

Bakteri Asam Laktat Isolat 18A (*Lactococcus lactis ssp lactis* 1) Asal Kolon Sapi Bali Berpotensi sebagai Probiotik

(*LACTID ACID BACTERIA ISOLATES 18A (Lactococcus lactis ssp lactis 1)
COLONIC ORIGIN BALI CATTLE POTENTIAL AS PROBIOTICS*)

I Wayan Suardana¹, Yan Ramona², Sri Wahyuni³

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

²Bagian Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Unud

³Mahasiswa Program Pendidikan Dokter Hewan, FKH Unud

Jl. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia Tlp. (0361) 223791

E-mail: iwayansuardana22@yahoo.com

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan saluran pencernaan pada hewan atau manusia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi bakteri asam laktat isolat BAL 18A (*Lactococcus lactis ssp lactis* 1) yang diisolasi dari kolon sapi bali sebagai kandidat probiotik. Penelitian diawali dengan tahapan konfirmasi isolat 18A melalui beberapa uji, seperti uji penumbuhan pada *De Man Rogosa and Sharpebroth*, uji katalase, dan pewarnaan Gram. Potensinya sebagai probiotik diuji dengan melakukan pengujian terhadap pH rendah (pH 2, 3, dan 4) dan *natrium deoksikolat* (NaDC) dengan konsentrasi 0,2 mM, 0,4 mM, dan 0,6 mM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat BAL 18A mampu tumbuh dengan baik pada medium *De Man Rogosa and Sharpebroth* dalam suasana anaerob, katalase negatif, dan Gram positif. Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat 18A ini adalah isolat BAL. Dalam uji ketahanan terhadap pH rendah dan NaDC, isolat ini mampu bertahan hidup pada medium pH 2 dan NaDC pada konsentrasi sampai 0,6 mM. Simpulan penelitian ini adalah isolat BAL 18A berpotensi dikembangkan sebagai kandidat probiotik.

Kata-kata kunci: bakteri asam laktat; pH rendah; NaDC; isolat BAL 18A; kolon sapi bali

ABSTRACT

The main aim of this study was to determine the potency of lactic acid bacteria (LAB) isolate 18A (*Lactococcus lactis ssp lactis* 1), isolated from the colon of Bali cattle to be used as a probiotic candidate. The study was started by confirmation tests of the isolate, including test for growth response in De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth medium, test on catalase production, and Gram staining. Its probiotic potency was tested by growing the isolate in MRS broth medium in low pH conditions (pH 2.3 and 4) and in MRS medium supplemented with various concentrations of sodium deoxycholate (NaDC) (0.2 mM, 0.4 mM, and 0.6 mM). The results showed that isolate 18A was able to grow well in De Man Rogosa and Sharpebroth medium under anaerobic condition. In addition, the isolate was catalase negative and Gram positive, indicating that this isolate was confirmed as an LAB isolate. The isolate was resistant to low pH conditions (up to pH 2) and to high concentration of NaDC (up to 0.6 mM), indicating that this isolate has potential to be developed as a probiotic candidate. Further tests are still required to confirm its use as probiotic.

Keywords: lactic acid bacteria; low pH; NaDC; LAB isolates 18A; Bali cattle colon

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk salah satu kelompok mikroorganisme yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan saluran pencernaan pada hewan atau manusia. Secara umum BAL merupakan kelompok bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk *coccus* dan *basil*, memproduksi asam laktat sebagai produk akhir proses fermentasi karbohidrat, katalase negatif, mikroaerotoleran, dan asidotoleran (Axelsson, 1998).

Di dalam saluran pencernaan hewan ataupun manusia terkandung sejumlah besar mikroorganisme (Salminen *et al.*, 1998). Flora normal terdapat di sepanjang saluran pencernaan hewan. Dari lambung sampai kolon, diperkirakan terdapat sebanyak 10^{12} bakteri per gram isi saluran pencernaan hewan (Drasar dan Hill, 1974). Dari sekian banyak sel bakteri yang menghuni saluran pencernaannya, diduga salah satu hewan ruminansia asli Indonesia adalah sapi bali yang diperkirakan terdapat 500 spesies bakteri dan sebagian besar dari spesies-spesies tersebut termasuk kelompok bakteri asam laktat (Gorbach, 2001). Seperti yang dilaporkan Suardana (2007), penelitian yang dilakukannya untuk mengisolasi dan mengidentifikasi BAL penghasil antimikrob asal cairan sapi bali telah berhasil.

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang dapat hidup pada kisaran pH yang luas (Oh *et al.*, 2000). Setiap strain BAL mempunyai ketahanan yang berbeda terhadap asam atau pH rendah. Toleransi terhadap pH rendah merupakan salah satu syarat penting suatu isolat BAL untuk dapat dikembangkan menjadi kandidat probiotik. Kriteria ini diperlukan karena isolat BAL yang akan dikembangkan menjadi probiotik harus melewati kondisi lambung yang sangat asam sebelum mencapai usus besar (Salminen *et al.*, 1998). Menurut Wilson dan Miles (1966), media dengan pH yang sangat rendah bersifat toksik dan menyebabkan kematian bakteri bila terpapar dalam waktu yang cukup lama. Sebagian besar bakteri tidak dapat bertahan hidup pada pH lambung yang dapat mencapai pH 2 dalam keadaan kosong (Kong dan Singh, 2008; Jacobsen *et al.*, 1999).

Bakteri asam laktat yang terdapat di dalam saluran pencernaan mempunyai ketahanan yang bervariasi terhadap garam empedu. Ketahanan BAL terhadap garam empedu merupakan salah satu syarat penting untuk dapat diterima

sebagai probiotik. Bakteri yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam media MRSA yang mengandung 0,5% garam empedu, dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu (Bridson, 1998).

Kelompok bakteri yang banyak digunakan sebagai probiotik adalah bakteri asam laktat. Beberapa species, seperti *L. casei* dan *L. acidophilus* telah banyak dilaporkan berperan sebagai probiotik (Usmiati *et al.*, 2011). Selain kelompok *Lactobacillus*, species lain seperti *Bacillus circulans* dan *Bacillus* sp., yang diisolasi dari saluran pencernaan ternak juga dapat digunakan sebagai probiotik yang efektif untuk pengganti antibiotik (Manin, 2010). Selain pada manusia, probiotik telah banyak dilaporkan memberi efek menyehatkan pada hewan (Haryati, 2011). Pemberian probiotik sering dimanfaatkan untuk pengendalian *Salmonellosis* pada ternak unggas (Winarsih *et al.*, 2004). Probiotik yang ditambahkan diketahui mampu menghasilkan senyawa antimikrob yang dapat menekan *Salmonella* sehinggamenyebabkan suasana mikroorganismeyang seimbang dalam sistem pencernaan hewan ternak tersebut. Probiotik mempunyai peranan positif terhadap kesehatan (Isolauri *et al.*, 2002; Kalliomaki *et al.*, 2003), mengurangi frekuensi terjadinya penyakit diare (Van Neil *et al.*, 2002), menstimulasi sistem imunitas tubuh, mengendalikan infeksi patogen, mampu berperan sebagai pengganti antibiotik serta mampu menekan terjadinya tumor dan kanker sistem pencernaan dengan cara memelihara keseimbangan mikroorganisme dalam sistem pencernaan (Scheinbach, 1998). Isolat BAL 18A merupakan isolat yang diisolasi Suardana *et al.* (2016). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi bakteri asam laktat isolat BAL 18A yang diisolasi dari kolon sapi bali sebagai kandidat probiotik.

METODE PENELITIAN

Rekultur Isolat 18A pada Media MRS Broth

Isolat 18A yang diisolasi Suardana *et al.* (2016) diambil dari *stock culture* pada suhu -20°C, kemudian ditumbuhkan pada media *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS broth), dan ditambahkan dengan *duasachet* (3600 mL H₂ dan 700 mL CO₂) *gas generating kit* ke dalam tabung *anaerob* untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam (Suardana *et al.*, 2007).

Uji Katalase

Isolat yang ditumbuhkan pada media MRS *broth*, diambil dengan menggunakan mikropipet, diteteskan ke objek gelas, ditambahkan H₂O₂ 10%. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya gelembung gas yang dihasilkan dari pemecahan H₂O₂ oleh enzim katalase. Bakteri asam laktat memberikan hasil negatif pada uji ini (Sujaya *et al.*, 2008).

Uji Pewarnaan Gram

Isolat yang ditumbuhkan pada media MRS *broth*, diambil dengan menggunakan ose, disebarkan setipis mungkin di atas kaca objek, dikeringanginkan, diwarnai dengan larutan kristal violet 2% selama satu menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Sediaan selanjutnya ditetesi dengan larutan lugol dan dibiarkan kontak selama satu menit, lalu dicuci dengan air mengalir, ditetesi dengan alkohol 96% dan dibiarkan selama satu menit, dicuci kembali dengan air mengalir, dan diwarnai dengan pewarna safranin selama lima detik. Sel bakteri yang telah terwarnai dicuci kembali dengan air mengalir, dan terakhir diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

Uji Ketahanan terhadap pH Rendah

Isolat BAL 18A diambil dari *stock culture* yang telah diremajakan dan divortex diambil sebanyak 100 µL, dipindahkan ke dalam tabung Milaro kecil yang masing-masing telah berisi 0,9 µL media MRS *broth* dengan pH 2, 3, dan 4, dan diinkubasi selama tiga jam dalam penangas air/waterbath pada suhu 37°C. Selanjutnya suspensi ini dilakukan pencucian sel sebanyak dua kali menggunakan *saline* steril dan suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama lima menit lalu supernatannya dibuang. Kemudian diambil 50 µL dan diinokulasikan ke dalam 5 µL media MRS *broth* pH netral untuk selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C dalam suasana *anaerob*. Ketahanan BAL terhadap pH rendah ditunjukkan oleh pertumbuhan BAL yang diukur menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 660 nm (OD 660 nm) (Hyronimus *et al.*, 2000).

Uji Ketahanan terhadap Natrium Deoksikolat (NaDC)

Isolat BAL 18A dari *stock culture* yang telah diremajakan dan divortex diambil sebanyak 50 µL, kultur ditanam pada media MRS *broth* yang sudah diatur pH nya 7,2 dengan mem-

perlakukan tabung pertama sebagai kontrol (media MRS *broth* tidak ditambahkan Natriumdeoksikolat (NaDC), tabung kedua ditambahkan 10 µL NaDC 0,2 mM, tabung ketiga ditambahkan 20 µL NaDC 0,4 mM dan tabung keempat ditambahkan 30 µL NaDC 0,6 mM. Selanjutnya semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara *anaerob*. Ketahanan isolat BAL diukur berdasarkan tingkat kekeruhan menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 660 nm (OD 660 nm) (Sujaya *et al.*, 2008).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Data nilai uji ketahanan pH rendah dan NaDC disajikan dalam bentuk nilai *optical density* (OD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, isolat BAL 18A menunjukkan sifat toleran terhadap lingkungan pH rendah yang berkisar antara pH 2-4, walaupun terjadi penurunan laju pertumbuhan ketika dipaparkan pada pH yang semakin menurun (Tabel 1).

Pada Tabel 1, ditunjukkan bahwa isolat BAL 18A memiliki pertumbuhan pada kisaran pH 2-4 setelah diinkubasi selama tiga jam, sesuai waktu yang dibutuhkan makanan untuk melewati lambung (Oozer *et al.*, 2006). Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat BAL 18A dapat digunakan dalam uji lanjutan berupa (aktivitas biotransformasi asam kolat menjadi asam deoksikolat, hidrofobisitas permukaan sel, aktivitas antimikrob dan ketahanan terhadap antibiotik).

Dalam percobaan *in vitro*, BAL isolat 18A dipaparkan pada medium yang mengandung NaDC yang merupakan derivat asam empedu dengan konsentrasi yang bervariasi antara 0,2, 0,4 dan 0,6 mM. Pertumbuhan isolat BAL setelah terpapar NaDC selama tiga jam disajikan pada Tabel 2.

Pada penelitian ini diketahui bahwa isolat BAL 18A menunjukkan sifat toleran terhadap NaDC pada konsentrasi sampai 0,6 mM. Hasil yang diperoleh seperti yang disajikan pada Tabel 2, menunjukkan bahwa kematian sel mikroba makin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi NaDC. Semakin tinggi kadar garam empedu pada lingkungan bakteri, semakin toksik senyawa tersebut pada bakteri sehingga

Tabel 1. Toleransi isolat bakteri asam laktat 18A terhadap pH rendah

Kode Isolat	Indikator pertumbuhan (<i>Optical Density</i> (OD) @ 660 nm)		
	pH 2	pH 3	pH 4
Isolat BAL 18A	1,030	1,072	1,087
	1,028	1,074	1,080
	1,032	1,073	1,073
Rataan	1,030 +0,002	1,073 +0,001	1,080 + 0,007

Keterangan: Nilai OD Kontrol (pH 6,5) = 1,198 ; OD \geq 0,1 (tahan pH rendah) ; OD \leq 0,1 (tidak tahan pH rendah).

Ketahanan ditentukan dengan menggunakan OD (λ 660 nm) pada isolat BAL setelah direndam selama 3 jam pada medium MRS *broth* dengan pH yang berbeda. Nilai-nilai \pm standar deviasi merupakan nilai absorbansi setiap isolat BAL dan merupakan rata-rata dari 3 kali pengulangan.

Tabel 2. Toleransi isolat BAL 18A terhadap natrium deoksikolat (NaDC)

Kode Isolat	Indikator Pertumbuhan (<i>Optical Density</i> (OD) pada @ 660 nm)		
	NaDC 0,2 mM	NaDC 0,4 mM	NaDC 0,6 mM
Isolat BAL 18A	0,226	0,222	0,113
	0,243	0,253	0,120
	0,260	0,230	0,130
Rataan	0,243 +0,017	0,235 +0,016	0,121 + 0,009

Keterangan: Nilai OD Kontrol = 1,181 ; OD \geq 0,1 (tahan NaDC) ; OD \leq 0,1 (tidak tahan NaDC). Ketahanan ditentukan dengan menggunakan OD 660 nm pada isolat BAL setelah ditumbuhkan selama 24 jam pada medium MRS *broth* dengan NaDC. Nilai-nilai \pm standar deviasi merupakan nilai absorbansi setiap isolat BAL yang diisolasi asal kolon sapi Bali dan merupakan rata-rata dari 3 kali pengulangan.

semakin banyak bakteri yang mengalami kematian (De Boever *et al.*, 2000) bahwa tingginya konsentrasi garam empedu menyebabkan meningkatnya aktivitas α -galaktosidase terhadap garam empedu, sehingga bakteri tidak mampu mempertahankan permeabilitas membran selnya (Murad *et al.*, 2011). Enzim α -galaktosidase digunakan oleh BAL untuk menghasilkan asam laktat dari laktosa.

Penelitian isolat BAL 18A ini mengkonfirmasi adanya bakteri *L. lactis ssp lactis* 1, sementara itu sebelumnya Suardana *et al.* (2016) telah melaporkan bakteri *Enterococcus durans* yang diisolasi dari kolon sapi bali, juga bakteri *Lactococcus lactis ssp lactis* 1 dan bakteri *Enterococcus durans* berpotensi dijadikan kandidat probiotik. Bakteri *L. lactis ssp lactis* 1 yang berasal dari cairan rumen sapi bali telah

diteliti sebelumnya oleh Suardana, (2008) tentang pola pertumbuhan dan aktivitas antimikrobnya.

Bakteri tersebut berpotensi sebagai kandidat probiotik, bakteriosin, dan sebagai biopreservatif (Suardana *et al.*, 2014). Selain isolat bakteri *L. lactis ssp lactis* 1 yang termasuk BAL 18A, bakteri lain yang berpotensi sebagai kandidat probiotik adalah isolat BAL 3B yang diisolasi dari kolon sapi bali (Suardana *et al.*, 2015).

SIMPULAN

Isolat bakteri *L. lactis ssp lactis* 1 yang merupakan BAL 18A, berpotensi sebagai probiotik.

SARAN

Perlu dilakukan uji aktivitas terhadap bakteri *L. lactis ssp lactis* 1 dalam halbio-transformasi asam kolat menjadi asam deoksikolat, hidrofobisitas permukaan sel, aktivitas antimikrob dan ketahanan terhadap antibiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada proyek penelitian Hibah Bersaing Desentralisasi BOPTN tahun anggaran 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelsson LT. 1998. Lactic Acid Bacteria Classification and Physioly. Dalam: *Lactic Acid Bacteria*. Seppo Salminen and Atte Vin Wright (Eds). New York. Marcel Dekker Inc. Hal. 1-72.
- Bridson EY. 1998. *The Oxoid Manual*. 8th Ed. Basingstoke. Unipath Limited, Wade Road. Hlm. 2-153.
- Drasar BS and Hill MJ. 1975. *The Normal Colonic Bacterial Flora*. *Gut*.16(4): 318–323.
- De Boever P, Wouter R, Verschaeve L, Berckmans P, Schoeters G, Verstracte W. 2000. Protective Effect of the Bile Salt Hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* Against Bile Salt Cytotoxicity. *Journal Applied Microbiology Biotechnology* 53: 709-714.
- Gorbach SL. 2001. *Microbiology of the Gastrointestinal Tract*. [http:// www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch095.htm](http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch095.htm) (Diakses tanggal 14 Januari 2015).
- Handiwirawan E, Subandriyo. 2004. Potensi dan keragaman sumber daya genetiksapi Bali. Prosiding Lokakarya Seminar Nasional Sapi Potong; Yogyakarta, 8-9 Oktober 2004.
- Haryati T. 2011. Probiotik dan Prebiotik Sebagai Pakan Imbuhan Nonruminansia. *Wartazoa*. 21(3):125-131.
- Hyronimus B, Mareec LC, Sassi, AH, dan Deschamps A. 2000. Acid and Bile Tolerance of Spore-forming Lactic Acid Bacteria. *J Food Microbiol*6(2): 193-197.
- Isolaure E, Rautava S, Kalliomaki M, Kirjavainen P, dan Salminen S. 2002. Role of Probiotic in Food Hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2: 263-267.
- Jacobsen CN, Nielsen VR, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Erregard AP, Sandstorm B, Tvede M, Jakobsen M. 1999. Screening of Probiotic Activities of Forty Seven Strain of *Lactobacillus* sp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strain in Human. *Appl and Enviro Microbiol* 65: 4949-4956.
- Kalliomaki M, Salminne S, Pussa T, Arvilommi H, Isolaure E. 2003. Probiotics and Prevention of Atopic Disease: A Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet* 61: 1869-1871.
- Kong F, Singh RP. 2008. Disintegration of Solid Food in Human Stomach. *Journal of Food Science*73(5): R67-R80.
- Manin F. 2010. Potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* dari Saluran Pencernaan Ayam Buras Asal Lahan Gambut sebagai Sumber Probiotik. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan* 8 (5):221-228.
- Murad HA, Rafaea RI, Aly EM. 2011. Utilization of UF Permeate for Production of α -galactosidase by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Microbiology* 60(2): 139-144.
- Oh S, Kim SH, Worobo RW. 2000. Characterization and Purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy and Food Sciences* 83: 2747-2752.
- Oozer R, Leplingard A, Mater DDG, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, Marteau P, Dore J, Bresson JL, dan Corthier G. 2006. Survival of *Lactobacillus casei* in the Human Digestive Tract After Consumption of Fermented Milk. *Appl and Enviro Microbiol*. 72(8): 5615-5617.
- Salminen S, Wright V, Morelli L, Marteau P, Brassart D, Devos W, Fonden M, Saxein R, Collins M, Mogensen K, Berkeland G, Matilla-Sandholm T. 1998. Demonstration of Safety Probiotics – a Review. *Int J Food Microbiol* 44: 93-106.

- Scheinbach S. 1998. Probiotics: Functionally and Commercial Status. *Biotechnology Advances*. 16(3) : 581-608.
- Suardana IW, Suarsana IN, Sujaya IN, Wiryawan KG. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *J Veteriner* 8(4) : 155-159.
- Suardana IW. 2008. Kajian Pola Pertumbuhan dan Aktivitas Antimikroba Isolat *Lactococcus Lactis* sp *Lactis 1* Asal Cairan Rumen Sapi Bali. Book chapter "Karya Unud untuk Anak Bangsa". Universitas Udayana. hal. 51-58.
- Suardana IW, Sukada IM. 2015. Uji Potensi Probiotik Bakteri Asam Laktat Isolat 3B Hasil Isolasi dari Kolon Sapi Bali. Denpasar. Prosiding *Seminar Nasional Sains dan Teknologi II. Kuta, 29-30 Oktober 2015*. hal. 1264-1270.
- Suardana IW. 2015. Aplikasi Bakteriosin Asalyogiiurt Sebagai Biopreservatif Daging Ayam pada Penyimpanan Suhu Dingin. Prosiding *Seminar Nasional Sains dan Teknologi I. Denpasar, 18-19 September 2014*. hal. 362-372.
- Suardana IW, Cahyani AP, Pinatih KJP. 2016. Probiotic Potency and Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bali Cattle's Colon. *Global Advance Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 5(5) : 143-149.
- Sujaya IN, Dwipayanti NMU, Suariani NP, Widarini NP, Nocianitri KA, Nursini NW. 2008. Potensi *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kuda Sumbawa Sebagai Probiotik. *J Veteriner* 9(1): 33-40.
- Usmiati SW, Broto, Setiyanto H. 2011. Karakteristik Dadih Susu Sapi yang Menggunakan Starter Bakteri Probiotik. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 16(2) : 140-152.
- Van Neil CW, Garrison MM, Christakis DA. 2002. Lactobacillus Therapy for Acute Infectious Diarrhea Children: meta analysis. *Pediatrics* 109: 678 – 784.
- Wilson GS, Miles AA. 1966. *Principles of Bacteriology and Immunity*. Vol I. 5th Ed. London. Butler & Tanner Ltd.
- Winarsih W, KOMPIANG IP, Priosoeryanto BP, Wibawan IWT. 2005. Prospek pengendalian Salmonellosis pada ayam dengan probiotik mikroba asal saluran pencernaan. Laporan Akhir Penelitian Hibah Bersaing X1 Tahun 2003 s/d 2004. Bogor. Institut Pertanian Bogor.