuk menekan populasi coliform dan *Salmonella*. Thesis,

- Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Kusumawati, N., Jenie, B.S.L., Setyahadi, S. dan Hariyadi, R.D. (2003). Seleksi bakteri asam laktat indigenus sebagai galur probiotik dengan kemampuan menurunkan kolesterol. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **11**: 39-43.
- Lestari, L.A. (2003). Efek hipokolesteromik yoghurt yang disuplementasi probiotik indigenus pada tikus Sprague-Dawley. Thesis, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ngatirah (2000). Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. Thesis, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. dan Takeda, Y. (2001). Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infection and Immunity* **69**: 1101-1108.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents : Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *Journal of Nutrition* **123**: 1939-1951.
- Utami, T., Kasmiati, Harmayani, E. dan Rahayu, E.S. (2009). Influence of bile on lactobacilli viability and ability to reduce lactose in MRS broth. *Prosiding Seminar Lactic acid Bacteri and Culture Collection*. Yogyakarta, 16-17 Januari 2009.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Muller, P.O.E. dan Parks, A.H. (1998). Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 641-647.