

PENGARUH GARAM EMPEDU TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI ASAM LAKTAT *Streptococcus* sp DARI *CYME* USUS HALUS AYAM BROILER STRAIN LOHMAN

Siti Umniyati, Astuti, Bernadetta Oktavia, Drajat Pramiadi

Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah garam empedu berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi asam laktat *Streptococcus* sp dari *chyme* usus halus ayam Broiler Strain Lohman.

Untuk mencapai tujuan tersebut maka *Streptococcus* sp ditumbuhkan dalam medium MRS dengan penambahan garam empedu yaitu 0% (kontrol), 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, dan 0.9% pada suhu 40°C selama 24 jam. Variabel pertumbuhan yang diamati adalah pola pertumbuhan (kurva pertumbuhan), kecepatan tumbuh spesifik, nilai pH, dan produksi asam laktat. Pengamatan pola pertumbuhan *Streptococcus* sp diukur tiap jamnya selama 24 jam dengan menggunakan spektrofotometer (λ 650nm), nilai pH diamati pada awal (jam ke-0), fase eksponensial dan fase stasioner (jam ke-24) serta produksi asam laktat diamati pada fase eksponensial dan fase stasioner. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian dengan rancangan acak lengkap satu faktor dan jika terdapat perbedaan diantara reratanya maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: *Streptococcus* sp mampu tumbuh dengan baik pada berbagai konsentrasi garam empedu. *Streptococcus* sp mampu memproduksi asam laktat. Produksi asam laktat tertinggi dihasilkan pada fase stasioner yang ditandai dengan penurunan pH medium. *Streptococcus* sp yang diisolasi dari *Chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann dapat dijadikan sebagai kandidat bakteri probiotik.

Kata kunci : Garam empedu, pertumbuhan, asam laktat *Streptococcus*, *Chyme*
Usus halus ayam broiler strain Lohman

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Saluran pencernaan penting sekali bagi kesehatan tubuh manusia dan hewan ternak. Fungsi utama saluran pencernaan adalah mencerna dan mengabsorpsi nutrisi agar kebutuhan tubuh dapat terpenuhi. Saluran pencernaan dapat dikatakan sehat apabila mukosa usus mampu mengabsorpsi mikronutrien penting dan menolak toksin serta patogen. Saluran pencernaan termasuk salah satu jaringan mukosa yang merupakan “pintu gerbang” masuknya infeksi mikroba paling luas permukaannya, sekitar dua pertiga sistem imun berada dalam saluran pencernaan (Inggrid, 2004:3).

Keseimbangan antara bakteri-bakteri asam laktat yang memiliki karakteristik gram positif, katalase negatif, nonmotil, tidak berspora, selnya berbentuk bulat berpasangan atau berantai, bersifat fakultatif anaerob dan tahan pH asam (Patterson, 1998:1). *Streptococcus* sp dapat memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasinya sebagian besar berupa asam laktat. Oleh karena itu, *Streptococcus* sp bersifat homofermentatif (SRMD, 2005:5).

Salah satu syarat bakteri yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik pada ayam adalah harus tahan terhadap konsentrasi garam empedu (*Bile Salt*) yang tinggi. Strain bakteri harus mampu melewati saluran usus halus khususnya pada bagian atas (*Jejunum*). Bagian tersebut memiliki konsentrasi garam empedu yang cukup tinggi dan bersifat toksik bagi bakteri (Holzapfel dkk., 2001:368).

Bakteri asam laktat termasuk *Streptococcus* sp harus mampu tumbuh pada konsentrasi *bile salt* sampai 1000 ppm dan mampu hidup dalam suhu badan ayam sekitar 40-41⁰C. Persyaratan tersebut digunakan sebagai standar pertimbangan daya toleran bakteri garam empedu (Gohrand dalam Muttaqin, 2005:7).

Garam empedu adalah sebuah senyawa amphipatik, salah satu sisinya dapat larut dalam air (polar/ *hydrophilic*) dan sisi yang lainnya tidak larut dalam air (nonpolar/ *hydrophobic*) (Saunders, Rubin dan Ostrow, 2005:1). Struktur amphipatik inilah yang menyebabkan garam empedu mampu mengemulsifikasi lemak dan secara langsung mempengaruhi kehidupan mikroorganisme dalam saluran pencernaan khususnya ketika berada di usus halus.

Mikroorganisme termasuk bakteri harus mampu bertahan dari pengaruh garam empedu agar dapat hidup di usus halus ayam. Hal ini berhubungan dengan fungsi dari garam empedu di dalam usus halus yaitu sebagai emulgator pada proses pencernaan lemak (emulsifikasi lemak). Emulsifikasi lemak merupakan proses awal dari metabolisme lemak yaitu proses pencampuran (emulsi) lemak yang berukuran besar menjadi ukuran lebih kecil, sehingga lemak yang telah diemulsifikasikan tadi pada larut dalam air dan memungkinkan enzim lipase pancreas bekerja (Guyton dan Hall, 1996:1041).

Keberadaan garam empedu bagi mikroorganisme di dalam usus halus dapat juga disebut "*Biological detergents*" yaitu cairan yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfolipid, kolesterol dan protein. Sebagian besar dari senyawa tersebut dapat menyusun membran sel, sehingga menyebabkan sel mikroorganisme menjadi hancur (*lysis*). Konsentrasi garam empedu yang tinggi akan menjadi racun dan zat antimikrobia yang sangat keras (Belgey *et al.*, 2002:4). Bezkorovainy (2001:401) juga menambahkan bahwa cairan empedu di dalam usus halus bersifat menghambat pertumbuhan mikrobial yang ada, oleh karena itu BAL khususnya *Streptococcus* yang akan dijadikan probiotik harus mampu bertahan terhadap garam empedu agar dapat hidup dan melakukan perannya ketika berada di dalam usus ayam.

Berdasarkan uraian diatas, maka penulis tertarik untuk mengetahui pengaruh garam empedu terhadap pertumbuhan dan produksi asam laktat pada bakteri *Streptococcus* sp tersebut. *Streptococcus* sp yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu BAL yang berhasil diisolasi dari *chyme* usus halus ayam broiler strain Lohman.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai BAL khususnya genus *Streptococcus* yang telah terseleksi oleh garam empedu. Bakteri *Streptococcus* yang mampu tumbuh dan bertahan dalam medium garam empedu dapat direkomendasikan sebagai agensia probiotik. Penggunaan probiotik diharapkan dapat menggantikan pengguna antibiotik pada unggas yang sering berdampak negatif.

Rumusan Masalah

Menurut latar belakang yang telah dikemukakan tersebut dapat dijadikan beberapa rumusan permasalahan yaitu:

1. Apakah garam empedu berpengaruh terhadap pertumbuhan *Streptococcus* sp yang berhasil diisolasi dari *chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann.
2. Apakah garam empedu berpengaruh terhadap kadar laktat *Streptococcus* sp yang berhasil diisolasi dari *chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann ?

Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pertumbuhan *Streptococcus* sp yang berhasil diisolasi dari *chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann dalam medium garam empedu.
2. Untuk mengetahui kadar asam laktat pada *Streptococcus* sp yang berhasil diisolasi dari *chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann dalam medium garam empedu.

Manfaat Penelitian

Penelitian ini merupakan studi dasar yang diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi bagi industri peternakan dalam pemanfaatan bakteri asam laktat *Streptococcus* sp yang berhasil diisolasi dari *chyme* usus halus ayam broiler strain Lohman sebagai salah satu agensia probiotik.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimen dengan menggunakan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 variasi perlakuan dan masing-masing perlakuan 3 kali ulangan.

Penelitian ini dimulai pada bulan November 2006 sampai Maret 2007, dan dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA, UNY dan Laboratorium Hayati UGM.

Objek Penelitian

1. Populasi Penelitian
Streptococcus sp yang diisolasi dari usus halus ayam broiler strain Lohman.
2. Sampel Penelitian
Streptococcus sp yang telah diinkubasi selama 24 jam.

Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi garam empedu yaitu 0 % (kontrol), 0.1 %, 0.3 %, 0.5 %, 0.7 %, dan 0.9 %.

2. Variabel Tergayut

- a) Pertumbuhan *Streptococcus* sp
 - i. Pola Pertumbuhan
Pola pertumbuhan dalam medium perlakuan diperoleh dengan mengamati perubahan densitas (OD) pada tiap jam pengamatan.
 - ii. Kecepatan tumbuh spesifik
Kecepatan tumbuh spesifik dalam medium perlakuan diperoleh dari slope pertumbuhan fase eksponensial.
- b) Produksi asam laktat
Pengukuran terhadap produksi asam laktat dilakukan pada fase eksponensial dan fase stasioner (jam ke-24) dengan metode Baker dan Summerson (Hawk's, 1976).

Populasi dan Sampel Penelitian

1. Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari aluminium foil, autoclave merk ALP type STMN-Y222, bunsen, colony counter, erlenmeyer (50 ml dan 100ml), gelas beker (100ml dan 500ml), gelas ukur (10ml dan 100ml), gelas elektrode pH meter merk Uchida KT-1A, hot plate merk Eyela RCH-3, inkubator merk Eyela ALI-600N, jarum ose, kain kasa, karet, kertas label, kertas payung, LAF, mikropipet (5-50 μ l) merk Socorex, peridish, pipet ukur (1ml, 2.5ml, 10ml), rak tabung reaksi, sentrifuge model Kokusan H-103n, spektrofotometer model spektronik 20D⁺, sprayer, stirer, tabung cuvet, tabung sentrifuge, taung reaksi, tape, termometer, timbangan analitik merk AND HF-300, tisu gulung, vortek merk Sibata Tim-1 dan water bath merk Eyela NTS-1300.

2. Bahan-bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar murni, alkohol 70%, aquades, Ca (OH)₂, CuSO₄ 20%, garam empedu (*Bile Salt*), H₂SO₄ pekat, litium laktat (standar laktat), MRS Pronadisa, parahidroksibifenil, spritus dan TCA 10%.

Prosedur Kerja

1. Pengukuran Produksi Asam Laktat menurut Metode Baker dan Summerson (Hawk's, 1976)

Prinsipnya adalah bahwa asam laktat diisolasi dari sampel bebas protein (protein diendapkan dengan TCA (Trichloroacetic acid) 20% dan ditambahkan senyawa CuSO₄ dan Ca(OH)₂). Asam laktat tersebut kemudian dipanaskan dengan H₂SO₄ pekat untuk diubah menjadi asetal dehid. Selanjutnya asetal dehid dapat dibaca densitasnya pada spektrofotometer λ 560nm. Absorbansinya diketahui dan kadar asam laktatnya dapat dihitung berdasarkan rumus persamaan standar asam laktat yang telah di analisis terlebih

dahulu.

a. Tahap Isolasi Asam Laktat

- 1) Satu ml sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge lalu tambahkan TCA 10% ingá volume 5ml. Sentrifuge pada kecepatan 2750 rpm selama 15 menit.
- 2) Ambil 1ml supernatan yang sudah diencerkan 20 kali yaitu 1ml supernatan dalam 19ml aquadesh, lalu tambahkan 0,5ml CuSO₄ 20% dan 0,5 g Ca(OH)₂ serta aquadesh ingá volume totalnya 5ml.
- 3) Tutup rapat campuran tersebut dan homogenkan selama 30 menit kemudian sentrifuge pada 2750 rpm selama 15 menit.
- 4) Buat blanko dengan cara mengganti supernatan dengan aquadesh.

b. Tahap Penentuan Kadar Asam Laktat pada Sampel

- 1) 0,5 ml supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan 0,025ml CuSO₄ 4% dan 3ml H₂SO₄ pekat segera masukkan tabung ke dalam air mendidih selama 5 menit.
- 2) Dinginkan larutan tersebut dalam es suhu <20⁰C, estela dingin segera teteskan 0,05ml reagen parahidroksibifenil.
- 3) Inkubasikan dalam suhu kamar selama 30 menit lalu panaskan lagi dalam air mendidih selama 90 detik, kemudian dinginkan dalam suhu kamar.
- 4) Absorbansi dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 560nm.

$$\text{Asam laktat (gr)} = \frac{\text{abs} - 0,006347}{15,266} \times \frac{10}{100} \times \text{pengenceran}$$

$$\text{Kadar asam laktat (\%)} = \frac{\text{Asam laktat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Persamaan : } Y = A + BX$$

Keterangan: X = Kadar Asam Laktat A = Intersep
Y = Nilai Absorbansi B = Slope

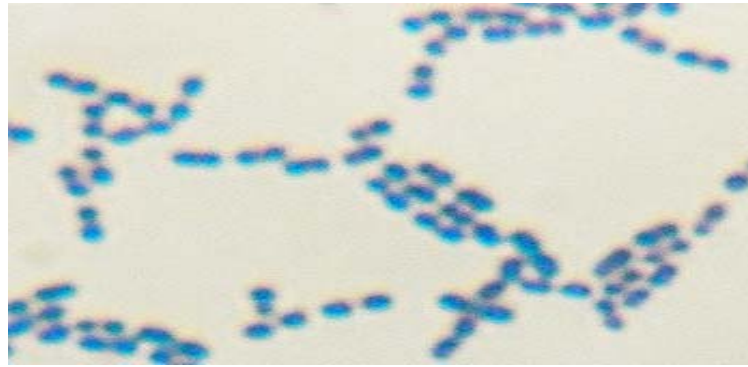
Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Analisis dengan program Varian (AVANA) satu faktor untuk nilai densitas, total koloni, pH dan produksi asam laktat kemudian bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Streptococcus sp yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari *Chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann pada penelitian sebelumnya (Febriyanto, 2006). *Streptococcus* ini memiliki karakteristik antara lain: warna koloni, putih susu, koloni cembung, katalase negatif, gram positif, sel berbentuk bulat (coccus), susunan sel berpasangan atau rantai, non motil, fakultatif anaerob dan tipe fermentasi homofermentatif. Berikut ini gambar *Streptococcus* sp yang diberi kode isolat JW2BL.



Gambar 1. *Streptococcus* sp hasil isolasi dari Chyme usus halus ayam broiler strain Lohmann (Febriyanto, 2006).

Pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium garam empedu

Pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium MRS yang mengandung garam empedu dapat diketahui dengan melakukan pengamatan terhadap perubahan kecepatan (densitas) pada tiap jam selama 20 jam. Pengamatan densitas ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm. Gupte dalam Ratih (2007) menjelaskan bahwa pertumbuhan mikrobial pada medium cair akan mengakibatkan densitas meningkat dan timbul endapan pada dasar tabung. Hasil rata-rata densitas pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium berbagai konsentrasi garam empedu serta waktu inkubasi berbeda disajikan pada tabel dibawah ini :

Tabel 1. Rerata densitas pertumbuhan *Streptococcus* sp pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu.

Waktu Inkubasi	Konsentrasi Garam Empedu					
	0. %	0.1 %	0.3 %	0.5 %	0.7 %	0.9 %
0	0.039 ^a	0.057 ^a	0.057 ^a	0.052 ^a	0.055 ^a	0.061 ^a
1	0.041 ^a	0.057 ^a	0.059 ^a	0.059 ^a	0.06 ^a	0.06 ^a
2	0.061 ^{ab}	0.077 ^{ab}	0.073 ^{ab}	0.074 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.076 ^{ab}
3	0.122 ^{ab}	0.126 ^{ab}	0.106 ^{ab}	0.09 ^{ab}	0.131 ^{ab}	0.106 ^{ab}
4	0.227 ^b	0.21 ^b	0.174 ^b	0.133 ^b	0.209 ^b	0.154 ^b
5	0.448 ^c	0.381 ^c	0.29 ^c	0.209 ^c	0.374 ^c	0.255 ^c
6	0.72 ^d	0.614 ^d	0.484 ^d	0.346 ^d	0.577 ^d	0.424 ^d
7	0.905 ^c	0.85 ^e	0.679 ^c	0.501 ^e	0.773 ^c	0.606 ^e
8	1.119 ^{fg}	1.063 ^{fg}	1.048 ^{fg}	0.774 ^{fg}	1.2 ^{fg}	0.928 ^{fg}
9	1.2 ^f	1.097 ^f	0.986 ^f	0.793 ^f	1.052 ^f	0.884 ^f
10	1.2 ^{fgh}	1.155 ^{fgh}	1.08 ^{fgh}	0.898 ^{fgh}	1.082 ^{fgh}	0.967 ^{fgh}
11	1.234 ^{fghi}	1.187 ^{fghi}	1.126 ^{fghi}	0.94 ^{fghi}	1.139 ^{fghi}	1 ^{fghi}
12	1.222 ^{ghi}	1.222 ^{ghi}	1.187 ^{ghi}	0.993 ^{ghi}	1.184 ^{ghi}	1.054 ^{ghi}
13	1.222 ^{ghi}	1.222 ^{ghi}	1.187 ^{ghi}	0.993 ^{ghi}	1.184 ^{ghi}	1.054 ^{ghi}
14	1.21 ^{ghi}	1.21 ^{ghi}	1.176 ^{ghi}	1 ^{ghi}	1.13 ^{ghi}	1.062 ^{ghi}
15	1.176 ^{ghi}	1.187 ^{ghi}	1.166 ^{ghi}	1 ^{ghi}	1.166 ^{ghi}	1.046 ^{ghi}
16	1.199 ^{ghi}	1.222 ^{ghi}	1.176 ^{ghi}	1.015 ^{ghi}	1.146 ^{ghi}	1.071 ^{ghi}
17	1.222 ^{hi}	1.222 ^{hi}	1.234 ^{hi}	1.038 ^{hi}	1.214 ^{hi}	1.097 ^{hi}
18	1.247 ⁱ	1.26 ⁱ	1.273 ⁱ	1.08 ⁱ	1.263 ⁱ	1.145 ⁱ
19	1.187 ^{hi}	1.199 ^{hi}	1.21 ^{hi}	1.038 ^{hi}	1.198 ^{hi}	1.106 ^{hi}
20	1.275 ⁱ	1.261 ⁱ	1.273 ⁱ	1.08 ⁱ	1.237 ⁱ	1.155 ⁱ

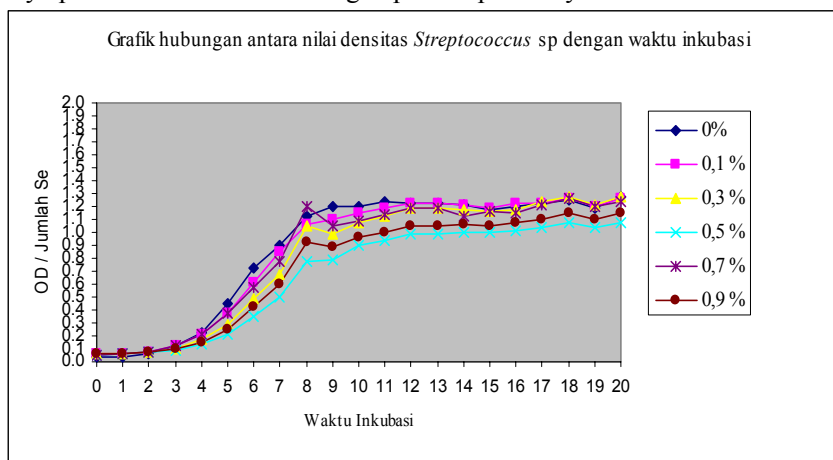
a, b, c, d, e, f, g, h, dan i Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama adanya perbedaan yang nyata (P<0,05)

Nilai densitas pertumbuhan *Streptococcus* sp pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu ini, kemudian di analisis dengan menggunakan analisis varian satu jalur. Analisis ini dilakukan untuk menguji apakah rata-rata lebih dari dua sample berbeda secara signifikan atau

tidak, apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji DMRT. Hasil analisis menunjukkan nilai F hitungnya 0,590 dengan probabilitas 0,707 ($P > 0,05$), artinya bahwa rata-rata nilai densitas *Streptococcus* sp ke 6 variasi konsentrasi garam empedu tersebut tidak berbeda nyata (tidak signifikan). Hal ini menjelaskan bahwa peningkatan konsentrasi garam empedu tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *Streptococcus* sp. *Streptococcus* sp mampu tumbuh baik pada semua variasi konsentrasi garam empedu.

Pertumbuhan *Streptococcus* sp pada medium masing-masing konsentrasi garam empedu mengalami perubahan signifikan ($P < 0,05$) sejalan dengan pertambahan waktu inkubasi. Pertumbuhan *Streptococcus* sp ditunjukkan dengan nilai densitas medium yang semakin meningkat sejalan dengan semakin bertambahnya waktu inkubasi. Grafik hubungan antara nilai densitas *Streptococcus* sp pada berbagai konsentrasi garam empedu dengan waktu inkubasi disajikan pada gambar 2.

Grafik tersebut secara jelas menunjukkan beberapa fase pertumbuhan bakteri. Menurut Hardjo *et. al.*, (1989) fase pertumbuhan mikrobia terdiri dari 3 fase. Fase pertama adalah fase lambat (lag phase) yang sering disebut fase adaptasi. Fase ini ditandai dengan pertumbuhan mikrobia dengan lambat. Fase kedua adalah fase eksponensial (Exponential phase). Fase ini ditandai dengan adanya pertumbuhan yang sangat cepat dari sel produk fermentasi. Fase ke-3 adalah fase stasioner (stationer phase). Fase stasioner ditandai dengan adanya pertumbuhan sel yang tetap atau sebagai titik mulai turunnya pertumbuhan di sertai dengan produk primernya.



Gambar 2. Grafik hubungan antara nilai densitas *Streptococcus* sp pada berbagai konsentrasi garam empedu dengan waktu inkubasi.

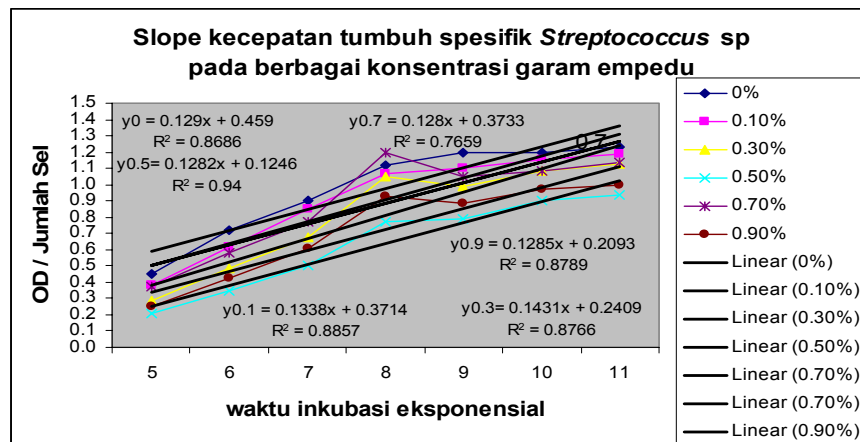
Fase lambat terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-4 karena pada jam awal inkubasi densitas belum meningkat secara nyata ($P > 0,05$). Densitas mulai meningkat secara nyata ($P < 0,05$) dari jam ke-5 sampai jam ke 11, fase ini kemudian disebut fase eksponensial. Fase selanjutnya adalah fase stasioner yang berlangsung lama dari jam ke-12 sampai jam ke-20 (akhir pengamatan). Pada fase stasioner ini terjadi perbedaan nilai densitas yang naik turun.

Kecepatan Tumbuh Spesifik

Kecepatan tumbuh spesifik *Streptococcus* sp dalam medium yang mengandung garam empedu diperoleh dengan analisis regresi linear antara densitas dan waktu inkubasi pada fase eksponensial (jam ke-4 s/d jam ke-11). Analisis ini dilakukan pada fase eksponensial masing-masing perlakuan konsentrasi garam empedu sehingga akan diperoleh persamaan $Y = ax + b$. Nilai a merupakan slope yang menunjukkan kecepatan tumbuh spesifik untuk masing-masing perlakuan. (0 %, 0,1 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 0,9 %). Kecepatan tumbuh spesifik secara lengkap disajikan dalam tabel dan grafik di bawah ini :

Tabel 2. Kecepatan tumbuh spesifik *Streptococcus* sp pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu.

Konsentrasi Garam Empedu	Persamaan Regresi	R ²	Slope
0 % (Kontrol)	Y = 0,129 x + 0,459	0,8686	0,129
0,1 %	Y = 0,1338x + 0,3714	0,8857	0,1338
0,3 %	Y = 0,1431x + 0,2409	0,8766	0,1431
0,5 %	Y = 0,1282x + 0,1246	0,94	0,1282
0,7 %	Y = 0,128 x + 0,3733	0,7659	0,128
0,9 %	Y = 0,1285x + 0,2093	0,8789	0,1285



Gambar 3. Grafik kecepatan tumbuh spesifik (slope) *Streptococcus* sp pada berbagai konsentrasi garam empedu

Berdasarkan hasil analisis regresi diatas, slope pertumbuhan antar konsentarsi garam empedu hampir menunjukan nilai slope yang sama atau tidak berbeda jauh. Hasil tersebut menunjukkan bahwa variasi peningkatan konsentrasi garam empedu dari 0% sampai 0,9 % tidak menunjukkan efek penghambatan terhadap slope pertumbuhan. *Streptococcus* sp mampu tumbuh dan bertahan pada semua tingkat konsentrasi garam empedu.

Nilai Ph

Nilai pH pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Rerata nilai pH pada pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu

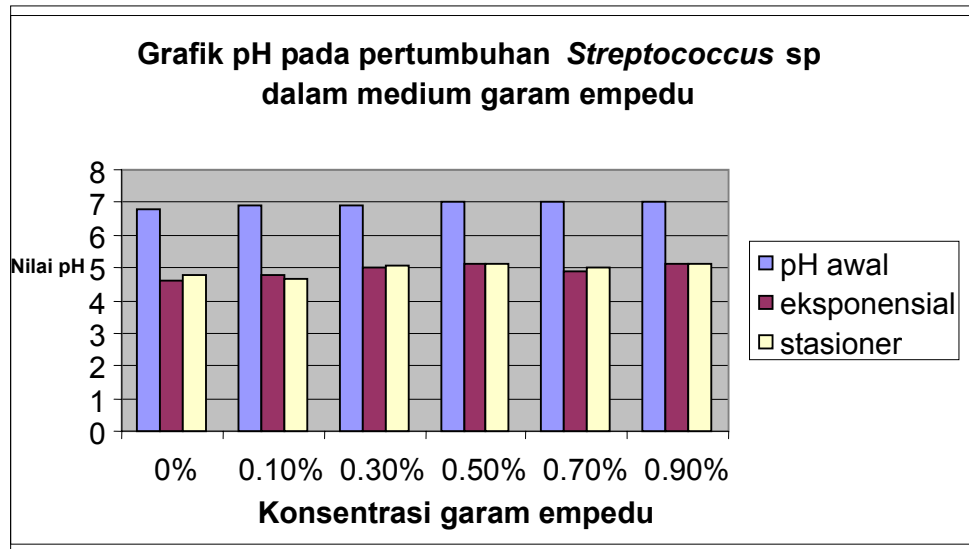
Nilai pH	Konsentrasi Garam Empedu					
	0. %	0.1 %	0.3 %	0.5 %	0.7 %	0.9 %
Awal	6.7 ^b	6.9 ^b	6.9 ^b	7 ^b	7 ^b	7 ^b
Eksponensial	4.6 ^a	4.8 ^a	5 ^a	5.1 ^a	4.9 ^a	5.1 ^a
Stasioner	4.77 ^a	4.68 ^a	5.05 ^a	5.12	5.02 ^a	5.10 ^a

^{a, dan b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama adalah berbeda nyata (P<0,05)

Pengukuran pH dilakukan pada awal inkubasi (jam ke-0), saat fase eksponensial dan fase stasioner (jam ke-20). Penurunan pH dalam medium dapat menunjukkan adanya produk-produk asam yang dihasilkan oleh bakteri sebagai hasil fermentasinya.

Perbedaan tidak signifikan (P>0,05) terjadi antara nilai pH pada masing-masing konsentrasi garam empedu dengan pertambahan waktu inkubasi.

Nilai pH pada pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu disajikan dalam bentuk grafik yang dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 4. Grafik nilai pH *Streptococcus* sp dalam medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu

Pada grafik diatas menunjukkan bahwa pH awal medium tiap konsentrasi memiliki nilai berkisar antara (6,8 – 7). Setelah masa inkubasi kurang lebih 13 jam, masing-masing medium tiap konsentrasi garam empedu mengalami penurunan pH yang signifikan. Nilai pH saat fase eksponensial berkisar antara (4,6 – 5,1). Sedangkan pada fase stasioner berkisar antara (4,77-5,12).

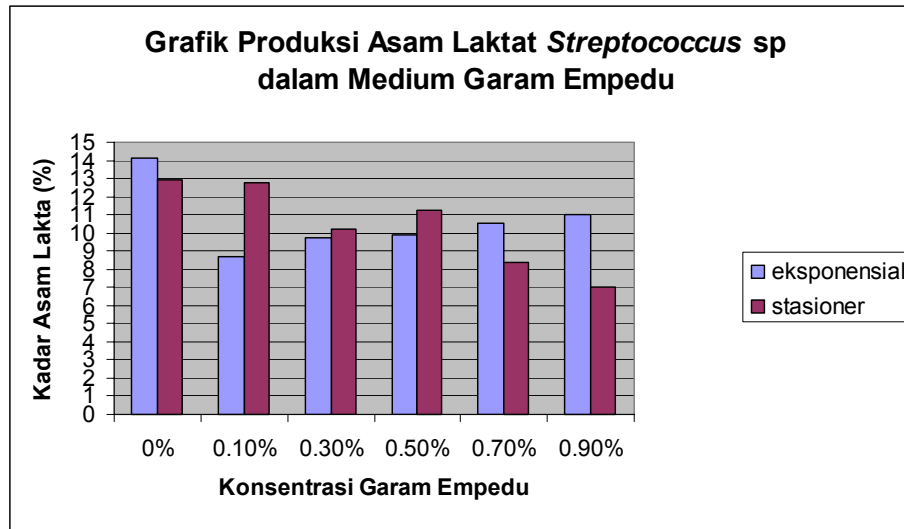
Produksi Asam Laktat

Pengukuran produksi asam laktat pada masing-masing konsentrasi garam empedu dilakukan saat fase eksponensial. Pengukuran pada fase ini dilakukan karena asam laktat merupakan metabolit primer, yaitu senyawa yang termasuk produk akhir dan dihasilkan pada fase eksponensial. Pengukuran produksi asam laktat juga dilakukan pada fase stasioner (jam ke-20) karena pertumbuhan sel dan produksi metabolit primer akan mencapai kadar optimal pada fase stasioner (Borris, 1988). Produksi asam laktat pada masing-masing konsentrasi garam empedu dapat dilihat dalam tabel 4.

Tabel 4. Rerata produksi asam laktat *Streptococcus* sp pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu.

Konsentrasi Garam Empedu	Produksi Asam Laktat (%)	
	Fase eksponensial	Fase Stasioner
0%	14.09	12.90
0.1%	8.69	12.75
0.3%	9.74	10.17
0.5%	9.91	11.25
0.7%	10.57	8.39
0.9%	11.04	7.00

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan nilai F hitungnya 1,470 dengan probabilitas 0,324 (P>0,05), artinya bahwa produksi asam laktat antar masing-masing konsentrasi garam empedu, baik saat fase eksponensial maupun stasioner tidak berbeda nyata/tidak signifikan. *Streptococcus* sp mampu memproduksi asam laktat pada semua variasi konsentrasi garam empedu. Produksi asam laktat saat fase eksponensial berkisar 8,69-14,09 % dan turun pada fase stasioner yaitu berkisar antara 7-12,90 %. Gambar grafik produksi asam laktat pada *Streptococcus* sp pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Gambar grafik produksi asam laktat pada *Streptococcus* sp pada medium dengan berbagai konsentrasi garam empedu.

Perbedaan yang tidak nyata (tidak signifikan) pada masing-masing parameter pertumbuhan yaitu nilai densitas, kecepatan tumbuh spesifik, dan produksi asam laktat pada tiap konsentrasi garam empedu merupakan indikasi bahwa pertumbuhan *Streptococcus* sp tidak terpengaruh oleh penambahan tingkat konsentrasi garam empedu. Kecuali peningkatan konsentrasi garam empedu signifikan (berbeda nyata) terhadap nilai pH pertumbuhan *Streptococcus* sp. *Streptococcus* sp mampu tumbuh dengan baik pada semua konsentrasi garam empedu dan mampu memproduksi asam laktat sebagai produk fermentasinya sehingga terjadi penurunan pH medium.

Pembahasan

1. Pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium garam empedu.

Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah sel dalam suatu populasi karena terjadi proses pembelahan sel. Pengukuran terhadap peningkatan jumlah sel ini salah satunya dapat dilakukan dengan cara turbidimetri/densitas pada medium pertumbuhan (Madigan *et al.*, 2000: 143-145). Pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium garam empedu dapat diamati dari densitas atau kekeruhan pada empedu.

Menurut hasil penelitian, *Streptococcus* sp dapat tumbuh dengan baik pada semua konsentrasi garam empedu. Hal ini didukung oleh hasil analisis yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada rata-rata pertumbuhan *Streptococcus* sp antar keenam konsentrasi garam empedu tersebut.

Pada pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium garam empedu dapat dilihat dari kurva pertumbuhan antara nilai densitas dan waktu inkubasi (gambar 3). Pertumbuhan ditandai dengan meningkatnya nilai densitas /kekeruhan medium sejalan dengan meningkatnya lama waktu inkubasi. Pada kurva pertumbuhan terjadi tiga fase pertumbuhan yaitu fase lambat (*Lag Phase*), fase logaritmik (*Exponential Phase*) dan fase statis (*Stationary Phase*), sedangkan fase kematian (*Death Phase*) tidak dapat terlihat bila menggunakan pengukuran secara turbidimetri. (Madigan *et al.*, 2000: 139-140).

Tahapan fase yang terjadi pada pertumbuhan *Streptococcus* sp dalam medium garam empedu hampir sama tiap konsentrasinya. Fase lambat (*Lag Phase*) terjadi pada jam ke 0 sampai jam ke 4 karena pada jam awal inkubasi ini densitas belum meningkat secara nyata. Pada fase lambat ini populasi *Streptococcus* sp belum mengalami pertumbuhan yang berarti, dikarenakan baru saja menyesuaikan dalam medium yang baru (Fresh medium). Hal tersebut menyebabkan sel belum dapat melakukan reproduksi atau pembelahan, tetapi masih beradaptasi dengan medium atau lingkungan barunya. Pada fase lambat ini memungkinkan terjadinya penambahan ukuran sel, tetapi bukan pada jumlah selnya.

Fase logaritmik (*Exponential Phase*) merupakan fase selanjutnya yang terjadi pada

pertumbuhan *Streptococcus* sp. Fase ini ditandai dengan bertambahnya populasi secara signifikan. Densitas pada medium meningkat secara nyata dari jam ke 4 sampai jam ke 11. Pada fase eksponensial populasi sudah mulai beradaptasi dengan medium dan dapat melakukan reproduksi melalui proses pembelahan sel (binary fission). Selama fase eksponensial terjadi peningkatan/penggandaan jumlah sel dalam populasi. Pada fase eksponensial ini pula dapat diketahui kecepatan tumbuh spesifik *Streptococcus* sp. Berdasarkan hasil analisis regresi linier antara densitas dan waktu inkubasi pada fase eksponensial jam ke 4 dan jam ke 11, kecepatan tumbuh spesifik yang dimiliki pada tiap konsentrasi garam empedu tidak berbeda nyata.

Fase selanjutnya pada kurva pertumbuhan adalah fase stasioner yang berlangsung lama dari jam ke 12 sampai jam ke 20 (akhir pengamatan). Fase stasioner ini sekaligus menjadi fase terakhir dari kurva pertumbuhan *Streptococcus* sp. Hal ini dikarenakan perhitungan jumlah bakteri melalui turbidimetri tidak dapat diketahui fase kematiannya. Pada fase stasioner, terjadi keadaan seimbang antara tingkat pertumbuhan sel (pembelahan sel) dengan tingkat kematian sel artinya jumlah sel yang hidup sama dengan jumlah sel yang mati. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain saat fase stasioner telah terjadi penumpukan atau akumulasi produk-produk akhir hasil metabolisme yang mungkin dapat bersifat racun bagi pertumbuhan bakteri itu sendiri. Faktor lainnya adalah ketersediaan nutrisi pertumbuhan dalam medium yang telah habis dan mulai terbatasnya tempat populasi untuk tumbuh yang disebut 'biological space'. Beberapa faktor inilah yang menyebabkan jumlah sel hidup menjadi tetap dan membentuk garis lurus atau konstan pada fase stasioner dalam kurva pertumbuhan.

2. Penurunan nilai pH

Salah satu faktor penting dalam pertumbuhan bakteri adalah nilai pH. Bakteri memerlukan suatu pH optimum untuk tumbuh optimal. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri ini berkaitan dengan aktivitas enzim. Enzim dibutuhkan oleh bakteri untuk mengkatalis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri. Apabila pH dalam suatu medium/lingkungan tidak optimal, maka akan mengganggu kerja dari enzim-enzim tersebut, yang pada akhirnya akan mempengaruhi pertumbuhan bakteri itu sendiri (Pelczar dan Chan, 1986:326-327).

Perubahan pH yang sangat ekstrim tidak sesuai untuk pertumbuhan dapat menyebabkan terjadinya **perubahan dalam aktivitas katalik enzim**. Perubahan ini terjadi karena adanya perubahan ionisasi pada gugus ionik enzim di sisi aktifnya atau pada sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif enzim tersebut. Perubahan pH menyebabkan sisi aktif enzim mengalami **protonisasi atau deprotonisasi** sehingga mempunyai muatan yang berbeda dengan kondisi awalnya. Terjadinya perubahan sisi aktif ini menyebabkan enzim berkurang aktivitasnya (Reed, 1975).

Enzim merupakan protein yang terdiri dari beragam asam amino yang masing-masing mempunyai gugus samping yang bersifat asam, basa, ataupun netral. Enzim secara utuh dapat mengandung gugus bermuatan positif maupun negatif tergantung nilai pH yang diberikan. Perubahan pH medium mengakibatkan terjadinya perubahan muatan pada rantai samping residu asam amino. Perubahan muatan ini mengganggu interaksi elektrostatis dalam molekul protein enzim secara keseluruhan dan sebagai konsekuensinya akan mengubah **konformasi** sisi aktif enzim tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian, nilai pH pada pertumbuhan *Streptococcus* sp antar konsentrasi garam empedu terdapat perbedaan yang signifikan, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi garam empedu berpengaruh terhadap nilai pH pertumbuhan *Streptococcus* sp.

Penurunan pH terjadi sejalan dengan lama waktu inkubasi dan penambahan nilai densitas pada medium perlakuan. Hal ini menandakan bahwa *Streptococcus* sp mampu tumbuh dan bertahan pada kondisi medium yang asam.

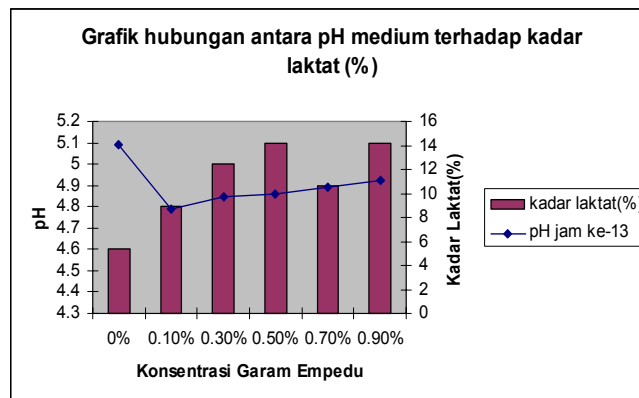
Penurunan pH terjadi secara signifikan pada fase lambat (Lag Phase) menuju fase eksponensial. Nilai pH menurun drastis saat fase eksponensial, karena pada fase ini terjadi peningkatan densitas yang tinggi atau dengan kata lain pertumbuhan *Streptococcus* sp yang sangat pesat, akibatnya banyak asam-asam organik yang dihasilkan terutama asam metabolit primer seperti asam laktat. Asam-asam organik ini, sebagian akan digunakan kembali sebagai prekursor untuk proses metabolisme selanjutnya. Penurunan pH tidak signifikan sampai mencapai fase

stasioner. Pada saat fase tersebut, mulai terjadi penumpukan produk hasil metabolisme (metabolit sekunder) dalam medium yang menyebabkan medium tetap asam. Penumpukan produk ini cenderung bersifat toksik bagi bakteri itu sendiri.

3. Produksi asam laktat

Berdasarkan hasil penelitian, penurunan pH medium pada tiap konsentrasi garam empedu disertai dengan peningkatan produksi asam laktat. Pada konsentrasi garam empedu (0 %, 0,3 %, 0,5 %), produksi asam laktat meningkat dari fase eksponensial menuju fase stasioner, sedangkan pada konsentrasi garam empedu (0 %, 0,7%, 0,9 %) produksi asam laktat menurun.

Akan tetapi, produksi asam laktat antar konsentrasi garam empedu tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa produksi asam laktat pada *Streptococcus* sp tidak terhambat oleh penambahan tingkat konsentrasi garam empedu. *Streptococcus* sp mampu memproduksi asam laktat pada semua konsentrasi garam empedu hingga konsentrasi tertinggi 0,9 %.



Gambar 6. Gambar grafik hubungan antara pH medium dengan kadar asam laktat

Streptococcus sp yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri asam laktat homofermentatif yang sebagian besar produk metabolismenya berupa asam laktat. Asam laktat merupakan asam organik yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Selain itu asam laktat merupakan senyawa antimikrobia karena mampu menghambat mikrobia lain. Kemampuan asam laktat dalam menghambat dan menekan pertumbuhan mikrobia lain yang umumnya adalah patogen, pada akhirnya akan meningkatkan kesehatan saluran cerna dan produktivitas ternak.

Mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri patogen oleh asam laktat dapat melalui berbagai cara. Proses metabolisme yang dilakukan oleh *Streptococcus* sp akan menghasilkan akumulasi asam laktat dalam medium, sehingga menyebabkan penurunan pH (efek pengasaman) pada medium. Asam laktat terdisosiasi di dalam sel bakteri yang mengakibatkan pH internal sel menurun. Penurunan pH ini selanjutnya dapat mengganggu aktivitas sel bakteri tersebut, diantaranya berkaitan dengan penghambatan pertumbuhan oleh aktivitas enzim seperti yang telah dijelaskan pada pembahasan penurunan pH sebelumnya. Mekanisme efek pengasaman ini dapat menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri asam laktat termasuk *Streptococcus* sp karena BAL telah teruji mampu bertahan dalam pH asam, sedangkan sebagian bakteri patogen tidak dapat bertahan pada pH asam.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. *Streptococcus* sp mampu tumbuh dengan baik pada berbagai konsentrasi garam empedu.
2. *Streptococcus* sp mampu memproduksi asam laktat. Produksi asam laktat tertinggi dihasilkan pada fase stasioner yang ditandai dengan penurunan pH medium. *Streptococcus* sp yang diisolasi dari *Chyme* usus halus ayam Broiler strain Lohmann dapat dijadikan sebagai kandidat bakteri probiotik.

Saran

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat dasar, oleh karena itu untuk penelitian selanjutnya diharapkan dapat menyelesaikan beberapa masalah yang belum terpenuhi diantaranya: Perlu dilakukan penelitian tentang produksi enzim dan aktivitas *Bile Salt Hydrolase* (BSH) oleh *Streptococcus* sp guna mendukung proses dekonjugasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedon, Stephen T. 1998. *Procaroyote Cell Walls and Membranes*: dalam <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol1080.htm>. Diakses tanggal 15 Desember 2006 jam 09.20 WIB.
- Anonim. 2001. *Cell Lysis* dalam <http://www.piercenet.com/Objects/view.cfm>. Diakses tanggal 19 Desember 2006 jam 10.06 WIB.
- Anonim. 2005. *National Standard Method Identification Of Streptococcus Species, Enterococcus Species And Morphologically Similar Organisms*. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory dalam www.evaluations-standards.org.uk. Diakses tanggal 12 April 2006 jam 15.44 WIB.
- Arif. 2006. Dekonjugasi Garam Empedu Oleh Bakteri Asam Laktat Dari Saluran Pencernaan Ikan Tawes (*Puntius javanicus*). *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Peternakan UGM.
- Begley, M., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2002. *Bile Stress Response In Listeria monocytogenes LO28: Adaptation, Cross-Protection, And Identification Of Genetic Loci Involved In Bile Resistance*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6005-6012 dalam <http://aem.asm.org/cgi/content/full/68/12/6005>. Diakses tanggal 20 Januari 2007 10.11 WIB.
- Begley, M., R. D. Sleator, C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2005. *The Contribution Of Three Bile-Associated Loci (bsh, pva, and bilB) to Gastrointestinal Persistence And Bile Tolerance Of Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 73:894-904 dalam <http://iai.asm.org/cgi/content/full/73/2/894> Diakses tanggal 2 Mei 2006 jam 09.55 WIB.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M. 2006. *Bile Salt Hydrolase Activity In Probiotics..* *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1729-1738 dalam <http://aem.asm.org/cgi/content/full/72/3/1729> Diakses tanggal 20 Januari 2007 jam 09.00 WIB.
- Bezkorovainy, A., 2001. *Probiotics: Determinants Of Survival And Growth In The Gut*. *Am.J. Clin. Nutr.* 73, 399S-405S dalam <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/73/2/399S> Diakses tanggal 09 November 2006 jam 15.40 WIB.
- Boris, S., J.E. Suárez, F. Vázquez, Barbés. 1998. *Adherence Of Human Vaginal Lactobacilli To Vaginal Epithelial Cells And Interaction With Uropathogens*. *Infect. Immun.* 66, 1985-1989 dalam <http://iai.asm.org/cgi/content/full/66/5/1985> Diakses tanggal 26 Juli 2006 jam 14.20 WIB.
- Bowen, R. 2001. *Secretion of Bile and the Role of Bile Acids In Digestion* dalam <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/bile.html>. Diakses tanggal 2 Mei 2006 jam 09.30 WIB.
- Campbell, Neil, A., dkk. 2002. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.

- Crawford, James M., Deborah C. J. Strahs, Aleta R. Crawford, dan Stephen Barnest. 1994. *Role Of Bile Salt Hydrophobicity In Hepatic Microtubule-Dependent Bile Salt Secretion*. Journal of Lipid Research Volume 35 dalam www.jlr.org. Diakses tanggal 23 Januari 2007 jam 09.16 WIB.
- Dazzo, Frank. 2006. *Control of Microbial Growth: Chemical Antimicrobials* dalam <http://72.14.207.104/search?q=cache:0XWAKMdGsFkJ>. Diakses tanggal 2 mei 2006 jam 09.50 WIB.
- De Smet, I., L. Van Hoorde, M. Vande Woestyne, H. Christiaens, and W. Verstraete. 1995. *Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 79: 292–301.
- Dinoto, Achmad. 2001. *Beberapa Kriteria Penyeleksian Bakteri Probiotik* dalam <http://www.renik.4t.com>. Diakses tanggal 5 April 2006 jam 11.00 WIB.
- Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, J.K. Collins. 2001. In Vitro Selection Criteria For Probiotic Bacteria Of Human Origin: Correlation With In Vivo Findings. *American Journal Clinic Nutrition* 73, 386S-392S dalam <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/73/2/386S>. Diakses tanggal 18 Januari 2007 jam 15.14 WIB.
- Febriyanto, A.J. 2006. "Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Chyme Usus Halus Ayam Broiler Strain Lohmann". *Skripsi*. Yogyakarta: Prodi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY.
- Gilliland, S.E. 1990. *Bacterial Cultures For Foods*. Florida: CRC Press, Inc.
- Gupte, S. 1990. *The Short Textbook of Medical Microbiology*. 1st ed. Jaypee Brothers. India Guyton dan Hall. 1996. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Havenaar, R., and J. H. J. Huis in 't Veld. 1992. *Probiotics: a general view*. 151-171 In B. J. B. Wood (ed.), *The lactic acid Elsevier Applied Science*, London.
- Hermawati, Wuri. 2003. Pengaruh Perlakuan Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim CMC-Ase Sebagai Pakan Tambahan dan Aplikasinya Pada Sintesis Protein Mikrobia Fermentasi Cairan Rumen Dedak dan Jerami. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Peternakan UGM.
- Hofmann AF. 1999. *Bile Acids: The Good, The Bad And The Ugly*. News Physiol Sci 14: 24-29 dalam <http://physiologyonline.physiology.org> Diakses tanggal 21 Januari 2007 jam 10.49 WIB.
- Holzapfel, W.H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth, U. Schillinger. 2001. *Taxonomy And Important Features Of Probiotic Microorganisms In Food Nutrition*. Am. J. Clin. Nutr. 73,365S-373S dalam www.ajcn.org Diakses tanggal 31 januari 2007 jam 10.00 WIB.
- Inggrid S. 2001. "Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik Bagi Kesehatan" dalam Kompas edisi 30 September 2001.
- Inggrid S. 2004. *Agar Probiotik Menyehatkan Saluran Cerna* dalam <https://www.kompas.com/kompas-cetak/0411/06/Jendela/1367480.htm>. Diakses tanggal 5 April 2006 jam 11.14 WIB.
- Kaiser, Gary. 2006. *The Prokaryotic Cell: Bacteria* dalam <http://student>.

- ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit1/prostruct/cw.html Diakses tanggal 15 Desember 2006 jam 09.12 WIB.
- King, Michael, W. 2006. *Introduction to Cholesterol Metabolism* dalam <http://web.indstate.edu/theme/mwking/cholesterol.html>. Diakses tanggal 20 September 2006 jam 10.15 WIB.
- Koesnandar. 2002. "Mengoptimalkan Bakteri Probiotik" dalam Suara Pembaharuan edisi 24 Desember 2002.
- Komang, Wiryawan, G.dkk. 2001. "Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikroba". *Laporan Penelitian*. Institut Pertanian Bogor dalam <http://www.jvetunud.com/archives/60>. Diakses tanggal 12 April jam 15.28 WIB.
- Logan, R. H. 1996. *Enzymes And Enzyme Activity* dalam [URL:http://members.aol.com/logan20/enzymes.html](http://members.aol.com/logan20/enzymes.html). Diakses tanggal 17 Februari 2007 jam 09.12 WIB.
- Madigan, Michael., Martinko, John M., Parker jack. 2000. *Biology Of Microorganism Ninth Edition*. USA: Prentice Hall International Inc.
- Moser, S. A., and D. C. Savage. 2001. *Bile Salt Hydrolase Activity And Resistance To Toxicity Of Conjugated Bile Salts Are Unrelated Properties In Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3476-3480 dalam <http://aem.asm.org> diakses tanggal 18 Januari 2006 jam 15.02 WIB.
- Mulyorini, R. 2006. *Probiotik* dalam <http://www.republika.co.id>. Diakses tanggal 13 Januari 2006 jam 08.00 WIB.
- Muttaqin, Ahmad. 2005. Mempelajari Pembuatan Pelet Probiotik Bakteri Asam Laktat Untuk Suplemen Pakan Ternak Ayam. *Skripsi*. Yogyakarta:Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UGM.
- Patterson, Maria, J. 1998. *General Concepts Streptococcus* dalam <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch013.htm>. Diakses tanggal 20 September 2006 jam 09.53 WIB.
- Paustian, Timothy. 2002. *The Cell Wall* dalam <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/CellWall.html>. Diakses tanggal 6 Maret 2007 jam 12.41 WIB.
- Pereira' Dora I. A. dan Glenn R. Gibson. 2002. *Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut*. *Appl Environ Microbiol.* 68(9): 4689-4693. dalam <http://www.pubmedcentral.gov> . Diakses tanggal 25 Juni 2006 jam 14.31 WIB.
- Rahmi, Nazarni. 1999. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Selama Fermentasi pada Pembuatan krupuk Patilo*. *Skripsi*. Yogyakarta: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian UGM.
- Raphael, Brian H., Sonia Pereira, Gary A. Flom, Qijing Zhang, Julian M. Ketley, and Michael E. Konkel. 2005. *The Campylobacter jejuni Response Regulator, CbrR, Modulates Sodium Deoxycholate Resistance and Chicken Colonization*. *Bacteriol.*187(11):3662-3670 dalam <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?articid=1112060>. Diakses tanggal 2 Mei 2006 jam 09.45 WIB.

- Ray, B. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. Florida. CRC Press.Inc.
- Ray, B., Rahayu E.S, Margiono. S. 1997. *Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Ray, B. dan Sadine, W.E. 1992. Acetic, Propionic And Lactic Acids Of Starter Culture Bacteria As Biopreservatives In Food Biopreservatives Of Microbial Origin, Ray, B., dan Daeschel, M.A, (eds). Boca Raton: CRC Press.
- Ridlon, Jason M., Dae-Joong Kang and Phillip B. Hylemon. 2005. *Bile Salt Biotransformations By Human Intestinal Bacteria*. Virginia: Journal of Lipid Research, Vol. 47, 241-259.
- Saarela, M., T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, dan I. M. Helander. 2000. *Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane*. Appl Environ Microbiol 66(5): 2001-2005. dalam <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=101446>. Diakses tanggal 21 Januari 2007 jam 11.26 WIB.
- Samadi. 2004. *Feed Quality for Food Safety", Kapankah di Indonesia?*. INOVASI Vol.2/XVI/2004 dalam <http://io.ppi-jepang.org/article.php?id=38>. Diakses tanggal 18 Februari 2006 jam 08.50 WIB.
- Saunders D.R., C.E. Rubin, dan J.D. Ostrow, 2005. *Small Bowel; The Gut Course (HUBIO551) On Line Syllabus* dalam http://www.uwgi.org/gut/smallbowel_09.asp. Diakses tanggal 03 Juni 2006 jam 10:21 WIB.
- Sigma-Aldrich. 2006. *Enzymatic Cell Lysis and Protoplast Preparation* dalam <http://www.sigmaaldrich.com>. Diakses tanggal 18 Januari 2007 jam 15.24 WIB.
- Sulaiman, dkk. 1990. *Gastroenterologi Hepatologi (Garam Empedu)*. Jakarta: CV. Sagung Seto.
- Sulaxono, Hadi, dkk. 2002. *Memacu Kekebalan dengan Probiotik* dalam http://ciptapangan.com/news.php?news=detail&detail=219&detail_page=168. Diakses 5 April 2006 jam 11.00 WIB.
- Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki, and I. Mierau. 1999. *Screening Of Lactic Acid Bacteria For Bile Salt Hydrolase Activity*. J. Dairy Sci. 82:2530-2535 dalam <http://jds.fass.org/cgi/reprint/82/12/2530>. Diakses tanggal 21 Agustus 2006 jam 13.01.
- Tan dan Tjoa Kiranaraharja. 1997. *Obat-obat Penting Khasiat dan Penggunaannya Edisi 3*. Direktorat Farmasi Departemen Kesehatan RI.
- Todar, Kenneth (ed). 2004. *Nutrition And Growth Of Bacteria* dalam <http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html> from University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Diakses tanggal 20 Januari 2007 jam 10.54 WIB.
- Todar, Kenneth (ed). 2004. *Structure And Function Of Prokaryotic Cells* dalam <http://textbookofbacteriology.net/structure.html> from University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology Diakses tanggal 19 Desember 2006 jam 10.19 WIB.
- Trauner, Michael dan James L. Boyer. 2003. *Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation*. Physiol. Rev. 83: 633-671 dalam <http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/83/2/633>. Diakses tanggal 15 Desember 2006 jam 09.16 WIB.
- Trisutono, Yohanes. 2001. *Preparasi Biomassa Lactobacillus Untuk Suplementasi tape Probiotik. Skripsi*. Yogyakarta: Jurusan Teknologi Pengolahan hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UGM.

- Unandar. T., 2001. Eubiosis dan Diabiosis Apa Itu ?. *Poultry Indonesia* 25 April-24 Mei 2001 No. 252. Jakarta: Gappi.
- Usman, Hosono A. 1999. *Bile Tolerance, Taurocholate Deconjugation, And Binding Of Cholesterol By Lactobacillus gasseri strains*. *J. Dairy Sci.* 82: 243–248.
- Walker, D. K., and S. E. Gilliland. 1993. *Relationship Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, And Assimilation Of Cholesterol By Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76: 956–961.
- Waty, Tri, F.dkk. 2004. *Proses Pembentukan Dan Sekresi Empedu* dalam <http://www.google.co.id/search?q=cairan+empedu&hl=id&lr=&start=10&sa=N>. Diakses tanggal 12 April 2006 jam 15.35 WIB.
- Widodo. 2003. *Bioteknologi Industri Susu*. Yogyakarta: Lacticia Press.
- Wikipedia. 2006. *Cell Membrane* dalam http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane. Diakses tanggal 6 Maret 2007 jam 12.23 WIB.
- Zaenal. B.M. 1991. “*The Asetone-Ethanol Fermentation of Basillus macerans NCTC 1608*”. Thesis. University College of Swansea.