

## Skrening Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Usus Ayam Broiler sebagai Kandidat Probiotik untuk Unggas

### *(Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Broiler's Intestine as Probiotic Candidates for Poultry)*

Nurbaiti<sup>1)</sup>, Anwar Rosyidi<sup>2)</sup>, dan Muhamad Ali<sup>3)\*</sup>

1) Program Magister Manajemen Sumberdaya Peternakan, Program Pascasarjana Universitas Mataram

2) Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram

Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Indonesia, 83125.

email: [ali.molbiotech@gmail.com](mailto:ali.molbiotech@gmail.com)

Diterima: 23 April 2016/Disetujui: 25 Mei 2016

#### ABSTRACT

The use of probiotics is increasingly popular as an alternative replacement to antibiotic uses in stimulating health and growth of broiler chickens. The use of antibiotics may disturb the balance of the gut microbiota and play a significant role in the emerging of antibiotic resistance pathogens. Thus, the objective of this study was to isolate and screen lactic acid bacteria (LAB) from the intestine of broiler chickens as probiotic candidates. LAB were initially screened by phenotypic assay. Furthermore, those strains which belonged to LAB were screened for inhibitory activity against *E. coli*. Results showed that a total of 4 isolates were considered as members of lactic acid bacteria indicating by the results of phenotypic assays: gram positive, catalase and oxidase negative, and able to perform carbohydrate fermentation. Out of the 4 isolates, only one isolate showed an inhibitory activity against the targeted pathogen. Further research is still needed to confirm the potential strain for probiotic in poultry.

**Key-words:** probiotics, lactic acid bacteria, *Escherichia coli*, catalase test, carbohydrate fermentation

#### PENDAHULUAN

Probiotik merupakan sel mikroorganisme (mikroba) hidup maupun hasil metabolitnya yang memiliki banyak manfaat untuk makhluk hidup. Menurut regulasi Uni Eropa (EC Regulation) No. 1831/2003 tentang penggunaan bahan aditif pada ternak, probiotik digolongkan sebagai bahan aditif pakan kelompok fungsional 4 (b) sebagai “*gut flora stabilizer*” (Mikulski *et al.*, 2012). Tamime (2005) mendefinisikan probiotik sebagai mikroba hidup yang secara aktif dapat meningkatkan kesehatan dengan cara menjaga keseimbangan flora saluran pencernaan.

Penggunaan probiotik pada ternak sangat luas. Untuk ternak unggas, manfaat probiotik diantaranya untuk meningkatkan pencernaan pakan, mengurangi jumlah mikroba patogen di saluran pencernaan sehingga dapat menjaga kesehatan ternak, meningkatkan daya tahan tubuh, serta membantu pertumbuhan (Ehrmann *et al.*, 2002). Penambahan

mikroba hidup ke dalam pakan dapat merangsang sistem kekebalan tubuh ternak (Toms dan Powrie, 2000 dan Koenen *et al.*, 2004) serta meningkatkan daya tahan tubuh non spesifik (Placha *et al.*, 2010). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa probiotik dapat memperbaiki konversi pakan, menurunkan kematian (Mohan *et al.*, 1995) serta menghambat menempelnya patogen seperti *Escherichia coli* di usus (Coconnier *et al.*, 1993).

Mekanisme kerja probiotik cukup beragam. Mikroba patogen sangat aktif merombak zat-zat yang terdapat pada kolon guna menghasilkan metabolit toksik, karsinogenik, atau metanogenik yang berasal dari bahan beracun, obat-obatan, steroid ataupun metabolit dari bahan pakan. Pada hewan yang peka, metabolit tersebut sering menyebabkan kerusakan mukosa usus, bahkan dapat menyebabkan terbentuknya tumor atau penyakit lain sehingga metabolit toksik tersebut harus dibuang. Probiotik memiliki peranan dalam menetralkan toksin yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri patogen,

serta menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen tersebut dengan cara mencegah kolonisasinya pada dinding usus halus. Probiotik mampu mendesak mikroba non-indigenous (patogen) keluar dari ekosistem saluran pencernaan dan mengambil lokasi mikroba patogen tersebut (Fuller, 1992). Selain itu, probiotik juga mampu mempengaruhi aktivitas enzim pada usus halus, mengasimilasi kolesterol, serta meningkatkan pertumbuhan dan kinerja ternak (Abun, 2008). Bahkan probiotik dapat juga dimanfaatkan untuk mencegah pertumbuhan mikroba lain karena kemampuannya menghasilkan senyawa antibakteri yang disebut sebagai bakteriosin.

Ashayerizadeh *et al.*, (2009) melaporkan bahwa *Lactobacillus* merupakan salah satu spesies probiotik yang banyak digunakan pada ayam broiler selain *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, *Candida*, dan *Saccharomyces*. Zhang *et al.*, (2003) menambahkan bahwa *Lactobacillus* yang dinonaktifkan dengan panas dapat memberikan pengaruh positif terhadap perkembangan imunitas sel tubuh ayam broiler.

Menurut Sari *et al.* (2013), *Lactobacillus* merupakan mikroba utama yang terdapat dalam saluran pencernaan ayam broiler. Di dalam saluran pencernaan, mikroba tersebut mampu menghasilkan asam laktat dan asam asetat yang membuat pH di sekitarnya berkisar antara 4-5. Namun, bakteri asam laktat tersebut mampu tumbuh pada suasana asam tanpa adanya oksigen. Bakteri asam laktat, terutama *Lactobacillus*, sangat bervariasi (lebih dari 150 spesies) dengan aktifitas katabolik yang berbeda. Mengingat pentingnya peranan bakteri asam laktat ini, isolasi telah dilakukan dari berbagai sumber baik dari saluran pencernaan manusia sampai tanah maupun sisa-sisa hasil pembusukan tanaman (Boguta *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari usus ayam broiler yang dipotong di Narmada Kabupaten Lombok Barat. Isolasi ini dilakukan dalam lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri asam laktat (dalam kondisi anaerob menggunakan media selektif *de Man Rogosa Sharpe* (MRS), sehingga didapat aneka bakteri asam laktat murni yang sesuai dengan harapan. Karakterisasi selanjutnya dilakukan tidak hanya untuk mengkonfirmasi ulang keberadaan bakteri asam laktat tersebut, namun juga untuk melihat kemampuan bakteri tersebut dalam

menghambat bakteri patogen.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram. Penelitian ini menggunakan usus halus ayam broiler strain Arbor Acres yang diperoleh dari pedagang ayam potong di Pasar Narmada Kabupaten Lombok Barat dengan umur 35 hari sebanyak 6 ekor. Media kultur yang digunakan adalah media selektif (MRS Agar dan Broth) dan media Mueller Hinton Agar (MHA).

### Isolasi bakteri asam laktat

Usus halus ayam broiler dipotong sepanjang 2 cm dan sebanyak 1 gram feces yang terdapat di dalam potongan usus halus tersebut dilarutkan dalam 9 ml NaCl fisiologis untuk mendapatkan pengenceran dengan konsentrasi  $1 \times 10^{-1}$ . Homogenisasi dilakukan menggunakan vortex untuk kemudian diambil sebanyak 100  $\mu$ L dan ditambahkan dengan 900  $\mu$ L NaCl fisiologis untuk mendapatkan pengenceran dengan konsentrasi  $1 \times 10^{-2}$ . Pengenceran terus dilakukan secara berseri sampai mendapatkan konsentrasi  $1 \times 10^{-10}$ . Sebanyak 100  $\mu$ L dari masing-masing pengenceran di atas dimasukkan ke dalam petridisk diikuti dengan penuangan media MRS padat, kemudian digoyang-goyang agar larutan sampel dan media tercampur rata. Sampel tersebut kemudian didiamkan pada suhu ruang untuk kemudian dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* yang berisi *anaerobic sachet*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam sampai mendapatkan koloni bakteri yang tumbuh.

### Isolasi koloni dengan bentuk koloni dominan

Koloni tunggal yang tumbuh di media MRS agar diambil dengan jarum ose steril kemudian digoreskan pada media MRS agar baru secara zig-zag dengan cara menggerakkan ujung ose ke arah sisi kanan beberapa kali. Ujung ose disteril dan didinginkan kembali untuk digunakan melanjutkan penggoresan sebelumnya sampai selesai. Cawan petri kemudian diinkubasi 24 jam dalam keadaan anaerob pada suhu 37 °C. Pada akhir masa inkubasi, koloni koloni yang tumbuh pada permukaan medium diperiksa dengan seksama untuk memastikan semua koloni adalah homogen. Koloni yang tumbuh terpisah (koloni yang berbentuk sekumpulan sel dari

satu jenis saja) dikultur untuk selanjutnya dilakukan karakterisasi.

#### **Pengecatan gram**

Prosedur pengecatan gram atau prosedur pewarnaan yang dilakukan adalah dengan mengikuti metode Dwidjoseputro (1989) yaitu dengan cara mengambil biakan bakteri dari stok dan kemudian diratakan di atas kaca preparat yang terlebih dahulu telah ditetesi dengan NaCl fisiologis. Selanjutnya difiksasi di atas api bunsen untuk kemudian ditetesi dengan zat warna kristal violet selama 2 menit. Preparat dibilas dengan air mengalir, ditetesi dengan larutan iodine kompleks untuk kemudian ditunggu selama 1 menit. Preparat dibilas kembali dengan air mengalir agar zat warna meresap pada bakteri. Preparat ditetesi alkohol dan ditunggu selama 15 detik yang dilanjutkan dengan pembilasan kembali menggunakan air. Preparat ditetesi dengan zat warna safranin, ditunggu selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat kemudian dikeringkan dan kemudian diperiksa dibawah mikroskop pembesaran 100x setelah ditetesi minyak imersi.

#### **Uji katalase**

Uji ini dilakukan dengan cara pertama-tama dibuat ulasan bakteri pada gelas objek kemudian ditambahkan 2-3 tetes reagen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di atas preparat hingga menutupi permukaan preparat. Perubahan yang terjadi diamati di bawah mikroskop. Hasil dikatakan positif jika terbentuk gelembung gas, demikian juga sebaliknya.

#### **Uji gula**

Uji ini dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri dari stok sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan kedalam media yang mengandung glukosa, laktosa, sukrosa, manitol, dan maltosa dengan cara dimasukkan ke dalam media tersebut. Inkubasi dilakukan pada temperatur 37°C selama 2x 24 jam dan perubahan warna yang terjadi diamati secara seksama. Perubahan warna medium menjadi kuning menandakan asam, warna merah menandakan medium menjadi basa, warna hitam menandakan terbentuknya H<sub>2</sub>S dan jika medium terangkat menandakan bahawa mikroba tersebut mampu menghasilkan gas.

#### **Uji daya hambat terhadap bakteri patogen**

Uji ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang berpotensi sebagai bakteri probiotik penghasil bakteriosin. Pengujian terhadap aktivitas daya hambat terhadap mikroba patogen (*E.coli*) dilakukan dengan cara meratakan 100 µL bakteri patogen (0,5 Mcparland) pada media MHA dengan menggunakan sprider. Kemudian dibuat sumuran pada media MHA yang telah ditumbuhi bakteri patogen tersebut. Sebanyak 50 µL supernatan bakteri yang telah dinetralkan pHnya dimasukkan pada masing-masing sumuran yang telah dibuat. Sebagai kontrol positif telah digunakan antibiotik (50 µg/mL ampisillin). Aktifitas antimikroba dapat dilihat melalui terbentuknya zona bening di sekitar sumuran.

#### **Analisis data**

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisa deskriptif, yaitu dengan cara memvisualisasikan hasil penelitian menggunakan gambar dan tabel. Hasil visualisasi tersebut kemudian dibandingkan dan dijelaskan. Besarnya aktifitas antimikroba ditentukan dengan melihat zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran serta mengukur diameter zona tersebut dengan menggunakan jangka sorong.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Isolasi bakteri asam laktat dari usus ayam broiler**

Isolasi ini dimulai dengan mengencerkan sampel berupa isi usus dari ayam broiler dengan pengenceran 10<sup>1</sup> sampai 10<sup>10</sup> yang bertujuan agar bakteri yang tumbuh pada media MRSA yang telah disediakan tidak terlalu padat. Penggunaan media MRS dengan kondisi *anaerob* akan dapat menyaring dan mencegah tumbuhnya bakteri lain selain bakteri asam laktat. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam dalam kondisi *anaerob*, tampak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada sampel nomor 1, 2, dan 3 yang masing-masing merupakan hasil pengenceran 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, dan 10<sup>-3</sup>. Namun, jumlah koloni yang tumbuh pada petri nomor 1 dan 2 sangat padat dan banyak yang masih menempel, sehingga tidak dipergunakan untuk isolasi. Lain halnya dengan jumlah koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada petri nomor 3, walaupun cukup padat namun semua koloni hampir semua terpisah. Pertumbuhan bakteri asam laktat tidak ditemukan

pada petri nomer 4-10, yang menunjukkan bahwa bakteri asam laktat tidak ada pada jumlah pengenceran  $10^{-4}$ - $10^{-10}$ .

Hasil penelitian ini menunjukkan jumlah bakteri asam laktat pada usus ayam broiler jauh lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Smith (1965) maupun hasil penelitian Abrar dan Raudhati (2006). Total bakteri asam laktat yang tumbuh pada saluran pencernaan ayam pada masing-masing hasil penelitian di atas adalah berturut-turut  $8,2 \times 10^{10}$  cfu/mL dan  $2,1 \times 10^7$  cfu/mL. Perbedaan jumlah tersebut diperkirakan karena adanya perbedaan umur ayam yang digunakan, pakan yang diberikan, kondisi kekebalan

(imunitas), maupun pemberian *feed additive* pada ayam.

**Karakteristik isolat bakteri asam laktat**

Karakterisasi pertama yang dilakukan adalah berdasarkan penampakan luar (fenotip) bakteri yang diperoleh dari pengamatan baik menggunakan mata telanjang maupun menggunakan mikroskop. Bentuk koloni bakteri yang tumbuh pun bermacam-macam dan dengan ukuran yang berbeda-beda pula. Secara detail, hasil karakterisasi isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari usus ayam broiler ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil karakterisasi isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari usus ayam broiler

Karakterisasi	Isolat			
	1	2	3	4
Morfologi				
- Bentuk koloni	Bulat (dari atas)	Oval (seperti wijen)	Oval (seperti wijen)	Bundar datar
- Bentuk pinggir	Halus	Halus	Halus	Halus
- Bentuk penonjolan	Timbul	Timbul	Timbul	Datar
- Warna koloni	Putih	Kuning Telur	Kuning Telur	Putih
Pewarnaan gram dan pengamatan mikroskopis	Warna merah (-) Batang (bacil)	Warna merah (-) Batang (bacil)	Warna merah (-) Batang (bacil)	Warna merah (-) Batang (bacil)
Uji katalase	-	-	-	-
Uji gula-gula				
- Glukosa	+	-	-	-
- Laktosa	+	-	-	-
- Sukrosa	+	-	-	-
- Maltosa	-	-	-	-
- Manitol	-	-	-	-

Keterangan: 1 – 4 = isolat bakteri asam laktat

Ke-4 isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi pada penelitian ini memiliki tiga bentuk koloni, yaitu bulat, oval, dan bundar datar. Semua isolat tersebut memiliki bentuk pinggir yang halus, 3 isolat memiliki bentuk permukaan timbul (menonjol), dan satu isolat berbentuk datar. Dilihat dari warna koloni, tiga isolat berwarna putih dan satu isolat berwarna kuning telur.

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa semua bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi negatif katalase, yang artinya bakteri-bakteri tersebut tidak menghasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang ditunjukkan oleh tidak adanya gelembung pada reaksi. Hasil penelitian ini sesuai dengan kriteria

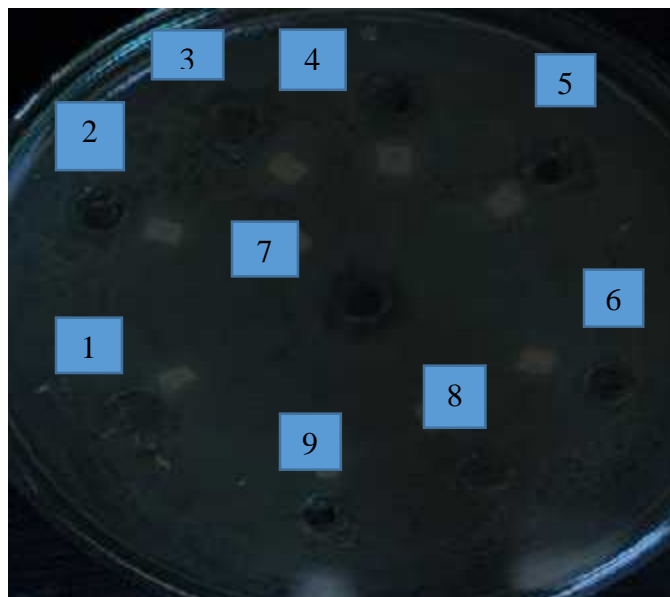
bakteri asam laktat yang menunjukkan katalase negatif (Khedida *et al.*, 2009).

Berdasarkan uji pewarnaan gram, semua isolat berwarna merah yang menunjukkan bahwa sel-sel bakteri tidak dapat menahan warna kristal violet dan safranin setelah pencucian dengan alkohol 95% akibat dinding selnya yang tipis. Ciri ini merupakan ciri dari bakteri gram negatif. Hal sebaliknya terjadi pada bakteri gram positif, dimana sel-sel bakteri tebal dan mengandung peptidoglikan sehingga tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet yaitu biru-ungu.

### Uji aktivitas anti bakteri

Uji aktivitas antibakteri ini dapat dilakukan dengan mengamati daya hambat (zona bening) bakteri terhadap tumbuhnya bakteri patogen yang dalam hal ini digunakan bakteri *E. coli*. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang

diisolasi dari usus ayam broiler tidak mampu menghambat bakteri *E. coli* yang ditumbuhkan dengan konsentrasi 0.5 Mcparland. Ketika konsentrasi bakteri direduksi menjadi 0.12 Mcparland, bakteri asam laktat tersebut terlihat memiliki aktifitas antibakteri (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil uji aktifitas antibakteri bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi. No. 1 dan 2 kontrol positif (menggunakan *Enterococcus faecium*), no. 3 isolat 38, no. 4 isolat 41(1), no. 5 isolat 41(2), no. 6 isolat 41(3), no. 8 dan 9 kontrol negatif (air steril), dan no. 7 kontrol positif (menggunakan 50 µg/ml ampisilin).

Adanya zona bening pada isolat no. 3, 4, 5, dan 6 berukuran sama dengan ukuran zona bening yang terbentuk pada isolat no. 1 dan 2 menggunakan *Enterococcus faecium* yang telah terbukti menghasilkan bakteriosin. Namun, aktifitas antibakteri tersebut jauh lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 50 µg/mL (no. 7). Pengukuran ukuran zona bening yang terbentuk akibat aktifitas antibakteri bakteri asam laktat tidak dilakukan karena berukuran kecil. Aktifitas antibakteri isolat-isolat yang berhasil diisolasi ini lebih rendah dibandingkan dengan bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi oleh Sari *et al.* (2013) yang juga diperoleh dari usus ayam broiler. Adanya kemampuan antibakteri dari bakteri-bakteri tersebut menjadi indikasi bahwa bakteri-bakteri asam laktat

yang berhasil tersebut dapat digunakan sebagai probiotik untuk unggas.

### SIMPULAN

Bakteri asam laktat telah berhasil diisolasi dari usus ayam broiler yang dipotong di Pasar Narmada Kabupaten Lombok Barat. Semua bakteri asam laktat tersebut diduga termasuk jenis *Lactobacillus sp.* Bakteri-bakteri asam laktat tersebut mampu membuat zona bening pada media yang ditumbuhkan dengan bakteri *E. coli* yang menunjukkan bahwa bakteri-bakteri tersebut dapat menghasilkan senyawa antibakteri yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*. Adanya kemampuan tersebut dapat menjadi indikasi bahwa bakteri-bakteri asam laktat yang berhasil tersebut dapat digunakan sebagai probiotik untuk unggas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, A. dan E. Raudhati, 2006. Produktifitas dan aktifitas mikroba saluran pencernaan ayam broiler yang diberi probiotik. Penelitian DIK-S. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya.
- Abun, 2008. Hubungan Mikroflora Dengan Metabolisme Dalam saluran Pencernaan Unggas dan Monogastrik. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan. Universitas Padjajaran.
- Andajani, R. 1997. Peran probiotik dalam meningkatkan produksi unggas. Poultry Indonesia, 26:19-20
- Ashayerizadeh, A., N. Dabiri, O. Ashayerizadeh, K.H. Mirzadeh, H. Roshanfekar and M. Mamooee. 2009. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. Pakistan Journal of Biological Science. 12: 52-57. □
- Boguta, A.M., Bringel, F., Martinussen, J., and P.R. Jensen. 2014. Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstock. Microbial Cell Factories, 13: 97.
- Cole, D.J.A. 1991. The role of the nutritionist in designing feed for the future in feed industry. T.P. Lyons (ed). Proceeding of Altech's. Seventh Annual Symposium. Altech Technical Publication. Nicholasville Kentucky:1-2.
- Dwidjoseputro, 1989. Dasar-Dasar Mikrobiologi, Djambatan, Jakarta.
- Ehrmann, M.A., P. Kurzak, J. Bauer and R.F. Vogel, 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. Journal of Applied Microbiology, 92: 966-975.
- Fiol, F.D.S.D., A. Cristina, M. Tardelli, F.C.C Marciano, M.C. Marques and L.L. Sant'Ana. 2014. Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. Experimental Chemotherapy. 60:162-167.
- Fuller, R. 1992 . History and Development of Probiotics. In: Probiotics, the Scientific Basis. Ed. London. 1-8.
- Gordon, R.F., and Jordan, F.T.W. 1982. Poultry Diseases. 2<sup>nd</sup> Edition. The English Language Book Society, London.
- Khedida, K., M. Faide, A. Mokhtarib, A. Soulaymanib, and A. Zinedine. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiological Research, 164; 81-91.
- Koenen, M. E., Kramer, J., van der Hulst, R., Heres, L., Jeurissen, S.H.M., and W.J.A. Oersma, 2004. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. British Poultry Science. 45:355-366.
- Mikulski, D., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., and V. Demey. 2012. Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. Poultry Science, 91: 2691-2700.
- Salminen, S., and Wright, A.V. 1998. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2<sup>nd</sup>Ed. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sari, M.L., Abrar, A., dan Merint. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat pada usus ayam broiler. Agripet: 1: 43-48.
- Smith, H.W. 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. Journal of Pathology and Bacteriology. 89:95-122.
- Tamimi, A.Y. 2005. Probiotic Dairy Products. Society of Dairy Technology, Blackwell Publishing. United Kingdom.
- Toms, C., and F. Powrie. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. Microbes and Infection. 3:929-935.
- Zhang, H.H., Cao, Y.C., Bi, Y.Z., Hu, W.F., and X. Fang. 2003. The effects of heat-killed *Lactobacillus* preparation on the immunity of broiler chickens. Veterinary Medicine. 35:14-15. (In Chinese, abstract in English).
- Ziemer, C.J and. G.R. Gibson. 1998. A review of probiotic, prebiotic and symbiotic in the functional food concept: prospective and future strategies. International Dairy Journal 8:473-479.