

***Ketahanan terhadap Kondisi pH Asam dan
Aktifitas Antagonis terhadap
Bakteri Patogen Empat Jenis Bakteri Asam Laktat***

***Resistance Toward Acidic pH and Antagonistic Activity
Against Bacterial Pathogen Four Types of lactic Acid
Bacteria***

Samsul Rizal*, Fibra Nurainy *

*) Staf pengajar jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Lampung
Email : fibranurainy@gmail.com

ABSTRAK

Salah satu makanan kesehatan yang banyak dikembangkan adalah produk pangan yang mengandung sel mikroba hidup yang menguntungkan yang dikenal dengan istilah probiotik. Produk probiotik pertama menggunakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei* sebagai komponen dalam susu fermentasi. Dalam perkembangannya, jumlah spesies mikroba yang terlibat dalam produk probiotik meningkat dengan sangat pesat. Jenis bakteri asam laktat yang digunakan merupakan salah satu faktor yang akan menentukan kualitas produk probiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sifat ketahanan terhadap kondisi asam dan aktivitas antagonis bakteri patogen pada empat jenis bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat yang digunakan adalah *L.acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L.casei* dan *S.thermophilus*. Sifat ketahanan terhadap asam dilakukan dengan menumbuhkan keempat jenis bakteri asam laktat pada media MRS yang pH-nya diatur pada pH 2,5 dengan penambahan asam (HCl). Sifat antibakteri patogen dilakukan dengan menumbuhkan keempat jenis BAL pada media MRS yang telah diinokulasi dengan bakteri patogen. Bakteri patogen uji meliputi *B.cereus*, *E.coli* dan *S.aureus*. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan Anova dan apabila terdapat perbedaan nyata ($\alpha=0,05$ %) dilanjutkan dengan Uji BNT. Hasil pengujian pada sifat ketahanan asam menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan terhadap selisih jumlah bakteri asam laktat yang tumbuh pada media kontrol dengan media asam (pH 2,5) diantara setiap jenis bakteri asam laktat yang diuji. Selisih log koloni jumlah bakteri asam laktat kontrol dan perlakuan asam berkisar antara 5,937 – 7,156 log koloni/ml. Demikian juga pada pengujian sifat antagonis terhadap bakteri patogen baik terhadap *B cereus*, *E .coli* maupun *S. Aureus* tidak terdapat perbedaan nyata diameter penghambatan di antara keempat jenis BAL. Diameter penghambatan berkisar antara 1,142-1,373 mm. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari aspek pengujian ketahanan terhadap asam dan sifat antagonis terhadap bakteri patogen keempat jenis bakteri asam laktat berpotensi sebagai probiotik

Kata kunci : aktivitas antibakteri, bakteri asam laktat, ketahanan terhadap asam

ABSTRACT

One of the most widely developed health foods was food products containing beneficial living microbial cells known as probiotics. The first probiotic product used *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* bacteria as components in fermented milk. In its development, the number of microbial species involved in probiotic products was increasing rapidly. Type of lactic acid bacteria used was one factor that would determine the quality of probiotic products. The purpose of this study was to determine the properties of resistance to acid conditions and the antagonistic activity of pathogenic bacteria in four types of lactic acid bacteria (BAL). Lactic acid bacteria were *L.acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L.casei* and *S.thermophilus*. Acid resistance properties was done by growing the four types of lactic acid bacteria on MRS media whose pH was adjusted at pH 2.5 with the addition of acid (HCl). The antibacterial properties of pathogens were carried out by growing all four types of BAL on MRS media that had been inoculated with pathogenic bacteria (*B.cereus*, *E.coli* and *S.aureus*). The results obtained were analyzed by Anova and if there was a significant difference ($\alpha = 0.05\%$) followed by BNT Test. The results on acid resistance properties showed no significant difference to the difference in the number of lactic acid bacteria grown on the control medium with the acid medium (pH 2.5) between each type of lactic acid bacteria tested. The colony log difference between the amount of lactic acid control bacteria and the acid treatment ranged from 5.937 - 7.156 logs of colony / ml. Likewise on testing of antagonistic properties against pathogenic bacteria against *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus*, there was no significant difference in inhibition diameter between the four BAL types. Diameter of inhibition ranged from 1,142-1,373 mm. Based on the results of research that has been done, it can be concluded that from the aspect of acid resistance and antagonistic properties against pathogenic bacteria the four types of lactic acid bacteria potentially as probiotics.

Keywords: antibacterial activity, lactic acid bacteria, acid resistance

Pendahuluan

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang dikonsumsi manusia atau hewan dalam jumlah yang cukup, mampu hidup dan melewati kondisi lambung dan saluran pencernaan serta bermanfaat bagi inangnya (Savadogo et al., 2006). Sejumlah penelitian mengungkapkan beberapa pengaruh positif bagi kesehatan dari probiotik, antara lain meningkatkan ketahanan terhadap penyakit infeksi terutama infeksi usus dan diare (Roos dan Katan 2000; Rolfe, 2000; Quigley, 2012), menurunkan tekanan darah/antihipertensi (Miremedi et al., 2016), menurunkan konsentrasi kolesterol serum darah (Pereira et al., 2002), mengurangi reaksi *lactose intolerance* (Mustapha et al. 1997), mempengaruhi respon imun (Erickson dan Hubbard 2000), menurunkan risiko terjadinya tumor dan kanker kolon (Roos dan Katan 2000), bersifat antimutagenik (Sah et.al., 2014)) serta bersifat antikarsinogenik (Kumar et al., 2012).

Perubahan gaya hidup dan pola makan dapat mengubah keseimbangan flora usus, untuk memperbaiki kondisi tersebut dapat dilakukan dengan meningkatkan populasi bakteri yang baik dan menekan bakteri patogen yaitu melalui konsumsi pangan fungsional yang

mengandung bakteri probiotik. Kultur bakteri yang digunakan dalam pembuatan pangan fungsional adalah kultur bakteri yang berpotensi sebagai probiotik yaitu kultur bakteri yang bersifat tahan terhadap kondisi asam dan garam empedu, serta mempunyai kemampuan untuk bersaing dengan bakteri enterik patogen di dalam saluran pencernaan (Salminen, 1993). Pada awalnya, produk probiotik menggunakan kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei* sebagai komponen dalam susu fermentasi. Dalam perkembangannya, jumlah spesies mikroba yang terlibat dalam produk probiotik meningkat dengan sangat pesat. Pada penelitian ini akan dilakukan seleksi terhadap empat jenis Bakteri Asam Laktat (BAL) yaitu *L. acidophilus*, *L. Bulgaricus*, *L. casei* dan *S. Thermophilus* dalam sifat ketahanannya terhadap kondisi asam dan aktivitas antagonis terhadap bakteri patogen.

Bahan dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Mei – Agustus 2017.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dipergunakan meliputi kultur *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* yang diperoleh dari PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, kultur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus* yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan daerah Bandar Lampung. Media MRS Broth, MRS Agar, Nutrient agar, Nutrient broth, dan HCL 1N.

Alat alat yang dipergunakan antara lain tabung reaksi, cawan petri, inkubator, jarum ose, lampu bunsen, neraca analitik, pipet tip dan Autoklaf.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok Lengkap dengan perlakuan jenis BAL yang terdiri dari kultur *L. Acidophilus*, *L. Bulgaricus*, *L. Casei* dan *S. Thermophilus* sebagai faktor tunggal dengan 3 kali ulangan. Data yang diperoleh diuji kesamaan ragamnya dengan uji Bartlett. Kemudian dianalisis dengan sidik ragam untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh antar perlakuan. Apabila terdapat perbedaan data dianalisis lebih lanjut dengan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%. Pengamatan yang dilakukan adalah ketahanan terhadap asam, dan aktivitas antibakteri.

Pengujian Ketahanan Terhadap Asam (pH 2,5)

Pengujian ketahanan BAL yang terdapat dalam produk terhadap asam (pH 2,5) dilakukan dengan metode hitungan cawan (Zavaglia et al., 1998). Sebanyak 1 ml kultur kerja setiap bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam 9 mL MRS Broth yang sudah diatur pada kondisi asam yaitu pH 2,5 dengan menambahkan HCl pekat. Sebagai kontrol, yaitu masukkan dalam jumlah yang sama namun MRS Broth tanpa penambahan HCl. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, diambil 1 mL sampel lalu dimasukkan ke dalam media pengenceran, dan dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} . Pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} diambil 1 mL dan dipindahkan ke dalam cawan steril lalu tambahkan media MRS agar steril lalu dihomogenkan dengan cara diputar-putar membentuk angka 8, kemudian cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Ketahanan terhadap asam dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh pada kondisi kontrol dengan perlakuan pengaturan pH 2,5. Semakin kecil selisih antara jumlah koloni antara control dengan perlakuan asam maka semakin tahan galur BAL yang diuji terhadap pH rendah.

Pengujian Aktivitas antibakteri

Pengamatan aktifitas antagonis bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen menggunakan bakteri uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus*. Prosedur yang digunakan adalah difusi agar (Schillinger dan Lucke, 1989). Satu ose masing masing bakteri uji diinokulasi kedalam 20 ml NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Masing-masing bakteri uji diinokulasi sebanyak 25 µl kedalam NA (*Nutrient agar*) secara *pour plate* dan dibiarkan mengeras. Media NA yang telah mengeras kemudian dibuat sumuran menggunakan alat bor yang telah steril pada bagian tengah cawan petri. Sumuran yang telah dibuat diisi dengan media MRS Broth yang telah berisi kultur bakter asam laktat (1 ml kultur kerja bakteri asam laktat dimasukan kedalam 10 ml MRS Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam) sebanyak 60 µl. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona

bening yang terbentuk disekitar sumuran diukur sebagai zona penghambat bakteri asam laktat terhadap bakteri pathogen.

$$r' = [(rp^2 + 2 \cdot rp \cdot rs) \times Fk + rs^2] - rs$$

$$d' = 2 (r')$$

Keterangan:

r' = Jari-jari (mm) zona hambat hasil konversi.

rp = Jari-jari (mm) zona hambat hasil pengujian langsung (pengukuran dengan jangka sorong)

rs = Jari-jari sumur uji (mm) ditambah jari-jari zona hambat kontrol pelarut

Fk = Faktor koreksi pengenceran atau pemekatan

d' = Diameter (mm) zona hambat hasil konversi

Hasil dan Pembahasan

Ketahanan terhadap Kondisi Asam

Hasil pengujian ketahanan bakteri asam laktat terhadap kondisi asam dengan pH 2,5 disajikan pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan selisih antara jumlah BAL sebelum dan sesudah diujikan pada kondisi asam. Semakin tinggi nilai selisih BAL yang ditampilkan pada grafik maka semakin tidak tahan terhadap asam. Hasil analisa sidik ragam pada taraf 5 % menunjukkan bahwa selisih jumlah BAL (log koloni/ ml) antar perlakuan jenis bakteri asam laktat yang dipergunakan tidak berpengaruh nyata. Hal ini menunjukkan bahwa diantara jenis BAL yang diuji memiliki sifat ketahanan terhadap asam yang tidak berbeda nyata.

Tabel 1. Selisih jumlah BAL (log koloni/ml) sebelum dan sesudah diujikan pada kondisi asam

Jenis BAL	Selisih jumlah BAL (log koloni/ml)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6,436
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	6,049
<i>Lactobacillus casei</i>	7,156
<i>Streptococcus thermophilus</i>	5,937

Sebagian besar bakteri mempunyai pH optimal untuk pertumbuhannya, yaitu sekitar 7 (6,6-7,5) (Jay, 1997). Pada pH yang rendah bakteri asam laktat akan terhambat

pertumbuhannya bahkan dapat mengalami kerusakan dan kehilangan viabilitasnya. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ke empat bakteri asam laktat yang diuji memiliki ketahanan untuk hidup pada pH rendah (2,5). Hasil ini sejalan dengan penelitian Susanti et.al (2007) yang menguji ketahanan terhadap asam pada isolat *Lactobacillus acidophilus*, *L. Mesenteroides*, *L.casei*, *L. Brevis* dan *L. Plantarum*.

Bakteri Asam Laktat mampu bertahan pada pH yang relatif rendah karena memiliki sistem yang sekaligus mentransport asam laktat dan proton ke bagian luar sel (Ramirez_Chavarin et.al., 2013). Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa bakteri asam laktat lebih tahan terhadap asam karena kemampuannya dalam mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali daripada pH ekstraseluler (Nanen and Hutkins, 1991), dan memiliki membran sel yang lebih tahan terhadap kebocoran sel akibat paparan asam (Bender and Marquis, 1986). Menurut Kimoto *et al.* (1999) paparan pada kondisi yang sangat asam dapat mengakibatkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler hilangnya komponen-komponen intraseluler seperti Mg, K dan lemak dari sel, yang mampu menyebabkan kematian bakteri yang tidak tahan asam. Bakteri tahan asam memiliki ketahanan yang lebih besar terhadap kerusakan membran akibat terjadinya penurunan pH ekstraseluler dibandingkan dengan bakteri yang tidak tahan terhadap asam.

Aktifitas Antagonis Terhadap Bakteri Pathogen

Aktivitas antagonis terhadap bakteri patogen oleh bakteri asam laktat ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar sumur uji yang diukur sebagai diameter penghambatan. Diameter zona bening hasil pengamatan pada pengujian sifat antagonis BAL terhadap bakteri patogen dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil analisis sidik ragam pada taraf 5 % menunjukkan bahwa aktivitas antagonis bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa semua bakteri asam laktat mampu menghambat bakteri patogen yang diuji.

Tabel 2. Diameter penghambatan (zona bening) bakteri patogen oleh bakteri asam laktat.

Jenis BAL	Diameter penghambatan (zona bening) bakteri patogen oleh BAL (mm)		
	Bacillus cereus	Eschericia coli	Staphylococcus aureus
Lactobacillus acidophilus	1,329	1,293	1,373
Lactobacillus bulgaricus	1,200	1,142	1,318
Lactobacillus casei	1,231	1,278	1,282
S. thermophilus	1,248	1,265	1,283

Kemampuan mikroba probiotik bakteri asam laktat untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen disebabkan karena kemampuannya untuk memproduksi senyawa antimikroba seperti asam laktat dan asam asetat, hidrogen peroksida yang cukup besar dan bakteriosin. Akumulasi senyawa tersebut di dalam sel terjadi karena bakteri asam laktat tidak menghasilkan enzim katalase (Salminen dan Wright, 1993). Efek antimikroba dari bakteri asam laktat disebabkan oleh hasil metabolit bakteri asam laktat yang berupa asam laktat yang tidak terdisosiasi, dimana konstanta disosiasi (pKa) asam laktat adalah 3,8. Antimikroba dari molekul yang tidak terdisosiasi dihasilkan oleh disosiasi molekul dalam sitoplasma yang selanjutnya masuk ke dalam sel melalui membran. Pengeluaran proton H^+ setelah disosiasi diawali dengan penurunan gradien proton trans membran, netralisasi gaya gerak proton, dan penurunan pH internal yang dapat menyebabkan denaturasi dan kehilangan viabilitas sel (Sopandi dan Wardah, 2014).

Keempat jenis BAL yang digunakan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B.cereus*, *E.coli*, dan *S. Aureus*. Hasil penelitian Akpinar et al. (2011) menunjukkan kemampuan semua strain *L.bulgaricus* yang diisolasi dari Yoghurt produksi rumahan di Turki untuk menekan pertumbuhan *E. coli*, sebagian strain mampu menekan pertumbuhan *B. cereus*, *Kl. Pneumoniae*, *L.monocytogenes*, *B.coagulan* dan *S aureus*. Selain karena kemampuannya untuk memproduksi asam laktat dan hidrogen peroksida, *L. bulgaricus* juga memproduksi bakteriosin yang dikenal dengan sebutan *bulgarican*. Senyawa ini mampu menekan baik bakteri patogen gram positif maupun negatif.

Sebagian besar strain *S. thermophilus* dalam penelitian tersebut juga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen *Kl. Pnomanie*, *B.coagulans*, *P fluorescens*, *E.coli*,

S.aureus dan *L.monocytogenes*. Sebagian kecil strain *S. thermophilus* mampu menekan pertumbuhan *B.cereus*. Bakteri *L acidophilus* dan *L casei* juga dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) (Wysocki, 2010; Muralinath and Parasa, 2015). *L.acidophilus* dilaporkan memproduksi senyawa bakteriosin acidophilucin A (Quwehand and Vesterlund dalam Kaboosi, 2011) dan senyawa anti bakteri bukan asam laktat (belum teridentifikasi) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *S. Aureus*, *L monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *P aeruginosa* dan *Enterobacter cloacae* (Bernet-Camard et al., 1997).

Kesimpulan dan Saran

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semua jenis bakteri asam laktat yang diuji mempunyai ketahanan pada kondisi asam dan mempunyai sifat antagonis terhadap bakteri patogen , sehingga ke empat jenis bakteri asam laktat tersebut dapat digunakan sebagai probiotik. Untuk lebih mendukung hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian mengenai ketahanan bakteri asam laktat terhadap garam empedu. Di samping itu perlu dilakukan pengujian secara tidak langsung, yaitu membuat produk minuman probiotik dengan menggunakan empat jenis bakteri asam laktat yang akan diuji. Minuman probiotik yang dihasilkan selanjutnya diuji untuk melihat viabilitas bakteri asam laktat yang ada di dalamnya terhadap kondisi asam, garam empedu dan kemampuannya dalam menghambat bakteri- bakteri patogen.

Daftar Pustaka

- Akpinar,A., O. Yerlikaya and S. Kilic. 2011.Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strain isolated from Turkish homemade yoghurts . *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(6) pp. 675-682.
- Alkalin, A.S.,S. Gone and S. Duzel. 1997. Influence of Yoghurt and *Acidophilus* yoghurt on Serum Cholesterol Levels in Mice. *Journal Dairy Science* 80: 2721-2725.
- Bender, G.R., S.V.W.Sutton and R.E. Marquis.1986. Acid Tolerance, Proton Permeabilities, and Membrane ATPases of Oral Streptococci. *Infection and Immunity*.Vol.53 :331-338
- Erickson, K.L. and H.E. Hubbard, 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr (Suppl)* 130:403S-409S

- Fernandes, C.F. dan K.M. Shahani. 1990. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary *Lactobacilli*. *J. Food Prot.* 53:704
- Jay, J.M. 1997. *Modern Food Microbiology*. Fifth Ed. Chapman and Hall. New York.
- Kumar, M., V. Verma, R. Nagpel, A. Kumar. 2014. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B₁-induced liver carcinogenesis in rats. *British Journal of Nutrition*. 107 (7): 1006-1016.
- Miremadi, F., F. Sherkat, L. Stojanovka. 2016. Hypocholesterolaemic effect and anti-hypertensive properties of probiotics and prebiotics: A review. *Journal of Functional Food*. 25 :497-510
- Mustapha, A., Tianan-Jiang, dan D.A. Savaiano. 1997. Improvement of lactose digestion by human following ingestion of unfermented *Acidophilus* milk: influence of bile sensitivity, lactose transport and acid tolerance of *L. acidophilus*.
- Nanen, N.L. and R.W. Hutkins. 1991. Proton-translocating adenosin triphosphate activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74:747-751.
- Pereira, D.I.A. and G.R. Gibson. 2002. Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Human. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37: 259–281.
- Quigley, E.M. 2012. Prebiotics and probiotics: their role in the management of gastrointestinal disorders in adults. *Nutr. Clin. Pract.* 27(2):195-200.
- Ramirez-Chavarin, M.L., C. Wachter, C.A. Eslava-Campos and M.L. Prez-Chabela. 2013. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *Int. Food research Journal* 20(2) : 991-1000.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr (Suppl)* 130:396S-402S.
- Roos, N.M. de, dan M.B. Katan. 2000. Effect of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 71:405-411.
- Sah, B.N.P., T. Vasiljevic, S. Mckeechne, O.N. Donkor. 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry* . 156 :264-270.
- Salminen, S. dan A. Wright. 1993. *Lactid Acid Bacteria*. New York. Marcel Dekker
- Savadogo, A., C. A. T. Outara, I. H. N. Bassole, & A. S. Traore. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a inireview. *Afr J Biotechnol.* 5: 678-683.
- Schillinger U, and Lucke F. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 55: 1901 –1906.
- Susanti, I., R.W. Kusumaningtyas, F. Illaningtyas. 2011. Uji sifat probiotik bakteri asam laktat sebagai kandidat bahan pangan fungsional. *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan*. Vol. VIII :2: 89-95.
- Zavaglia AG, Kociubinski G, Perez P, Antoni GD. 1998. Isolation and Characterization of *Bifidobacterium* Strains of Probiotik formulation. *J. Food Protect.* 61(7) 865-873.

