

KETAHANAN DAN VIABILITAS PROBIOTIK BAKTERI ASAM LAKTAT SELAMA PROSES PEMBUATAN KULTUR KERING DENGAN METODE FREEZE DAN SPRAY DRYING

[Survival and Viability of Lactic Acid Bacteria Probiotic during Production of Dried Culture Using Freeze and Spray Drying Methods]

Erni Harmayani ¹⁾, Ngatirah ²⁾, Endang S. Rahayu ¹⁾, dan Tyas Utami ¹⁾

¹ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

² Alumnus Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Pasca Sarjana UGM

ABSTRACT

Selection on 36 lactic acid bacteria isolated from various source (dadih, sausage, infant feces, gato, chinese leaf pickle, growol and yoghurt) has been carried out based on their potency to reduce cholesterol. Based on their ability to assimilate cholesterol, conjugate bile salt, restency on bile salt and low pH, three isolates i.e. *Lactobacillus* sp. Dad 13, *L. acidophilus* D2 and *L. plantarum* Mut 7 have been chosen for further study. Viability of selected cultures during biomass production using coconut water with addition of 0.5% yeast extract, and during production of dried starter culture using freeze and spray dried were investigated. The results show that the growth pattern of the three isolates selected were almost similar i.e. reaching maximum amount after 16 hrs fermentation at 37°C. Biomass production using coconut water produced 10⁹ cfu/ml after 16-18 hrs incubation at 37°C. Decrease on viability after drying using freeze drier ranged between 0.5-2 log cycles, while that of storage of freeze dried culture during 4 weeks at -20°C caused decreasing in viability of 26-56%.

Key words : lactic acid bacteria, viability, and probiotic

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) memiliki peranan penting kehidupan manusia, baik melalui keterlibatannya pada fermentasi makanan maupun kemampuannya tumbuh pada jalur intestin. Pada fermentasi makanan selain memberikan rasa khas, bakteri ini juga memperpanjang daya awet karena kemampuannya menghasilkan produk metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan bakteri patogen.

Beberapa strain BAL berpotensi sebagai agensia probiotik misalnya : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* karena kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik. *Bifidobacterium*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* mempunyai kelebihan karena bakteri-bakteri ini mampu tumbuh dalam jalur pencernaan (Drasar dan Barrow, 1985). Saat ini istilah probiotik lebih diartikan sebagai konsumsi mikrobia hidup sebagai aditif makanan untuk meningkatkan kesehatan.

Pada dasarnya konsumsi sel bakteri hidup dapat diperoleh dari tiga sumber yaitu : 1) produk-produk susu fermentasi, seperti yogurt yang mengandung sel *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* serta susu *acidophilus* yang mengandung *L. acidophilus*; 2) sebagai suplementasi makanan dan minuman dengan satu, dua atau beberapa macam mikrobia yang bermanfaat seperti *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei* dan

Bifidobacterium; dan 3) sebagai produk pharmaceutical yaitu konsentrat sel dalam bentuk tablet, kapsul atau granula (Ray, 1996).

Penelitian-penelitian pada tahun-tahun terakhir banyak difokuskan pada penggunaan BAL sebagai probiotik (Gilliland, 1990). Seleksi mikrobia khususnya BAL sangat diperlukan untuk mendapatkan strain-strain probiotik yang unggul. Menurut Havenaar dan Veld, (1992) untuk mengembangkan strain probiotik baru, perlu dilakukan skrining atau seleksi secara in vitro yang meliputi: kondisi kultur dan viabilitas strain probiotik selama prosesing dan penyimpanan, sensitivitas terhadap pH rendah, cairan lambung, asam empedu, pankreas dan dapat menekan pertumbuhan mikrobia patogen lain. Dalam penelitian sebelumnya di laboratorium kami telah dilakukan skrining bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol (Ngatirah et al., 2000). Pada penelitian ini dilakukan pengujian ketahanan dan viabilitas sel BAL terpilih dalam proses pembuatan kultur kering.

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari pola pertumbuhan isolat-isolat bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik dan menguji viabilitas selnya selama proses produksi dan pengeringan sel menggunakan freeze dryer (pengering beku) dan spray dryer (pengering semprot).

METODOLOGI

Strain Bakteri

Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga isolat potensial hasil skrining dari 36 isolat bakteri dari berbagai sumber pada penelitian sebelumnya (Ngatirah et al., 2000) yaitu : *Lactobacillus* sp Dad 13 yang berasal dari dadih *Lactobacillus acidophilus* D2 dari feses bayi dan *Lactobacillus plantarium* Mut 7 : dari gatot dan isolat yogurt *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* sebagai pembanding. Isolat-isolat yang digunakan berasal dari FNCC PAU Pangan dan Gizi UGM. Kultur stock disimpan dalam tabung *cryoval* yang berisi gliserol-skim (1:1,v/v) dan dibekukan pada -40°C . Subkultur dilakukan selama 1-2 minggu ditumbuhkan pada media MRS cair.

Media

Media yang digunakan dalam penelitian antara lain MRS cair, MRS agar, air kelapa, ekstrak kamir, pepton buffer, glukosa.

Alur Penelitian

Dalam penelitian ini dipelajari pola pertumbuhan masing-masing kultur untuk mengetahui waktu panen yaitu waktu inkubasi pada saat kultur mencapai pertumbuhan maksimum (fase logaritmik akhir). Selanjutnya dipelajari viabilitas sel selama produksi biomassa dan pembuatan kultur kering.

Pola Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara menginokulasikan masing-masing kultur berumur 24 jam pada media MRS cair dan diinkubasikan selama 24 jam pada 37°C . Pada awal inkubasi (jam ke-0) dan setiap 2 jam sekali dilakukan perhitungan jumlah bakteri dan pH sampai jam ke-24.

Produksi Biomassa dan Pengujian Viabilitas Sel Selama Freeze Drying dan Spray Drying

Biomassa bakteri asam laktat yang akan dibuat kultur kering diproduksi dengan menggunakan media air kelapa dan 0.5% ekstrak kamir. Pada saat pembuatan starter, media ini masih perlu penambahan 0.5% glukosa untuk mendorong pertumbuhan kultur pada saat pertumbuhan inokulum. Sebelum digunakan ekstrak kamir ini disterilisasi 121°C selama 15 menit. Selanjutnya digunakan untuk produksi biomassa. Diagram alir proses produksi biomassa dan pembuatan kultur kering dengan metode *freeze drying* dan *spray drying* dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

Pengujian viabilitas sel pada setiap tahapan proses (baik kering beku maupun kering semprot) dilakukan pada media MRS agar dengan metoda *surface plating* dengan

beberapa seri pengenceran. Pada kultur kering yang sudah jadi, pengenceran terlebih dahulu dilakukan dengan menimbang 0,1 g kultur kering secara aseptis, dimasukkan ke dalam 0,9 ml aquades steril (pengenceran 10^{-1}), selanjutnya dibuat seri pengenceran tertentu sehingga jumlah bakteri dapat dihitung. Sel kering hasil pengeringan dengan metode *drying* disimpan pada suhu -20°C selama 4 minggu untuk diuji viabilitasnya. Percobaan dilakukan dalam dua batch.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola Pertumbuhan

Ketiga isolat potensial (*Lactobacillus* sp. Dad 13, *L. acidophilus* D2, *L. plantarium* Mut 7) sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol mempunyai pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 3). Pada jam ke 0 (awal inkubasi) jumlah selnya berkisar antara $1,9 - 5,2 \times 10^7$ CFU/ml. Sedangkan jumlah sel isolat yogurt sebesar $8,9 \times 10^6$ CFU untuk *L. bulgaricus* dan $1,3 \times 10^7$ CFU/ml untuk *S. thermophilus*. Semua isolat memasuki fase logaritmik akhir (awal fase stasioner) pada jam ke-16-18 inkubasi. Sedangkan delapan jam pertama inkubasi masing-masing isolat memasuki fase logaritmik dimana masing-masing memiliki waktu generasi dan kecepatan pertumbuhan yang spesifik. Fase logaritmik berlangsung dari jam ke-2 sampai jam ke-16. Berdasarkan pola pertumbuhan dapat diketahui bahwa isolat *L. plantarium* Mut 7 memiliki kecepatan pertumbuhan yang paling tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain diikuti isolat *L. acidophilus* D2, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* dan *Lactobacillus* sp. Dad 13. Dari kurva pertumbuhan tersebut dapat ditentukan waktu panen untuk produksi biomassa yaitu sekitar jam ke-16-18 inkubasi (saat memasuki awal stasioner).

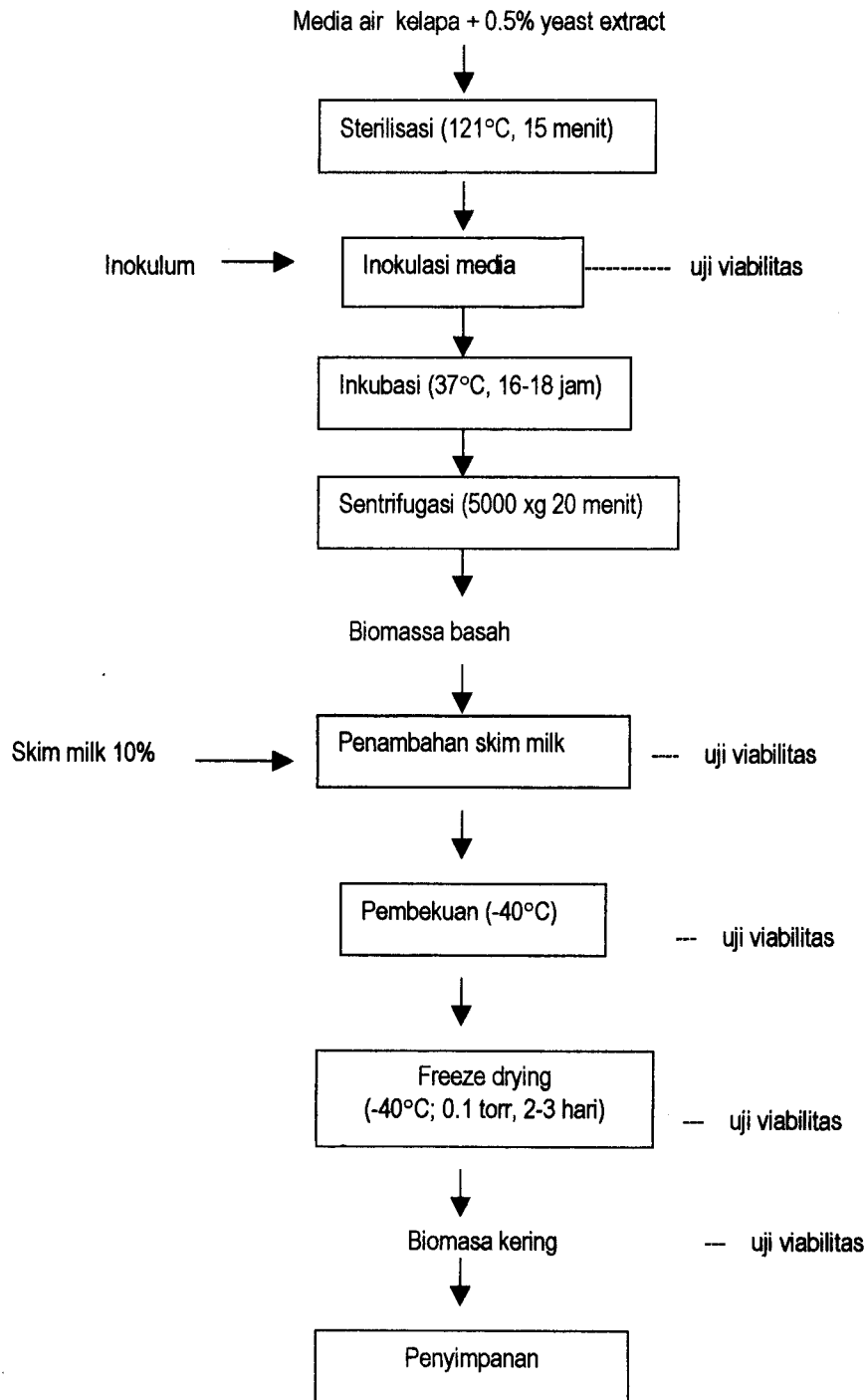
Selama pertumbuhan terjadi penurunan pH media yang tidak berbeda nyata untuk kelima isolat (Gambar 4). Nilai pH pada awal inkubasi berkisar antara 6,7-6,8. Setelah akhir inkubasi (24 jam) turun menjadi 3,7-3,8. Penurunan pH media disebabkan adanya produksi asam laktat yang dihasilkan selama pertumbuhan. Asam laktat yang diproduksi merupakan hasil dari pemecahan glukosa melalui jalur glikolisis untuk bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*) dan melalui jalur 6 phosphoglukonat/phosphoketolase (6-PG/PK) untuk bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif (*L. plantarium*) (Axelsson, 1998).

Ketahanan dan Viabilitas Selama Produksi Biomassa dan Pembuatan Kultur Kering dengan Metoda Freeze Drying

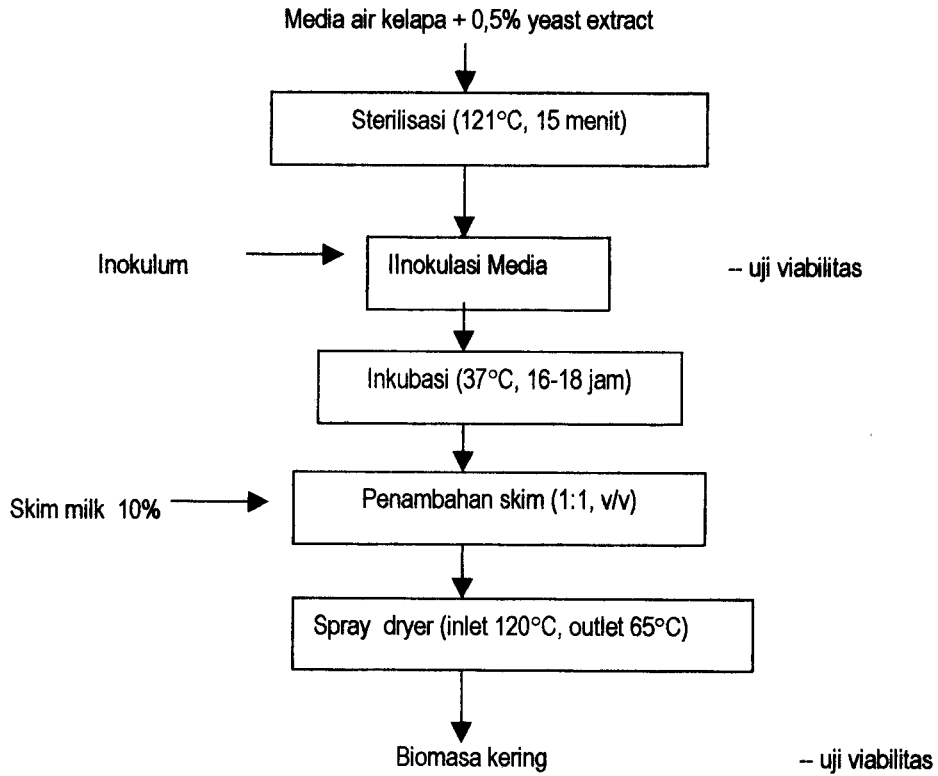
Untuk produksi biomassa diperlukan media yang murah dan tersedia. Dalam penelitian ini digunakan

medium air kelapa yang ditambah ekstrak kamir. Medium ini dianggap mampu menggantikan media sintetik yang lebih mahal. Hasil pengujian viabilitas selama proses

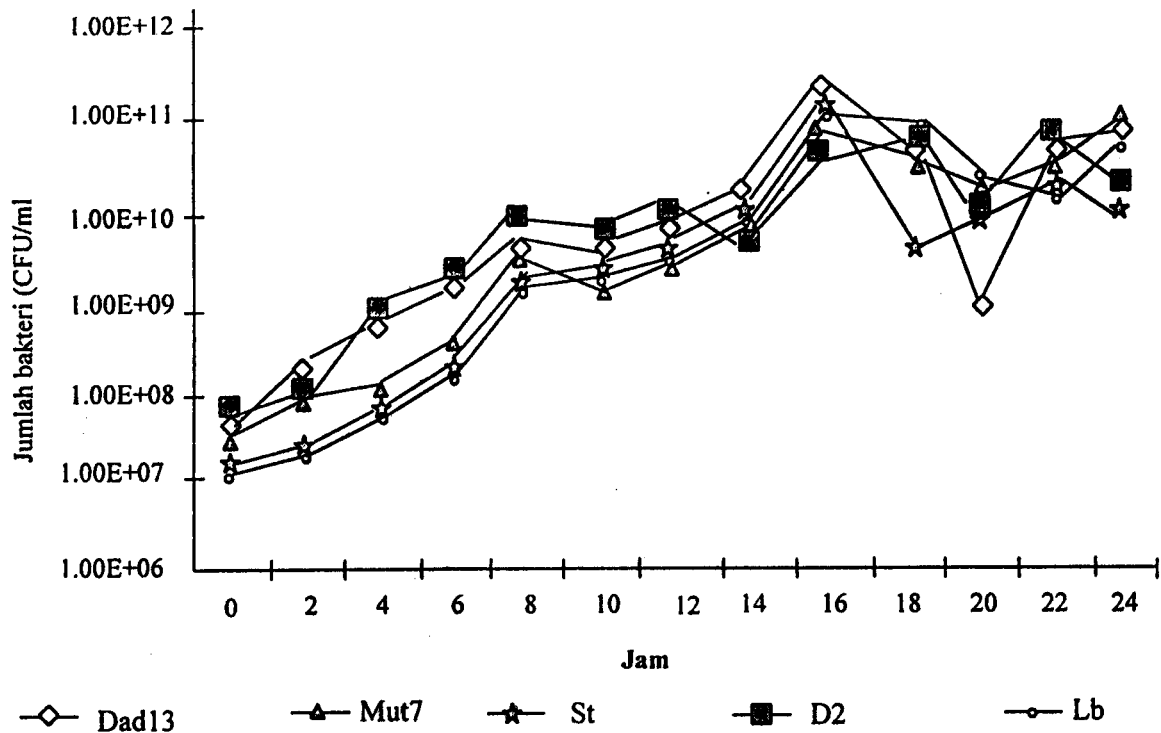
produksi biomasa dan pembuatan kultur kering, dapat dilihat pada Tabel 1.



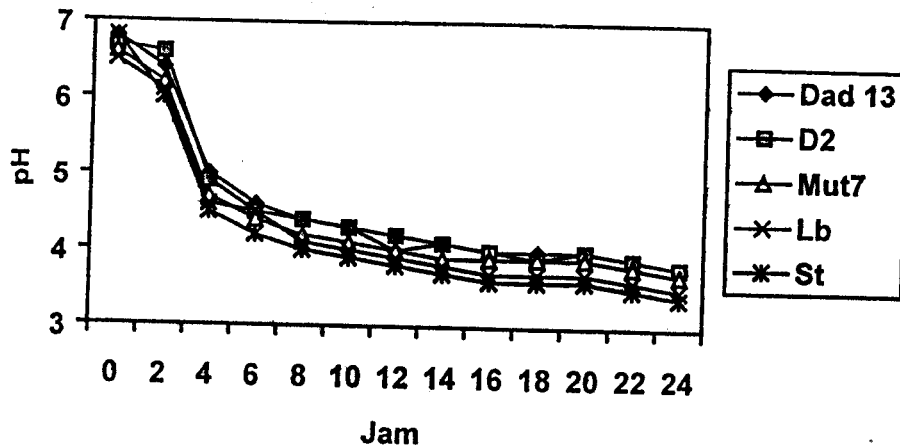
Gambar 1. Diagram alir proses produksi biomasa dan pembuatan kultur kering dengan metoda kering beku



Gambar 2. Diagram alir proses produksi biomasa dan pembuatan kultur kering dengan metoda *spray drying*



Gambar 3. Pola Pertumbuhan Isolat terpilih pada media MRS, inkubasi pada 37°C selama 24 jam



Gambar 4. Perubahan pH selama pertumbuhan

Tabel 1. Ketahanan dan viabilitas isolat bakteri asam laktat selama produksi biomasa dan pertumbuhan kultur kering menggunakan freeze drying

Isolat	Sumber	Jumlah sel Selama Produksi Biomasa *) (CFU/500mL)		Jumlah Sel Selama Pembuatan Kultur kering **)		
		Awal	Akhir	Sebelum pembekuan (CFU/ml)	Setelah Pembekuan (CFU/ml)	Setelah Kering-beku (CFU/g)
<i>Lactobacillus</i> sp. Dad 13	Dadih	$1,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{13}$	$4,9 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{11}$
<i>L. acidophilus</i> D2	Feses bayi	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$	$8,9 \times 10^{12}$	$1,8 \times 10^{11}$	$9,4 \times 10^{10}$
<i>L. plantarium</i>	Gatot	$1,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^9$	$9,2 \times 10^{10}$
<i>L. bulgaricus</i>	Yogurt	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$3,3 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$
<i>L. bulgaricus</i>	Yogurt	$9,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$7,7 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^{11}$	$7,7 \times 10^{10}$

Keterangan :

- *) Produksi dilakukan pada media air kelapa dengan starter 10%, inkubasi 16-18 jam pada 37°C dengan volume 500 ml
- ***) Dari 15 g biomasa dan skim, setelah pengeringan menjadi 1 gram kultur kering.

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa jumlah sel awal untuk produksi biomasa berkisar antara $9,4 \times 10^7$ sampai $1,4 \times 10^8$ CFU/ml. Setelah dipanen sel mengalami kenaikan sekitar 1 siklus log menjadi $1,3 \times 10^9$ sampai $1,6 \times 10^9$ CFU/ml. Hasil produksi ini lebih rendah dibanding produksi menggunakan media MRS karena media MRS mengandung nutrisi yang lebih lengkap dibanding air kelapa. Pemanenan sel dengan menggunakan sentrifugasi selama 20 menit mampu memisahkan sel dari medium pertumbuhannya dan meningkatkan jumlah sel sekitar 2-4 siklus log. Setelah mengalami pembekuan semalam (-40°C), jumlah sel mengalami penurunan menjadi $1,4 \times 10^{11}$ atau turun sekitar 2 siklus log. Pada saat pengeringan beku menggunakan freeze dryer penurunan sel juga terjadi dari kelima isolat jumlah sel turun antara 0,5-2 siklus log.

Dari proses freeze drying ternyata penurunan terbesar diakibatkan oleh adanya pembekuan (-40°C), pengurangan tersebut mungkin terjadi pada tahap pendinginan sel dan medium untuk mencapai titik pembekuan, pembentukan es intra dan ekstra seluler, meningkatnya konsentrasi solut, lama penyimpanan dan thawing (Johnson dan Etzel, 1995). Selain itu penurunan viabilitas sel selama proses freeze drying juga diakibatkan oleh pengurangan air dalam proses pengeringan. Adanya proses pembekuan menyebabkan sel kehilangan kestabilannya, sehingga menjadi lebih mudah rusak selama pengeringan (Johnson dan Etzel, 1995). Hilangnya kestabilan sel selama pembekuan disebabkan karena pemanenan biomasa dilakukan di akhir fase logaritmik sehingga pellet yang dihasilkan kurang kental (Brashears dan Gilliland, 1995). Untuk meningkatkan kestabilan sel selama pembekuan lebih menguntungkan jika sel dipanen

pada fase stasioner, dimana telah terjadi pembentukan bahan- bahan penyelubung sel (Brashears dan Gilliland, 1995).

Penelitian Valdez et al. (1997) mendapatkan penurunan viabilitas 1-2 siklus log untuk isolat *L. reuteri* CRL 110 dengan medium pensuspensi aquades dan hanya mengalami penurunan sedikit (<0,5 siklus log) untuk media pensuspensi 10% sodium glutamat, hal ini membuktikan bahwa sodium glutamat mampu berperan sebagai

protektan yang kuat. Pada penelitian ini menggunakan skim milk sebagai media pengisi dengan hasil penurunan jumlah sel sekitar 0,5-2 siklus log. Hasil penelitian viabilitas bakteri asam laktat ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian Valdez et al. (1983) dengan isolat *L. plantarum* ATCC 8014 dan *L. casei* dengan medium pengisi (*filter*) yang sama yaitu skim. Pengaruh penyimpanan kultur kering pada suhu -20°C, selama 1 dan 4 minggu disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh penyimpanan kultur kering pada suhu -20°C selama 4 minggu

Isolat	Lama Penyimpanan		Penurunan viabilitas (siklus log)
	1 minggu (CFU/g)	4 minggu (CFU/g)	
<i>Lactobacillus</i> sp Dad 13	1,6x10 ¹¹	9,2x10 ¹⁰	0,55 (44,2%)
<i>L. acidophilus</i> D2	7,0x10 ¹⁰	5,2x10 ¹⁰	0,13 (26,0%)
<i>L. plantarum</i> Mut 7	9,4x10 ¹⁰	4,1x10 ¹⁰	0,36 (56,4%)
<i>L. bulgaricus</i>	1,5x10 ¹¹	7,0x10 ¹⁰	0,32 (52,7%)
<i>S.thermophilus</i>	8,2 x 10 ¹⁰	4,9x10 ¹⁰	0,22 (40,2%)

Dari Tabel 2 terlihat bahwa setelah mengalami penyimpanan 4 minggu pada suhu -20°C, viabilitas kultur kering yang telah didapatkan dari proses *freeze drying* mengalami penurunan sebesar 26,0%-56,4%. Jumlah penurunan terendah dicapai oleh isolat D2, sedangkan isolat lain penurunannya hampir sama.

Ketahanan dan Viabilitas Selama Produksi Biomasa dan Pembuatan Kultur Kering dengan Metoda *Spray Drying*

Hasil pengujian viabilitas sel selama produksi biomasa dan pembuatan kultur kering dengan metoda *spray drying* dapat dilihat Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh penyimpanan kultur kering pada suhu -20°C selama 4 minggu

Isolat	Jumlah sel selama produksi biomasa (CFU/ml)		Jumlah sel selama pembuatan kultur kering	
	Awal	Akhir	Sebelum <i>spray drying</i> (CFU/250ml)	Setelah <i>spray drying</i> (CFU/g)
<i>Lactobacillus</i> sp Dad 13	9,0x10 ⁷	1,5x10 ⁹	2,0x10 ¹¹	6,8x10 ⁸
<i>L. acidophilus</i> D2	1,5x10 ⁸	9,4x10 ⁸	1,4x10 ¹²	1,7x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> Mut 7	7,5x10 ⁷	1,3x10 ⁹	2,2x10 ¹¹	7,3x10 ⁷
<i>L. bulgaricus</i>	7,7x10 ⁷	1,7x10 ⁹	3,7x10 ¹⁰	3,3x10 ⁷
<i>S.thermophilus</i>	5,5 x 10 ⁷	8,4x10 ⁸	2,9x10 ¹¹	6,9x10 ⁷

Jumlah sel pada awal produksi berkisar antara 5,5 x 10⁷ sampai 1,5 x 10⁸ CFU/ml. Pada akhir fermentasi jumlah biomasa sel meningkat sekitar satu siklus log menjadi sekitar 8,4x10⁸ sampai 1,7x10⁹ CFU/ml. Jumlah sel sebelum *spray drying* setelah penambahan skim milk menjadi sekitar 3,7x10¹⁰ sampai 1,4x10¹² CFU/ml. Setelah dilakukan pengeringan dengan *spray drying* terjadi penurunan jumlah sel menjadi sekitar 1,7x10⁷ sampai 6,9x10⁸ CFU/g bahan atau turun sekitar 2,5-4 siklus log.

Penurunan jumlah sel selama *spray drying* dapat disebabkan oleh adanya dehidrasi (penurunan Aw) dan inaktivasi panas (Johnson dan Etzel, 1997). Hasil penelitian Teixeira et al. (1995) menunjukkan bahwa sel bakteri *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* menurun viabilitasnya setelah *spray drying* dengan temperature inlet dan outlet berturut-turut 200 dan 70°C. Selama penyimpanan pada beberapa temperature ternyata viabilitasnya semakin menurun, jika disimpan pada suhu 15 dan 20°C selama 60 hari (turun

sekitar 4 siklus log)., sedangkan pada penyimpanan suhu 4 dan 8°C viabilitasnya turun sekitar 2 siklus log.

Menurut Teixeira et al. (1995) hilangnya viabilitas sel selama *spray drying* juga berhubungan dengan kerusakan komponen sel, membran sel, dinding sel dan DNA. Sedangkan menurut Fu dan Etzel (1995) mekanisme kerusakan seluler selama *spray drying* dapat diakibatkan oleh pemanasan dalam atomizer, dehidrasi sel dan inaktivasi panas. Jonhson dan Etzel (1995) juga mendapatkan penurunan viabilitas karena proses *spray drying* lebih besar dibandingkan *freeze drying* dan *freezing*. Pada *L. helveticus* ketahanan hidup sel sekitar 15% untuk proses *spray drying* pada suhu rendah dan 0.08% untuk *spray drying* pada suhu tinggi (120°C). Sedangkan pada penelitian ini diperoleh ketahanan hidup sel turun sekitar 2,5-4 siklus log. Ketahanan hidup sel terhadap berbagai kondisi proses dipengaruhi oleh strain mikroorganisme, kondisi pertumbuhan, umur kultur, media pensuspensi, dan kondisi proses.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pola pertumbuhan ketiga isolat potensial sebagai agensia probiotik yaitu *Lactobacillus* sp. Dad 13, *L. acidophilus* D2, dan *L. plantarum* Mut 7 serta isolat pembanding *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* relatif sama, mencapai fase logaritmik akhir pada jam ke-16 sampai 18 inkubasi. Penurunan viabilitas sel pada pembuatan kultur kering dengan *freeze drying* berkisar 0,5 sampai 2 siklus log, sedangkan dengan *spray drying* berkisar antara 2,5-4 siklus log. Viabilitas sel kultur kering yang diperoleh secara *freeze drying* lebih tinggi sekitar 3 siklus log dibanding kultur yang diperoleh dengan *spray drying*. Viabilitas kultur kering hasil *freeze drying* selama 4 minggu pada suhu -20°C hanya sedikit mengalami penurunan. Perlu dilakukan studi lanjutan untuk mengetahui kemampuan berbagai bahan pensuspensi untuk melindungi sel dari kerusakan selama proses pembuatan kultur kering.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Proyek Hibah Bersaing Perguruan Tinggi (HB IX) yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi untuk diucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S and A. Wright (eds) Marcel Dekker Inc. New York.
- Brashears, M.M. dan S.E. Gilliland, 1995. Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by their growth phase. J. Dairy Sci. 78:232326-2335
- Drassar, B.S. dan Barrow, P. A. 1985. Intestinal Microbiology. Am. Soc. For Microbiol. Washington.
- Fu, W.Y. dan M.R. Etzel. 1995. Spray drying of *Lactococcus lactis* sp. *Lactis* C25 on cellular injury. J. Food Sci 60 (1); 195-200.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Review, 87, 175.
- Havenaar, R. dan Huijs in't Veld, 1992. Probiotic: A general View. In: The Lactic Acid Bacteria. B.J.B Wood (ed). Elsevier Applied Science London.
- Jonhson, J.A.C dan M.R. Etzel. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze drying of freezing. J. Dairy Sci. 78: 761-768.
- Ngatirah, Harmayani, R. Rahayu, E.S. dan Utami, T. 2000. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan., Surabaya 10-11 Oktober 2000
- Ray, B. 1996. Fundamental Food Microbiology. CRC. Press. Inc. London
- Teixeria, P.C., M.H. Castro, F.X. Malcata dan R.M. Kirby. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* following *dry drying*. J. Dairy Sci. 78: 105-1031.
- Valdez, G.T., G. Martoz, M.P. Taranto, G.L. Lorca, G. Oliver dan A.P. De Ruiz Holgado. 1997. Influence of bile on β -galactosidase activity and cell viability of *Lactobacillus reuteri* when subjected to *freee drying*. J. dairy Sci. 80: 19955-1958
- Valdez, G.T., G.S. De Giori, A.P. De Ruiz Holgado dan G. Oliver. 1985. Effect of rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 50(3): 1339-1341. 1.