

Isolasi dan Identifikasi Spesies Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antimikrob Asal Kolon Sapi Bali

(ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA SPECIES PRODUCING ANTI-MICROBIAL SUBSTANCE ISOLATED FROM COLON OF BALI CATTLE)

Sri Anggreni Lindawati¹, I Wayan Suardana²

¹Laboratorium Teknologi dan Mikrobiologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, ²Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Jl. Sudirman Denpasar, Bali, Indonesia, Tlp. (0361) 223791
E-mail: srianggrenilindawati@yahoo.com
E-mail: iwayansuardana22@yahoo.com

ABSTRAK

Sapi bali sebagai salah satu ternak lokal dengan ciri genetiknya yang khas yaitu hidupnya yang sederhana/mudah beradaptasi dengan lingkungan yang kurang menguntungkan sehingga sapi bali dikenal dengan istilah sebagai sapi perintis/sapi pelopor. Karakteristik seperti ini memungkinkan untuk dapat ditemukannya jenis bakteri asam laktat (BAL) yang spesifik dibandingkan dengan jenis sapi lainnya. Hipotesis tersebut didasarkan atas prinsip bahwa jenis BAL sebagai flora normal didalam usus sapi sangat tergantung dari beberapa faktor yang salah satunya adalah faktor pakan. Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini dilakukan, dengan tujuan dapat diisolasi dan dikarakterisasinya spesies tertentu dari BAL yang diharapkan nantinya memiliki keunggulan spesifik dengan aktivitas antibakterinya. Penelitian diawali dengan tahapan isolasi bakteri dari 20 sampel feses asal kolon sapi bali melalui penumbuhan bakteri pada media spesifik *deMann, Rogosa, Sharpe* (MRS) yang dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan uji uji katalase, Seleksi aktivitas antimikrob dari isolat hasil isolasi dilakukan dengan metode difusi pada media agar darah. Tahapan identifikasi dilakukan dengan penentuan pH akhir pada media pertumbuhannya, uji produksi gas, uji pertumbuhan pada suhu 10°C, uji pertumbuhan pada 15% NaCl serta uji pertumbuhan pada pH 9,6, serta tahap penentuan spesies dilakukan dengan uji konfirmasi menggunakan kit API 50 CHL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa salah satu isolat BAL hasil isolasi yang memiliki aktivitas antimikrob yaitu isolat dengan kode 3A yang terbukti memiliki zona hambat setelah ditumbuhkan bersama sama bakteri indikator *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dan isolat yang dimaksud dinyatakan sebagai *Lactococcus lactis ssp lactis 1* dengan nilai kemiripan 65,7%. Isolat hasil isolasi ini sangat potensial untuk dikaji lebih lanjut untuk diaplikasikan sebagai kandidat probiotik ataupun pengawet makanan.

Kata-kata kunci : *Lactococcus lactis ssp lactis 1*, antimikrob, kolon, sapi bali

ABSTRACT

Bali cattle as one of the local cattle are known have uniquely genetic characteristics. They are easy to adapt at a less favorable environment, so that they are known as a pioneer cattle. According to their uniquely, it may allow for the discovery of specific types of acid lactic bacteria compared with others. This hypothesis is based on the assumption that the types of bacteria as a normal flora in the intestine tract of cattle are highly dependent on several factors, and one of which is a feed factor. Based on the above background, this study was conducted. The aim of study was to isolate and identify of a specific species of lactic acid bacteria that has anti-microbial substances. The study began by isolation of acid lactic bacteria originated from 20 fecal samples of colon of bali cattle through the growth on selective medium i.e. *deMann, Rogosa, Sharpe* (MRS) medium followed by Gram staining and catalase test. The screening of antimicrobial activity of each isolate was performed by culturing of isolates again indicator bacterial on

blood agar medium. The selected isolates were continuously tested on medium contains 15% NaCl, medium with pH 9.6, and medium with temperature 10°C, respectively in order to identification genus of bacteria. The final stage of identification in order to know the specific isolate, which has antimicrobial substances, was confirmed by using the API 50 CHL kit. The results of study showed that one of the isolates that known have widely antimicrobial activities was isolate with 3A code. This isolate has inhibitory zone to indicator bacterial i.e. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. This isolate is known as *Lactococcus lactis ssp lactis 1* with its similarity value 65.7%. This isolate is potentially to continuously study in order to know the potency of isolate as a probiotic candidate and or as a food preservative.

Keywords: *Lactococcus lactis ssp lactis 1*, antimicrobial substance, colon, Bali cattle

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang mampu memfermentasi gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat. Bakteri ini banyak dijumpai pada berbagai habitat seperti makanan terfermentasi, buah-buahan, dan saluran pencernaan manusia atau ternak (Widyastuti dan Sofarianawati, 1999). Semua BAL pada dasarnya mempunyai kesamaan sifat yaitu bersifat Gram positif dan tidak membentuk spora, tidak menghasilkan enzim katalase, bersifat fakultatif anaerob, dan mampu memfermentasi laktosa dengan hasil utama berupa asam laktat. Sejauh ini diketahui bahwa BAL tidak bersifat patogen, aman untuk dikonsumsi, ataupun dipakai untuk meningkatkan kesehatan manusia maupun ternak, sehingga sering disebut dengan istilah *generally recognized as safe/GRAS* (Widodo, 2003).

Penelitian tentang isolasi dan identifikasi BAL serta uji potensinya untuk kesehatan sebagai probiotik ataupun biopreservatif telah dilaporkan oleh sejumlah peneliti. Suardana dan Suarsana (2005) melaporkan berhasil memanfaatkan BAL pada yoghurt sebagai biopreservatif pada daging ayam. Suardana *et al.* (2009) juga berhasil mengisolasi BAL strain *Lactococcus lactis ssp lactis 1* dari cairan rumen sapi bali yang diketahui berpotensi sebagai kandidat unggul probiotik. Isolat tersebut terbukti memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, dan *Escherichia coli* ATCC 25922 (Suardana, 2013^a). Lebih lanjut Suardana (2013^b) juga berhasil mengidentifikasi isolat *Lactobacillus brevis 1* asal cairan rumen sapi bali juga diketahui memiliki aktivitas antimikrob berspectrum luas.

Di sisi lain, kajian isolasi dan uji potensi BAL hasil isolasi dari kolon sapi sapi belum pernah dilaporkan, mengingat kolon merupakan

tempat melimpahnya sejumlah BAL khususnya dari jenis *Bifidobacterium spp* yang jumlahnya diperkirakan 10^8 - 10^{11} per gram (Salminen dan Wright, 1998).

Pemilihan asal isolat dari inang sapi Bali, diharapkan dapat ditemukannya jenis spesies BAL yang memiliki karakteristik unik khususnya ditinjau dari potensi aktivitas antimikrob yang dihasilkannya, jika dibandingkan dengan species BAL yang sudah diteliti sebelumnya, termasuk dari species BAL yang sudah diperdagangkan secara luas. Hipotesis ini didasarkan pada pertimbangan bahwa pada inang yang spesifik dapat ditemukannya species BAL yang spesifik pula (Salminen dan Wright, 1998). Bertitik tolak dari semua kajian tersebut dan memperhatikan hasil-hasil penelitian sebelumnya, maka tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk menemukan adanya suatu isolat BAL baru yang bersifat lokal dengan kemampuan aktivitas antimikrob yang unggul.

METODE PENELITIAN

Metode Pengambilan Sampel

Sampel feses asal kolon sapi bali dalam keadaan segar diambil dari Rumah Pematangan Hewan (RPH) Pesanggaran, Denpasar Bali. Sampel diambil dari 20 ekor sapi yang diambil secara acak. Sampel sebanyak 100 g dibawa menggunakan pot steril dalam termos berisi es. Masing-masing sampel yang diambil terbagi dalam dua kali pengambilan. Sampel dibawa ke Laboratorium Biosains dan Bioteknologi Unud, untuk dilakukan pengujian.

Isolasi BAL

Pertumbuhan pada Media de Mann, Rogosa, Sharpe (MRS) Agar. Penumbuhan bakteri pada media selektif *de Mann, Rogosa, Sharpe* (MRS) Agar mengacu pada prosedur

yang dikerjakan oleh Suardana *et al.* (2009). Seluruh sampel (20 sampel) dikompositkan menjadi satu di dalam gelas ukur, diaduk secara merata, diambil 10 mL untuk ditambahkan NaCl fisiologis sebanyak 90 mL sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} dan selanjutnya dibuat pengenceran berseri sampai 10^{-3} . Dari pengenceran 10^{-3} tersebut, ditanam 10 μ L pada media MRS *agar* yang telah ditambahkan indikator pH *bromocresol purple*, pada kondisi *anaerob* dengan menambahkan satu *sachet gas generating kit anaerobic system* ke dalam alat *anaerob chamber* dan diinkubasi pada 37°C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh terlihat berwarna kuning sebagai karakteristik dihasilkannya asam.

Pewarnaan Gram. Konfirmasi lanjut terhadap koloni BAL yang tumbuh pada media MRS *agar* dilakukan dengan pewarnaan Gram. Sebanyak satu *loop* koloni biakan umur satu hari dibuat apusan pada gelas objek. Apusan diwarnai dengan kristal violet 1%, didiamkan selama 1,0-1,5 menit, dicuci dengan air, lalu ditetesi dengan larutan garam iodin dan didiamkan selama satu menit. Apusan dicuci dengan alkohol 95% beberapa detik, dicuci dengan air, dan diwarnai dengan pewarna ke-2 safranin dan didiamkan selama 1-2 menit. Sel bakteri yang telah diwarnai dicuci dengan air dan dikeringkan sebelum diamati di bawah mikroskop cahaya. Bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu dan Gram negatif berwarna merah.

Uji Katalase. Konfirmasi akhir kepastian isolat yang diuji sebagai bakteri dari kelompok BAL, dilanjutkan dengan uji katalase. Usapan isolat pada gelas objek ditetesi dengan dua tetes H_2O_2 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas oksigen sebagai hasil degradasi H_2O_2 oleh enzim katalase.

Seleksi BAL Penghasil Substansi Antimikrob.

Seleksi isolat BAL penghasil substansi antimikrob dilakukan dengan metode *direct antagonism* menurut Barrow (Suarsana, 2000), dengan *stab inoculation* menggunakan strain indikator bakteri *S. aureus* ATCC 29213 (Gram positif) dan *E. coli* ATCC 25922 (Gram negatif). Biakan 24 jam strain indikator sebanyak satu *ose* didepositkan pada permukaan media agar darah dengan menggoreskan dari satu sisi plat ke sisi yang lainnya membentuk garis lurus. Selanjutnya biakan umur 24 jam yang diuji, ditanam dengan cara menyentuhkan *needle*

pada permukaan strain indikator dengan sedikit masuk kedalam media (*stab innocula*). Media diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona terang yang terbentuk selanjutnya diukur.

Identifikasi BAL

Identifikasi terhadap genus BAL dilakukan sebagai tahap lanjut terhadap isolat BAL yang diketahui memiliki aktivitas antimikrob melalui serangkaian uji yang meliputi:

Pengukuran pH Akhir pada Media MRS. Pengukuran pH akhir ditujukan sebagai salah satu cara untuk identifikasi genus BAL. Isolat ditumbuhkan pada MRS *broth*, diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam, kemudian pH akhirnya diukur.

Uji Produksi Gas. Uji produksi gas dilakukan sebagai tahapan identifikasi BAL untuk mengelompokkan BAL kedalam kelompok *homofermentatif* dan *heterofermentatif*. Uji ini dilakukan dengan mengacu pada prosedur yang telah dilaporkan Suardana *et al.* (2009). Ujung *ose* terlebih dahulu dibakar di atas lampu Bunsen sebelum dicelupkan ke tabung reaksi yang berisi isolat yang diuji. Isolat dari kelompok *heterofermentatif* membentuk gelembung gas pada tabung reaksi, sedangkan untuk kelompok *homofermentatif* tidak memperlihatkan gelembung gas.

Uji Pertumbuhan pada NaCl 15%. Identifikasi terhadap genus BAL yang didasarkan pada metode Holzappel dan Schillinger dapat dilakukan dengan penumbuhan isolat pada media MRS yang mengandung 15% NaCl. Pertumbuhan teramati dengan melihat adanya pertumbuhan/kekeruhan yang dikonfirmasi dengan penghitungan nilai *optical density* (OD) antara kontrol (isolat yang ditumbuhkan pada media MRS tanpa 15% NaCl) dan perlakuan pada panjang gelombang 660 A°.

Uji Pertumbuhan pada pH 9,6. Identifikasi lanjut genus BAL juga dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media MRS dengan pH 9,6. Pertumbuhan isolat pada uji ini juga diamati dan diukur dengan cara yang sama seperti uji sebelumnya.

Uji Pertumbuhan pada Suhu 10°C. Identifikasi genus BAL lanjutan yang didasarkan pada metode Holzappel dan Schillinger dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media MRS pada suhu pertumbuhan 10°C. Pertumbuhan isolat pada uji ini juga diamati dan diukur dengan cara yang sama

seperti uji sebelumnya.

Identifikasi dan Penentuan Spesies.

Identifikasi dan penentuan spesies BAL presumtif untuk jenis genus tertentu dan telah menunjukkan aktivitas antimikrob diuji lanjut secara biokimia menggunakan *Standard Analytical Profile Index* (API; CH50 Kit (bioMeriueux, Marcy l'Etoile, France). Media API 50 CHL merupakan media siap pakai yang mengandung 49 macam karbohidrat. Masing-masing karbohidrat pada API 50 CHL diinokulasikan dengan suspensi isolat bakteri yang diuji. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam. Perubahan warna yang terjadi dinilai berdasarkan persentase pembentukan warna kuning (reaksi positif).

Analisis Statistika

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif berdasarkan atas data empiris yang diperoleh, untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel ataupun gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap isolasi berupa penumbuhan sampel feses asal kolon sapi bali pada media MRS *agar*, didapatkan 18 isolat yang terkonfirmasi sebagai bakteri asam laktat (BAL). Keseluruhan isolat hasil isolasi tersebut dengan uji aktivitas antimikrobnya ditemukan bahwa tidak semua isolat memperlihatkan adanya zona bening (*clearing zone*) ketika ditumbuhkan pada media yang mengandung strain indikator. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat 3A sebagai salah satu isolat yang mampu memperlihatkan adanya zona bening di sekitar tempat pertumbuhan.

Isolat 3A yang sudah diketahui memiliki

aktivitas antimikrob tersebut selanjutnya dilakukan identifikasi lebih lanjut khususnya pada level genus melalui serangkaian uji produksi gas, uji pertumbuhan pada 15% NaCl, uji pertumbuhan pada pH 9,6, uji pertumbuhan pada suhu 10°C, serta pengukuran pH akhir pada media MRS seperti disajikan pada Tabel 1.

Tahapan uji lanjutan untuk mengetahui spesies dari BAL khususnya dari isolat 3A yang dilakukan berdasarkan uji fermentasi. Dalam hal ini digunakan perangkat kit API 50 CH, didapatkan hasil isolat 3A hanya mendegradasi 18 komponen gula (karbohidrat). Adapun gula tersebut meliputi gula nomor: 5 (RIB), 10 (GAL), 11 (GLU), 12 (FRU), 13 (MNE), 22 (NAG), 23 (AMY), 24 (ARB), 25 (ESC), 26 (SAL), 27 (CEL), 28 (MAL), 29 (LAC), 30 (MEL), 31 (SAC), 32 (TRE), 36 (AMD), dan 39 (GEN). Hasil uji tersebut disajikan pada Gambar 1.

Hasil isolasi dari 20 sampel yang ditumbuhkan pada media MRS dalam kondisi fakultatif anaerob, serta memperlihatkan hasil reaksi Gram positif dan hasil uji katalase negatif membuktikan bahwa 18 isolat dari 20 sampel tersebut memang benar sebagai kelompok bakteri asam laktat (BAL). Hasil ini sesuai dengan karakteristik umum dari BAL yaitu bersifat Gram positif dan tidak membentuk spora, hampir semua strain tidak mampu menghasilkan enzim katalase (uji katalase negatif), kebanyakan isolat bersifat fakultatif anaerob serta mampu memfermentasikan laktosa dengan asam laktat sebagai hasil utama (Widodo, 2003). Reaksi negatif katalase menunjukkan bahwa tidak terjadi pemecahan H₂O₂ oleh enzim katalase, dan bakteri asam laktat termasuk dalam kelompok bakteri katalase negatif (Salminen dan Wright, 1998).

Pengujian lebih lanjut dari 18 isolat yang

Tabel 1. Hasil isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat isolat 3A asal kolon sapi bali

No	Jenis Uji	Hasil
1.	Pewarnaan Gram	Gram positif
2.	Bentuk	Batang pendek
3.	Uji Katalase	Negatif
4.	Diameter zona hambat pada media agar darah	6,24 mm
5.	pH akhir pada media MRS tempat pertumbuhan isolat	4,54
6.	Uji produksi gas	Negatif
7.	Uji pertumbuhan pada NaCl 15%	Negatif
8.	Uji pertumbuhan pada pH 9,6	Positif
9.	Uji pertumbuhan pada 10°C	Positif



Gambar 1. Hasil identifikasi isolat 3A pada perangkat kit API 50 CHL. Warna kuning menunjukkan hasil uji positif kecuali uji no. 1 sebagai kontrol negatif dan no. 25. Tanda panah menunjukkan hasil uji positif pada uji gula no. 5.

terkonfirmasi sebagai BAL terhadap aktivitas antimikrobnya pada media agar darah menunjukkan terbentuknya beberapa *killing zone* di sekitar tempat pertumbuhan dari bakteri yang diuji seperti pada isolat 3A. Diameter zona hambat yang dihasilkan merupakan zona hambat yang cukup besar dibandingkan dengan zona hambat yang dibentuk oleh isolate lainnya. Memperhatikan kemampuan isolat 3A dalam menghambat pertumbuhan bakteri indikator *S. aureus* tersebut, maka isolat 3A potensial untuk dikarakterisasi lebih lanjut khususnya untuk digunakan sebagai kandidat probiotik/biopreservatif. Seperti diketahui bahwa salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dari suatu spesies untuk dapat digunakan sebagai sumber probiotik adalah isolat yang digunakan harus mampu menghambat atau membunuh bakteri patogen (Widodo, 2003).

Memperhatikan telah terpenuhinya salah satu syarat probiotik dari isolat 3A yakni kemampuannya untuk menghambat atau membunuh bakteri patogen yakni bakteri indikator *S. aureus*, maka identifikasi lanjut isolat 3A untuk menemukan spesies dari isolat yang dimaksud menjadi penting untuk dilakukan, sekalipun persyaratan lain sebagai sumber probiotik masih memerlukan kajian khusus.

Pada Tabel 1 dirangkum tentang hasil identifikasi terhadap genus dari BAL, maka isolat 3A secara presuntif dapat dikelompokkan ke dalam Genus *Enterococcus*. Telah diketahui

bahwa genus *Enterococcus* memiliki ciri-ciri: pH akhir dalam media MRS lebih kecil dari 4,6; koloni berbentuk batang pendek/kokus, CO₂ (uji produksi gas) negatif, kokus tidak berbentuk tetrad, tumbuh pada suhu 10°C, serta tumbuh pada pH 9,6. Hasil identifikasi genus berdasarkan metode Holzappel dan Schillinger ini telah diadopsi oleh beberapa peneliti. Identifikasi metode ini telah diperkenalkan oleh Widodo (2003), serta peneliti Widyastuti dan Sofarianawati (1999) telah menggunakan metode ini untuk menentukan jenis bakteri asam laktat *Enterococcus sp* yang diisolasi dari saluran pencernaan ternak. Di sisi lain kepastian terhadap genus isolat 3A sebagai genus *Enterococcus* sejauh ini masih memerlukan tahapan uji selanjutnya karena genus ini memiliki karakteristik yang hampir sama dengan genus *Lactococcus* yang hanya dibedakan atas pertumbuhannya pada suhu 45°C. Suroso (2004) menentukan karakteristik yang membedakan antara genus *Enterococcus* dengan *Lactococcus* adalah kemampuan pertumbuhannya pada suhu 10°C, 45°C, dan 60°C selama 30 menit. Genus *Enterococcus* dapat tumbuh pada ketiga kondisi suhu pertumbuhan tersebut, sedangkan genus *Lactococcus* hanya mampu tumbuh pada suhu 10°C dan 60°C selama 30 menit, tetapi tidak dapat tumbuh pada suhu 45°C. Berdasarkan atas aktivitas metabolismenya seperti pada Tabel 1, isolat 3A dapat dikelompokkan ke dalam sub-group *homofermentatif*, karena hanya

mampu menghasilkan asam laktat, dan tidak mampu menghasilkan CO₂ (Widodo, 2003; Surono, 2004).

Hasil uji fermentasi dengan kit API 50 CH, didapatkan hasil bahwa isolat 3A yang mendegradasi 18 komponen gula (karbohidrat) tersebut, dianalisis dengan program *apiweb* menunjukkan bahwa isolat 3A sebesar 65,7% sebagai strain *Lactococcus lactis spp lactis* 1. Atas dasar itu maka isolat 3A dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri indikator *S. aureus* tersebut, secara pasti dikategorikan sebagai species *Lactococcus lactis spp lactis* 1. Isolat yang didapat berpotensi untuk digunakan sebagai pengawet makanan ataupun sebagai probiotik. Kim et al. (1999) mengungkapkan bahwa *L. lactis* adalah kelompok bakteri komersial yang sangat penting dan telah digunakan secara luas dalam memproduksi produk asal susu dan sebagai bahan pengawet makanan seperti nisin. Aplikasi dari bakteri ini akhir-akhir ini juga diperluas ke bidang kesehatan seperti aplikasinya sebagai probiotik yaitu isolat *L. lactis spp lactis* 1 SR 9 (Suardana et al., 2009).

SIMPULAN

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa isolat BAL 3A hasil isolasi kolon sapi bali dengan kemampuan aktivitas antimikrobnya yang cukup luas, 65,7% diidentifikasi sebagai species *L. lactis spp lactis* 1.

SARAN

Spesies *L. lactis spp lactis* 1 hasil isolasi diketahui berpotensi untuk dikaji lebih mendalam sehingga potensial untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik unggul.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada pihak Universitas Udayana yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Hibah Bersaing yang didanai oleh Dana Hibah Desentralisasi BOPTN Tahun Anggaran 2014 sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Nomor: 103.56/UN.14.2/PNL.01.03.00/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Salminen S, Wright A. 1998. Lactic Acid Bacteria. Edisi ke-2. Marcel Dekker.Inc. New York. Basel.
- Suardana IW, Suarsana IN. 2005. Pemanfaatan bakteriosin asal yoghurt sebagai biopreservatif pada daging ayam segar. Laporan penelitian dana Dosen Muda Dikti tahun 2005.
- Suardana IW, Suada IK, Sukada IK, Suarsana IN. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat SR9 asal cairan rumen sapi bali sebagai kandidat unggul probiotik. *Medicina. Jurnal Ilmiah Kedokteran* 40(2): 100-103.
- Suardana IW. 2013^a. Kajian pola pertumbuhan dan aktivitas antimikroba isolat *Lactococcus lactis spp lactis* 1 asal cairan rumen sapi bali. *Karya Unud untuk Anak Bangsa*. Universitas Udayana.
- Suardana IW. 2013^b. Potensi isolat *Lactococcus brevis* 1 asal cairan rumen sapi bali sebagai sumber senyawa antimikroba. Prosiding Seminar Nasional Sapi Bali "Peran Sapi Bali dalam Mewujudkan Swasembada Daging Nasional yang Berkelanjutan". Bali, 24 September 2013. Hal 87-97.
- Suarsana IN. 2000. Isolasi dan karakterisasi substansi antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari susu sapi mastitis. *Tesis*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Surono IS. 2004. Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan. Penerbit YAPPMI. Jakarta.
- Kim WS, Ren J, Dunn NW. 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*. 171: 57-65.
- Widodo. 2003. Bioteknologi Industri Susu. Edisi 1. Cetakan 1. Penerbit Lacticia Press. Yogyakarta.
- Widyastuti Y, Sofarianawati E. 1999. Karakter Bakteri Asam Laktat Enterococcus sp. Yang Diisolasi dari Saluran Pencernaan Ternak. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 4(2): 50-53.