



POTENSI *Staphylococcus hominis* K1A DARI SUSU KERBAU BELANG TORAJA SULAWESI SELATAN SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK

PONTENCY OF *Staphylococcus hominis* K1A FROM MILK OF TORAJA BELANG BUFFALO SOUTH SULAWESI AS A PROBIOTIC CANDIDATE

Hasria Alang¹, Joni Kusnadi², Tri Ardyati³, Suharjono³

¹ Biologi, STKIP-PI Makassar

² Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang

³ Biologi, Universitas Brawijaya, Malang

*corresponding author: hasriaalangbio@gmail.com

Received 8 Oktober 2019; Published 5 Januari 2020

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai potensi *S. hominis* K1A dari susu kerbau Belang Toraja sebagai kandidat probiotik. Tujuan : untuk menganalisis potensi *Staphylococcus hominis* K1A dari susu Kerbau Belang Toraja sebagai kandidat probiotik. Metode : *Staphylococcus hominis* K1A diuji aktivitas sebagai kandidat probiotik meliputi uji hemolisa agar, uji sensitivitas terhadap antibiotik, uji ketahanan asam dan ketahanan garam empedu secara invitro serta uji aktivitas antimikrobialnya. Hasil: hasil analisa menunjukkan bahwa *Staphylococcus hominis* K1A bersifat non patogen, sensitive terhadap antibiotik, mampu bertahan pada kondisi asam dan garam empedu secara invitro, efektif menghambat pertumbuhan *EPEC*, *S. aureus* dan *S. typhi*. Kesimpulan : *Staphylococcus hominis* K1A efektif digunakan sebagai kandidat probiotik secara invitro

Kata Kunci : Kerbau Belang, Probiotik, *Staphylococcus hominis*

Abstract

Research about potency of *S. hominis* K1A from milk Toraja Belang Buffalo as a probiotic candidate. Aim : to analyze potential of *Staphylococcus hominis* K1A from milk of Toraja Belang Buffalo milk as a probiotic candidate. Methode : *Staphylococcus hominis* K1A was assay as a probiotic candidate activity including hemolysis assay, antibiotic sensitivity, acid and bile salt resistance and antimicrobial activity test. Result : The analysis showed that *Staphylococcus hominis* K1A is non pathogenic, sensitive to antibiotics, able to survive in acidic and bile salts gastrointestinal,, effectively inhibiting the growth of *EPEC*, *S. aureus* and *S. typhi*. Conclusion : *Staphylococcus hominis* K1A is effectively used as a probiotic candidate.

Key word : Belang buffalo, Probitic, *Staphylococcus hominis*

Pendahuluan

Masuknya patogen ke dalam tubuh menyebabkan banyak infeksi yang berbeda. Bakteri masuk ke dalam saluran pencernaan atau hanya pada usus sebelum menyebar ke seluruh tubuh. Infeksi ini diasosiasikan dengan mengonsumsi makanan yang telah terkontaminasi oleh patogen. Keracunan makanan dapat terjadi setelah mengonsumsi makanan yang mengandung toksin atau bakteri patogen. Penyakit yang berkaitan dengan saluran pencernaan yaitu diare dan di negara berkembang, penyakit diare dapat menyebabkan kematian khususnya bagi anak-anak. Salah satu obat untuk mengatasi masalah tersebut adalah pemberian antibiotik. Namun, berbagai studi menemukan bahwa sekitar 40-62% antibiotik digunakan secara tidak tepat. Hal ini menyebabkan timbulnya resistensi, selain itu juga dapat merusak mikroorganisme komensal di dalam usus manusia (Sanders, 1999 & FAO/WHO, 2001, Sung dkk., 2010). Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan antimikroba alternatif guna menurunkan kasus resistensi. Salah satu alternatif yang disarankan oleh WHO adalah dengan menggunakan probiotik.

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang dapat memberikan dampak positif bagi fisiologi dan kesehatan manusia ataupun hewan inangnya. Keuntungan mengonsumsi probiotik yaitu mencegah dan mengobati penyakit infeksi pencernaan akibat mikroorganisme patogen, dan dapat menyeimbangkan mikroorganisme intestinal pada saat masuk dalam saluran pencernaan (Toma & Pokrotnieks, 2006, Parvez dkk., 2006, dan Sharma dkk., 2012). Beberapa karakteristik penting bakteri probiotik adalah dapat menjaga dan memperbaiki keseimbangan mikroorganisme intestinal, resisten terhadap asam dan garam empedu, tidak bersifat patogen dan mampu menghasilkan senyawa antimikroba, serta mampu berkolonisasi pada saluran pencernaan (Navarro dkk., 2000, Marconi dkk., 2014). Sung dkk. (2010) melaporkan bahwa *Streptococcus hominis* MBBL 2-9 dapat digunakan sebagai kandidat probiotik. Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan analisis uji kandidat probiotik *Streptococcus hominis* K1A yang diperoleh dari susu kerbau belang Toraja.

Metode Penelitian

Bakteri patogen *Staphylococcus aureus* 134-P, EPEC ATCC 25922 dan *Salmonella typhi* ATCC 58105535 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. *Streptococcus hominis* K1A pada media MRSA (Oxoid Ltd, Basingtoke, Hampshire, England) diperoleh dari susu Kerbau Belang Toraja Sulawesi Selatan, Indonesia.

Karakterisasi Isolat K1A sebagai Kandidat Probiotik

a. Uji patogenisitas /Hemolisa darah

Uji patogenisitas isolat K1A menggunakan *blood agar* berdasarkan Jamaly dkk. (2011) dan Hawaz (2014). Kultur umur 24 jam diletakkan satu ose pada permukaan media *blood agar* pada Cawan Petri, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan diamati aktivitas β -haemolysis (*clear zone*), α -hemolytic (*green zone*), dan γ -hemolytic (tanpa *clear zone*).

b. Uji antibiotik

Sensitivitas antibiotik *Staphylococcus hominis* K1A dilakukan dengan *disk diffusion method* berdasarkan manufacturer's instructions *disk antibiotic* (oxoid). Uji sensitivitas dilakukan menurut NCCLS (1998 & 2002), Hosseini, dkk., (2009), Banwo, dkk., (2012) Hawaz (2014), Avaiyarasi, dkk., (2016) yaitu *Staphylococcus hominis* K1A diambil 100 μ L ($CFU 10^6$ sel/mL) dan diinokulasikan secara *spread* pada permukaan media MRS agar. *Disk* antibiotik yang terdiri dari chloramphenicol (30 μ g), ampicillin (10 μ g), streptomycin (10 μ g) dan Canamicin (30 μ g) diletakkan di permukaan MRSA tersebut, kemudian diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Isolat

yang sensitif terhadap antibiotik dilihat secara semi kuantitatif berdasarkan diameter zona hambat di sekeliling *disk* dan lebar zona tersebut dibandingkan dengan lebar zona hambat tentang standar antibiotik menurut Oxoid yang mengacu pada kriteria *National Commitee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)* dengan kategori resisten (R), intermediat (I) dan sensitif (S). Antibiotik Chloramphenicol dikatakan R bila ≤ 12 , I bila 13-17 dan S bila ≥ 18 , Ampicillin R bila ≤ 13 , I bila 14-16 dan S ≥ 17 .

c. Uji resistensi isolat bakteri terhadap asam dan garam empedu

Uji resistensi *Staphylococcus hominis* K1A terhadap asam berdasarkan Mourad & Karam (2006), Gropper dkk. (2009), Maqsood dkk. (2013), Oluwajoba dkk. (2013), Mansour dkk. (2014) dan Lee dkk. (2015), sedangkan resistensi terhadap garam empedu berdasarkan Jamaly dkk. (2011), Jena dkk. (2013), Hawaz (2014), Mansour, dkk. (2014) dan Rizqiaty dkk. (2015). Uji resistensi di lakukan dengan mengambil isolat K1A fase pertumbuhan logaritmik densitas 10^7 sel/mL sebanyak satu milliliter ke MRS *broth* pH 3 dan 4 kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama tiga jam untuk uji tahan asam dan satu milliliter ke MRS *broth* yang mengandung oxgall bile 0,3 %, 0,5 %, dan 1,0 % (v/v) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama empat jam untuk uji resistensi garam empedu. Jumlah sel setiap isolat bakteri pada masing-masing perlakuan pH media dan garam empedu dihitung berdasarkan metode *pour plate* pada media MRSA. Resistensi isolat bakteri terhadap pH dan garam empedu dihitung menggunakan rumus (Sim dkk., 2012, Dias dkk., 2013, Hamida dkk., 2015, & Azat dkk., 2016). Data tersebut dianalisis ragam dengan $\alpha = 5$ %. menggunakan program SPSS 16.0.

$$SR (5) = \frac{\text{Log CFU } N_1}{\text{Log CFU } N_0} \times 100 \% \dots\dots\dots (1)$$

SR = Survival rate(Resistensi)
N₁ = Total jumlah bakteri setelah perlakuan
N₀ = Total jumlah bakteri sebelum perlakuan

d. Analisis Aktivitas Antimikrobia K1A dari Susu Kerbau Belang Toraja terhadap Bakteri Patogen Manusia

Staphylococcus hominis K1A diuji aktivitas antimikrobialnya terhadap bakteri patogen berdasarkan Hawaz (2014) dan Lertcanawanichakul & Sawangnop (2008) menggunakan *disk diffusion method*. Isolat stok kultur diambil satu ose dan diinokulasikan ke dalam 10 mL MRS *broth* diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Bakteri patogen aliran pencernaan yaitu *EPEC* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* 134-P, dan *Salmonella typhi* yang digunakan untuk pengujian antimikrobia ditumbuhkan dalam medium *Nutrient Broth*(NB) hingga densitas 10^6 sel/mL. Kultur isolat bakteri patogen diambil 100 μ L diinokulasikan secara *spread plate* pada permukaan media NA dalam Cawan Petri. *Blank disk* ditambahkan kultur isolat umur 18 jam dengan densitas 10^7 sel/mL sebanyak 50 μ L, kemudian dikeringanginkan lalu diletakkan dipermukaan Cawan Petri, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antimikrobia isolat K1A terhadap bakteri patogen ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling *disk*. Data diameter zona hambat *Staphylococcus hominis* K1A terhadap masing-masing bakteri patogen dianalisis ragam dengan $\alpha = 5$ %. menggunakan program SPSS 16.0.

Hasil dan Pembahasan

Uji hemolitik atau uji patogenisitas dilakukan untuk mengetahui aktivitas bakteri dalam melisis sel darah.. Lisis sel darah menunjukkan bahwabakteri tersebut bersifat patogen. *Staphylococcus hominis* K1A adalah bakteri yang diperoleh dari susu kerbau Belang Toraja. Bakteri sebagai kandidat probiotik harus bersifat non pathogen, oleh karena itu, dilakukan pengujian dengan cara menumbuhkan *Staphylococcus hominis* K1A tersebut pada media *blood agar* (agar darah). Hasil uji patogenisitas *Staphylococcus hominis* K1A pada media *blood agar* menunjukkan bakteri tersebut bersifat haemolisis gamma atau non haemolitik yang berarti bahwa *Staphylococcus hominis* K1A bersifat non pathogen (tabel 1) dan hal ini merupakan syarat utama bakteri kandidat probiotik.

Uji resistensi terhadap antibiotik berfungsi untuk mendeteksi kepekaan *Staphylococcus hominis* K1A terhadap beberapa jenis antibiotik. Pada penelitian ini, digunakan empat macam antibiotik yaitu Canamycin, Streptomycin, Amphicillin dan Chloramphenicol karena antibiotik tersebut merupakan jenis yang umum digunakan untuk menguji resistensi golongan bakteri. Berdasarkan hasil penelitian, terlihat bahwa *Staphylococcus hominis* K1A sensitif terhadap semua jenis antibiotik yang digunakan (tabel 1). Resistensi bakteri terhadap antibiotik mengindikasikan bahwa bakteri tersebut membawa gen resisten. Bakteri kandidat probiotik disyaratkan harus sensitif terhadap antibiotik, karena apabila bakteri tersebut telah resisten, dikhawatirkan akan ada transfer gen melalui mekanisme transposon ketika BAL lisis didalam usus sehingga gen resisten tersebut akan pindah ke mikroorganisme flora normal usus, sehingga mikroorganisme flora normal tersebut akan menerima gen resisten (Jena dkk., 2013, Handa & Sharma, 2016.)

Tabel 1. Uji hemolysis dan sensitivitas antibiotic *Staphylococcus hominis* K1A

Isolat	Hemolisis	Antibiotik			
		Streptomycin	Canamicin	Amphicillin	Chloramphenicol
K1A	γ	S (1,5 mm)	S (2,6 mm)	S (2,1 mm)	S (2,9 mm)

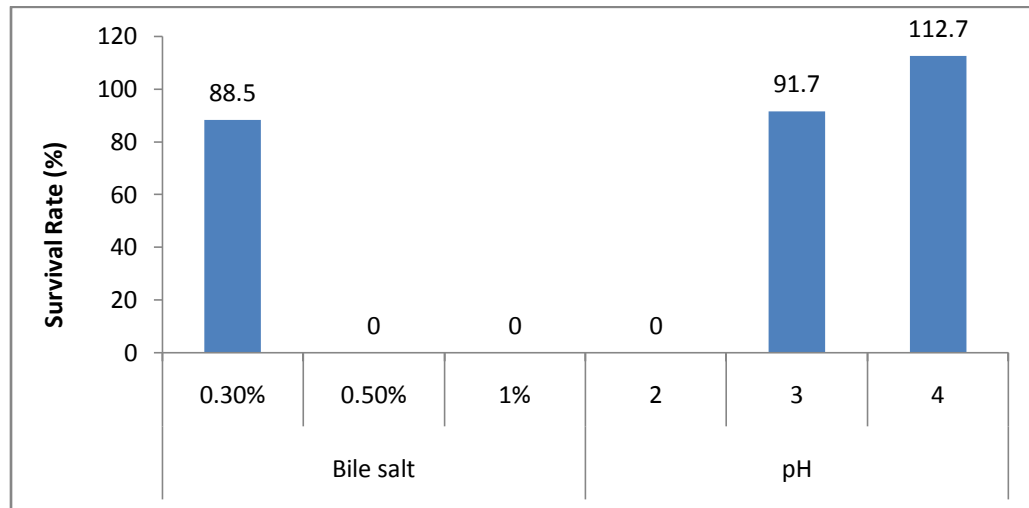
γ : gamma, S: Sensitif

Uji resistensi terhadap kondisi asam dan oxgall bertujuan untuk mengamati viabilitas *Staphylococcus hominis* K1A pada lingkungan asam dan garam empedu secara invitro (Gambar 1). Uji viabilitas bakteri tersebut telah dilakukan pada media MRS *broth* pH 2 hingga pH 4. Hasil pengujian menunjukkan bahwa *Staphylococcus hominis* K1A tidak dapat tumbuh pada pH 2.0, namun mampu bertahan hidup pada pH 3.0 dan 4.0. *Staphylococcus hominis* K1A dari susu Kerbau Belang Toraja hanya mampu bertahan hidup pada media yang mengandung garam empedu 0,3 %. Kemampuan bakteri bertahan hidup pada kondisi asam merupakan seleksi primer kandidat probiotik. Viabilitas bakteri terhadap garam empedu juga merupakan tahap seleksi mikroorganismesebagai kandidat probiotik.

Staphylococcus hominis K1A memiliki daya adaptasi yang baik terhadap kondisi lingkungan yang asam sehingga dapat bertahan hidup. Sebelum mencapai saluran usus, bakteri probiotik pertama kali harus mampu melewati dan bertahan selama tiga jam pada kondisi asam dalam cairan lambung dengan pH berkisar 1 hingga 4,5. Kondisi pH saluran pencernaan bergantung pada interval konsumsi makanan atau variasi makanan (Dunne dkk., 2001, Jamaly dkk., 2011, & Haitham dkk., 2017).

Uji probiotik secara invitro umumnya dilakukan pada pH 3 (Bassyouni dkk., 2012 & Hawaz, 2014), dan selanjutnya resistensi bakteri terhadap kondisi asam tersebut dideteksi pada jam ketiga sesuai durasi lamanya makanan tersebut bertahan dalam lambung. Beberapa bakteri akan mati ketika pH medium menurun menjadi lima. Tingkat keasaman kurang dari lima akan mengganggu struktur membran sel, membran sel menjadi jenuh oleh ion hidrogen sehingga membatasi transportasi membran dan keluarnya komponen intraselular sehingga

bakteri akan mati. Selain itu, kondisi asam juga dapat menekan kolonisasi dan menyebabkan stress mikroorganismenya dalam saluran pencernaan tersebut (Hutkins & Nannen, 1993; Haitham dkk., 2017). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Staphylococcus hominis* K1A mampu hidup pada pH 3 viabilitasnya > 50 %. Oleh karena itu, *Staphylococcus hominis* K1A berpotensi sebagai kandidat probiotik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Haitham dkk. (2017) yang menyatakan bahwa persentase viabilitas isolat > 50 % pada kondisi asam dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik.



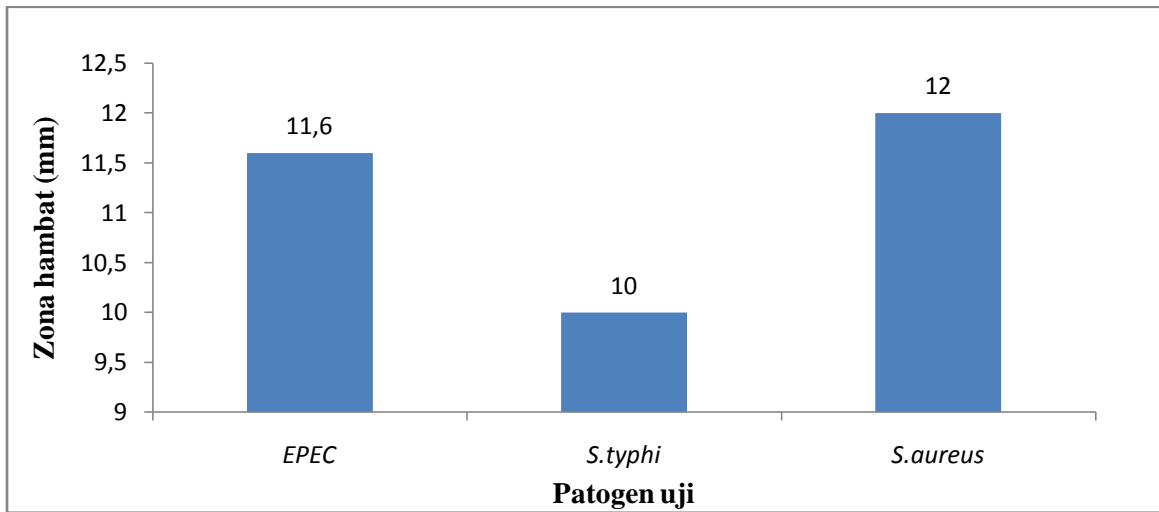
Gambar 1. Resistensi *Staphylococcus hominis* K1A pada kondisi saluran cerna secara invitro

Konsentrasi garam empedu dalam usus berkisar 0,3 % hingga 2 %, bergantung pada jenis organismenya serta jenis dan jumlah makanan yang dikonsumsi. Konsentrasi garam empedu 0,3 % merupakan nilai kritis/cukup tinggi dalam menyeleksi bakteri kandidat probiotik yang resisten terhadap garam empedu. Semakin tinggi konsentrasi garam empedu, maka jumlah bakteri yang mati juga akan meningkat. Makanan dalam usus bertahan selama empat jam (Tambekar dkk., 2009; dan Hawaz, 2014). Studi resistensi *Staphylococcus hominis* K1A terhadap garam empedu secara invitro dilakukan dengan menggunakan media cair yang mengandung *oxgall-bile* (Salah dkk., 2012). Hal ini dikarenakan kandungan *oxgall* menyerupai garam empedu manusia yang tersusun dari 70% *bile salts*, 22% *phospholipids*, 4% *cholesterol*, 3% *proteins*, dan 0.3% *bilirubin*, dan telah umum digunakan untuk menilai kemampuan toleransi garam empedu dari strain kandidat probiotik (Hu dkk., 2018).

Viabilitas isolat terhadap garam empedu telah dilakukan pada konsentrasi 0,3 %, 0,5 %, dan 1 % *oxgall-bile*. Gambar 1 menunjukkan terjadi penurunan persentase viabilitas seiring dengan meningkatnya konsentrasi *oxgall-bile*. Berdasarkan hasil pengujian maka *Staphylococcus hominis* K1A merupakan kandidat probiotik karena memiliki persentase viabilitas 50-60 % pada *oxgall* 0,3 %. Garam empedu yang disekresikan pada usus halus dapat menurunkan viabilitas bakteri. Konsentrasi garam empedu yang tinggi akan menjadi racun dan zat antimikrobia yang sangat keras, sehingga mikroorganismenya gastrointestinal harus mampu mempertahankan diri terhadap efek racun dari garam empedu. Cairan empedu di dalam usus halus bersifat menghambat pertumbuhan mikroorganismenya. Hal ini dikarenakan garam empedu dapat merusak protein, lipid dan asam lemak pada membran sel, sehingga menyebabkan sel mikroorganismenya menjadi hancur/lisis (Bezkorovainy, 2001, Begley dkk., 2002, Haitham dkk., 2017). Viabilitas bakteri terhadap garam empedu disebabkan adanya lapisan peptidoglikan dan polisakarida penyusun dinding sel lebih tebal yang dimiliki oleh bakteri Gram positif. Hal ini

menyebabkan bakteri tersebut terlindungi dari lisis ketika terdedah garam empedu. Komponen lipid (asam teichoat) pada membran bakteri Gram positif, juga dapat menjaga struktur membran dan penurunan kebocoran sel akibat garam empedu.

Staphylococcus hominis K1A menunjukkan aktivitas antimikrobia terhadap *EPEC*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* dengan daya hambat yang bervariasi ($P < 0,05$). (Gambar 12). Jena, dkk. (2013) menyatakan aktivitas antibakteri isolat dikatakan tinggi bila ≥ 15 mm, intermediate bila ≥ 12 mm dan rendah bila ≥ 6 mm. Kriteria sebagai probiotik, selain ketahanan terhadap kondisi asam dan garam empedu usus, juga harus mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen.



Gambar 2. Uji aktivitas antimikroba *Staphylococcus hominis* K1A terhadap patogen

Kesimpulan

Uji aktivitas *Staphylococcus hominis* K1A terhadap bakteri patogen, menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan *EPEC* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 134-P dan *Salmonella typhi*. Senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh bakteri tersebut mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen, hal ini merupakan salah satu persyaratan sebagai kandidat probiotik (Fuller, 1989; Navarro dkk., 2000, Marconi dkk., 2014). Aktivitas antimikrobia dengan diameter zona bening ≥ 15 mm dikategorikan tinggi, ≥ 12 mm dikategorikan intermediate, dan kurang dari ≥ 6 mm dikategorikan rendah.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada KEMENRISTEKDIKTI yang telah mendanai riset ini pada Hibah Disertasi Doktor Dengan Kontrak No: 01/PI-LP2M/STKIP-PI/V/2018.

Daftar Pustaka

Avaiyarasi, N. D., A. D. Ravindran & P. Venkatesh. 2016. In vitro Selection, Characterization and Cytotoxic Effect of Bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 Isolated From Goat Milk. *Food Control*. 69: 124 – 133.

- Banwo, K., A. Sanni & H. Tan. 2012. Technological Properties and Probiotic Potential of *Enterococcus faecium* strain Isolated from Cow Milk. *J. Appl. Microbiol.* 114: 229-241.
- Bassyouni R. H., W. S. Abdel-all, M. G. Fadl, S. Abdel-all & Z. Kamel. 2012. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products in Egypt as a Probiotic. *Life. Sci. J.* 9 (4) : 2924-33.
- Begley, M., C. G. M. Gahan & 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.
- Bezkorvainy, A. 2001. Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 399 – 405
- 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. *Am J. Clin Nutr.* 73 : 386 - 392.
- FAO/WHO. 2001 Joint Expert Consultation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Lactic Acid Bacteria
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66 (5): 365-378.
- Gropper S. S., Smith J. L., Groff J.L. 2009. Advance Nutrition and Human Metabolism Word Sworth. USA
- Haitham A. R, H. Zaiton, A. S. Norrakiah & F. N. Huda. 2017. Assessment of Potential Probiotic Properties Lactic Acid Bacteria from Shrimp Paste or Belacan. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Technol.* 5 (1) : 90-8.
- Handa, S. & N. Sharma. 2016. In Vitro Study of Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* F22 Isolated from Chang-A Tradisional Fermented Beverage of Himachal Pradesh, India. *J. Gen. Engin. Biotechnol.* 14 : 91-97.
- Hawaz, E. 2014. Isolation and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria From Curd and In vitro Evaluation of its Growth Inhibition Activities Against Pathogenic Bacteria. *Afr. J. Microbiol.* 8(3) : 1419-1425.
- Hosseini, S.V., S. Arlindo, K. Bohme, C. N. Fernandez, P. M. Calo & J. B.Velazquez. 2009. Molecular and Probiotic Characterization of Bacteriocin Producing *Enterococcus faecium* strains Isolated From Nonfermented Animal Foods. *J. Appl. Microbiol.* 107 : 1392-1403.
- Hu, P., Y. Yuan, T. Yue & C. Guo. 2018. Bile Acid Patterns in Commercially Available Oxgall Powders Used For The Evaluation Of The Bile Tolerance Ability Of Potential Probiotics. *Plos One.* 1-11.
- Hutkins, R.W. & Nannen, N.L. 1993. **pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. Faculty Publications in Food Science and Technology.** Paper 28.
- Jamaly N., A. Benjouad & M. Bouksaim. 2011. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products. *British Microbiol. Res. J.* 1(4) : 79-94.

- Jena, P. K., D. Trivedi, K. Thakore, H. Chaudhary & S. S. Giri. 2013. Isolation and Characterization of Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated From Rat Fecal Microbiota. *Microbiol Immunol.* 57 : 407-416.
- Lertcanawanichakul, M. & S. Sawangnop. 2008. A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. *Walailak J. Sci & Tech.* 5(2): 161-171.
- Lee, H. K., Sun H. C., Cho R. L, Sun H. L., Mi R. P., Younghoon K., Myung-ki L & Geun B. K. 2015. Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with Anti-Inflammatory Activities Through in Vitro and *Caenorhabditis Elegans* Model Testing. *Korean J. Food Sci. An.* 35 (1) 91-100.
- Mansour, N. M., H. Heine, S. M. Abdou, M. E. Shenana, M. K. Zakaria & A. E. Diwany. 2014. Isolation of *Enterococcus faecium* NM113, *Enterococcus faecium* NM213 and *Lactobacillus casei* NM512 as Novel Probiotics with Immunomodulatory Properties. *Microbiol. Immunol.* 58 : 559-569.
- Marconi, A., G. Kallapura, J. D. Latorre, M. J. Morgan, N. R. Pumford, B. M. Hargis & G. Tellez. 2014. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria in a Commercial Probiotic Culture. *Biosc. Microb Food & Health.* 33 (1) : 25 – 30.
- Maqsood, S., F. Hasan, T. Masud, S. Sammi & S. M. S. Naqvi. 2013. In Vitro Pre-Selection Criteria For Probiotic *Lactobacillus Acidophilus* Ts1 Isolated from Fermented Milk Product, Dahi. *Malay. J. Microbiol.* 9 (4): 236-330.
- Mourad K. & Karam N. E. 2006. In Vitro Preselection Criteria For Probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of Fermented Olives Origin. *Int. J. Prob & Preb.* 1 (1) : 27-32.
- Navarro, L., M. Zarazaqa, J. S. Aenz, F. R. Larrea & C. Torres. 2000. Bacteriocin Production by LAB Isolated From Rioja Red Wines. *J. Appl Microbiol.* 88 (1) : 44-51.
- NCCLS. 1998. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Villanova, PA : *National Committee for Clinical Laboratory Standard*
- NCCLS (2002) Analysis and Presentation of Cumulative Susceptibility Test Data. Approved Guideline. NCCLS document, M39-A.
- Oluwajoba, S. O., Felix A. K. & Victor O. O. 2013. In Vitro Screening and Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated From Spontaneously Fermenting Kunu-Zaki. *AIM.* 3 : 309-316.
- Parvez, S., K. A. Malik, S. A. Kang & H. Y. Kim. 2006. Review Article : Probiotics and Their Fermented Food Products are Beneficial For Health. *J. Appl. Microbiol.* 100 (6) : 1171 - 1185.
- Rizqiati, H., C. Sumantri, R. R. Noor, E. Damayanti & E. I. Rianti. 2015. Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria From North Sumatra River Buffalo Milk. *JITV.* 20 (2) : 87 - 94.

- Salah, R. B., I. Trabelsi, R. B. Mansour, S. Lassoued, H. Chouayekh & S. Bejar. 2012. "A New *Lactobacillus Plantarum* Strain, TN8, From The Gastro Intestinal Tract Of Poultry Induces High Cytokine Production". *Anaerobe*. 18. (4): 436-44.
- Sanders, M. E. 2006. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *J. Clin. Gastroenterol.* 40:776 - 83.
- Sharma, S., N. Agarwal & P. Verma. 2012. Probiotics : The Emissaries of Health From Microbial Word. *J. Appl.Pharm. Sci.* 2 (1) : 138 – 143
- Sun, C., B. G. Kim, S. Kim, H. S. Joo & P. I. Kim. 2010. Probiotic Potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2-9 as Anti- *Staphylococcus aureus* agent Isolated From the Vaginal Microbiota of a Healthy Woman. *J. Appl. Microbiol.* 108 : 908 - 918
- Tambekar D. H., S. A. Bhutada, S. D. Choudhary & M. D. Khond. 2009. Assessment of Potential Probiotic Bacteria Isolated from Milk of Domestic Animals. *J. Appl. Biosci.* 15:815-9.
- Toma, M. M. & J. Pokrotnieks. 2006. Probiotic as Functional Food : Microbiological and Medical Aspect. *Acta Univ. Latviensis.* 710 : 117 - 129.