

The Effect of Administration of *Lactobacillus* Probiotics on Secretoric Immunoglobulin A (s-IgA) Levels in Female Wistar Post Ovariectomy

Rani Safitri^{1*}, Tut Rayani Aksohini Wijayanti²

¹Sarjana Kebidanan dan Profesi Bidan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Institut Teknologi dan Sains Kesehatan RS dr. Soepraoen Kesdam V/BRW, Malang

²Sarjana Kebidanan dan Profesi Bidan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Institut Teknologi dan Sains Kesehatan RS dr. Soepraoen Kesdam V/BRW, Malang

*Corresponding author: rani@itsk-soepraoen.ac.id

ABSTRACT

Ovariectomy is a commonly performed medical procedure to investigate the effects of estrogen loss on the immune system. Secretory immunoglobulin A (s-IgA) is an antibody that is important in mucosal defense system. Probiotics, such as *Lactobacillus*, have been known to affect the local immune system. This study aims to evaluate the effect of administering *Lactobacillus* probiotics on s-IgA levels in Wistar rats undergoing ovariectomy. Female Wistar rats ($n=30$) were randomly divided into two groups, namely the treatment group (receiving *Lactobacillus* probiotics) and the control group (receiving placebo). After undergoing an ovariectomy, treatment was given for 4 weeks. After the treatment period, s-IgA levels were evaluated using the ELISA technique in mouse saliva samples. The results showed that the treatment group receiving *Lactobacillus* probiotics had significantly higher s-IgA levels than the control group ($p < 0.05$). Administration of *Lactobacillus* probiotics can increase s-IgA levels in Wistar rats undergoing ovariectomy. This shows the potential of probiotics in enhancing mucosal immune responses in conditions associated with estrogen deficiency.

Keywords: *Lactobacillus casei*, post ovariectomy, secretory immunoglobulin A, Wistar rats

PENDAHULUAN

Menopause adalah kondisi dari seorang wanita yang tidak haid selama 12 bulan, kadar FSH darah >40 IU/ml dan kadar estradiol <30 pg/m (Megawanti, 2014). Menopause disebut juga masa peralihan dari masa produktif perlahan-lahan menuju masa non-produktif yang disebabkan oleh berkurangnya hormon estrogen dan progesteron akibat penurunan fungsi dari ovarium (Farisin dan Kumaat, 2018).

Probiotik *Lactobacillus casei* yang diubah menjadi asam laktat mampu menstimulasi sistem imun dengan adanya senyawa peptidoglikan dan lipopolisakarida dalam dinding sel. Berdasarkan penelitian bahwa produksi IgA akan meningkat jika mendapatkan bakteri asam laktat. Produksi IgA kemudian diekskresikan ke lumen usus untuk mencegah penempelan mikroorganisme patogen (Tsamrotul dan Adah, 2019).

Spesies mikrobakteri yang mendiami vagina berjumlah 50 dibanding 800 jenis yang mendiami usus. Meskipun vagina dekat dengan anus, mikrobakteri berbeda yang hadir dalam vagina lebih sedikit daripada di saluran pencernaan. Flora mikrobakteri pre- menopause secara umum didominasi oleh spesies *Lactobacillus*, biasanya adalah *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* and *L. jenesenii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, dan *L. rhamnosus* (Mardiah, 2013).

Dalam sistem imun mukosa, kehadiran mikroorganisme probiotik menyebabkan sistem imun seluler menjadi teraktivasi dengan meningkatnya produksi Ig A. Limfosit yang teraktivasi menghasilkan sel T dan sitokin sehingga terjadi sintesis Ig A (Ni'mah, 2019). *Lactobacillus casei* strain Shirota dapat meningkatkan sistem imun tanpa stimulus mitogen. Terutama sel T limfosit sitotoksik (sel T CD8⁺), melalui

induksi *sitokin pro inflammatory* dapat ketahui efek *L. casei strain Shirota* berpotensi menghancurkan infeksi sel di dalam tubuh (Chee *et al.* 2020). Beberapa penelitian tentang probiotik *L. casei strain shirota* meningkatkan aktivitas sel NK. Peningkatan aktivitas sel NK *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) manusia distimulus oleh *L. casei strain shirota* dalam *in vitro* (Anindita *et al.* 2022).

IgA terdiri atas dua sub-kelas yaitu IgA1 (93%) dan IgA2 (7%). Bila produksi IgA pada permukaan mukosa diperhitungkan, maka IgA merupakan Ig terbanyak. Reseptor dengan afinitas tinggi untuk kelas IgA ditemukan pada makrofag dan sel PMN yang berberan dalam fagositosis (Marga, 2015).

Air susu ibu mengandung s-IgA, laktoferin, transferin, lisozim, lipid *Lactobacillus* promoting factor, fagosit, dan limfosit yang berperan dalam meningkatkan imunitas neonatus (Reid dan Burton, 2002). Fungsi IgA antara lain s-IgA melindungi tubuh dari patogen karena dapat bereaksi dengan molekul adhesi dari patogen potensial sehingga mencegah adherens dan kolonisasi patogen tersebut dalam sel pejamu, IgA dapat bekerja sebagai opsonin, oleh karena neutrofil, monosit, dan makrofag memiliki reseptor untuk Fc α (Fc α -R) sehingga dapat meningkatkan efek bakteriolitik komplemen dan menetralisasi toksin. Selain itu, IgA diduga juga berperan pada imunitas cacing pita, IgA dalam serum maupun dalam sekresi dapat menetralkan toksin atau virus dan mencegah terjadinya kontak antara toksin atau virus dengan sel alat sasaran. IgA dalam serum juga dapat mengaglutinasikan kuman, mengganggu motilitasnya sehingga memudahkan fagositosis (opsonisasi) oleh sel polimorfonuklear. Selanjutnya IgA juga dapat mengaktifkan komplemen melalui jalur alternatif, tidak seperti halnya dengan IgG dan IgM yang dapat mengaktifkan

komplemen melalui jalur klasik. IgA sekretori (S-IgA) dalam bentuk polimerik menjadi stabil oleh ikatan polipeptida rantai J (Claesson *et al.* 2007).

IgA dengan berat molekul 165.000 Dalton ditemukan dalam serum dengan jumlah sedikit. Kadar terbanyak ditemukan dalam cairan sekresi saluran nafas, cerna dan kemih, air mata, keringat, ludah, dan dalam air susu ibu yang lebih berupa IgA sekretori (sIgA) yang merupakan bagian terbanyak (Nowroozi *et al.* 2004).

Produksi imunoglobulin sekretorik A (sIgA) merupakan komponen efektor terbaik yang dihasilkan oleh mukosa usus. Dalam kerjasamanya dengan faktor imun innate (bawaan), seperti mukus IgA dalam lumen usus akan mencapai “imun eksklusif” berfungsi untuk melindungi permukaan mukosa (Kato-Kataoka *et al.* 2016).

IgA memiliki fungsi utama sebagai inhibitor terhadap bakteri atau virus yang akan menempel pada sel epitel saluran cerna. Fungsi lainnya adalah mengaglutinasi antigen dengan cara memperangkap antigen ke dalam mukus dan selanjutnya memfasilitasi proses pengeluaran antigen tersebut dari dalam tubuh (Talib *et al.* 2019).

MATERI DAN METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan model *true experimental design*, jenis *post test only control group*, yaitu hewan model dibagi dalam beberapa kelompok perlakuan. Ada empat perlakuan terhadap hewan model yaitu diet standart (K), diet standart + probiotik *Lactobacillus*, dengan berbagai dosis (P1, P2, P3). Penelitian ini ingin mengetahui pengaruh dosis pemberian ekstrak *Lactobacillus casei strain Shirota* sebagai probiotik terhadap perubahan S-IgA pada mukosa vagina tikus *menopause*.

Pengambilan Sampel

Sampel diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu *Rattus norvegicus strain Wistar Menopause* betina berusia 8 - 10 minggu (sesuai usia eksperimen), yang sudah di ovariectomy dengan berat 180-220, yang berada di Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Brawijaya Malang, dengan syarat sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi yang ditetapkan yaitu berat badan 180-220 g, sehat, selama 3 hari pra-perlakuan tidak mengalami penurunan berat badan sehingga berat total tidak di bawah 180 g, dan tikus menopause. Sedangkan kriteria eksklusi yang ditetapkan yaitu tikus mati karena perlakuan dan perilaku berubah (tidak mau makan, lemas).

Perhitungan Sampel

Perhitungan jumlah sampel minimal menggunakan rumus besar sampel eksperimen dari *freeder*, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, t : jumlah perlakuan dan r : jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan. Penelitian ini dengan tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol, sehingga $t=4$, $(4-1)(r-1) \geq 15$ sehingga $r \geq 6$. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 6 ekor untuk masing-masing kelompok (tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol), sehingga jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus.

Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini kelompok perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok secara acak (K, P1, P2, dan P3). Tikus *post ovariectomy* sebanyak 6 ekor sebagai kontrol dan 18 ekor tikus digunakan sebagai kelompok *treatment* dengan pemberian ekstrak probiotik *L. casei* hidup ($6,5 \times 10^9$ CFU) masing-masing dosis 1 (2 ml/ekor/hari) untuk kelompok P1, dosis 2 (2,25 ml/ekor/hari) untuk kelompok P2, dan dosis 3 (2,5 ml/ekor/hari) untuk kelompok P3.

Pengumpulan Data

Perhitungan terhadap konsumsi pakan per-hari dilakukan dengan cara ditimbang berat awal dan berat akhir pakan. Pakan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pakan standar rodentia yaitu *comfeed* PAR-S (dengan merk BURAS) terdiri atas: jagung, katul, DDGS, repesed, copra meal, biji batu, CPO, vitamin, dan mineral. Campuran *comfeed* PAR-S dan tepung terigu gunung bromo dengan komposisi (2:1), aquades, dan ekstrak *L. casei strain Shiota*. Hasil perhitungan tersebut selanjutnya akan dikonversikan ke dalam nilai gizi.

Pengukuran berat badan tikus dengan melakukan penimbangan menggunakan timbangan digital (*electronic balance*) dengan ketelitian 0,1 g. Penimbangan berat badan dilakukan pada awal pemeliharaan di laboratorium sampai hari terakhir perlakuan.

Pemeriksaan sIgA dengan Metode ELISA

Pengamatan s-IgA dilakukan secara sistematis pada mukosa vagina menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Proses ini melibatkan beberapa tahapan, dimulai dari pengambilan sampel mukosa, persiapan reagen, dan *plate* ELISA, hingga proses inkubasi, serta pembacaan hasil. Sampel mukosa diolah dengan prosedur khusus untuk memastikan bahwa kandungan s-IgA terdeteksi secara akurat. Setelah itu, sampel tersebut diteteskan pada *plate* ELISA yang telah dipersiapkan dengan lapisan antigen spesifik. Reaksi enzimatik terjadi selama inkubasi, menghasilkan perubahan warna yang intensitasnya diukur dengan spektrofotometer. Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kurva standar untuk menentukan kadar s-IgA.

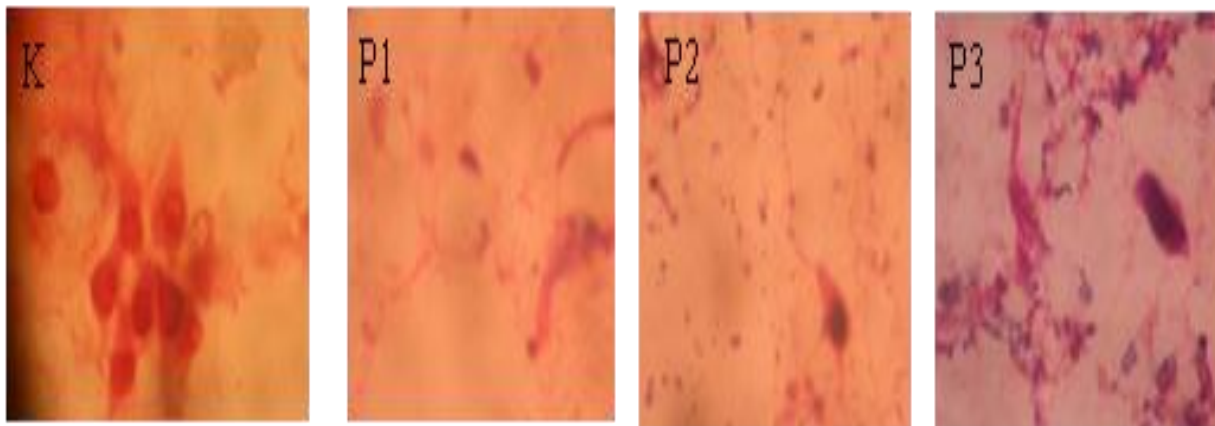
Analisa Data

Pada uji perbandingan mean variabel terukur

antara kelompok kontrol dengan ketiga kelompok perlakuan yang lain, dalam teknik analisis data digunakan uji *Anova One Way*. Dalam penelitian ini uji *Anova One Way* digunakan untuk membandingkan mean variabel respon antara kelompok kontrol (tikus), kelompok P1 (tikus+ ELcsS dosis 1), kelompok P2 (tikus+ ELcsS dosis 2), dan kelompok P3 (tikus+ E LcsS dosis 3). Penelitian dianggap signifikan dengan taraf kepercayaan 95% jika $p \leq 0,005$, jika terdapat perbedaan terhadap kelompok bermakna. Uji korelasi regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak *L. casei strain Shirota* berbagai dosis terhadap kadar s-IgA, dan semua hasil uji dikomputerisasi dengan program SPSS 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variabel independen pada penelitian ini adalah ekstrak probiotik *Lactobacillus casei* strain Shirota berbagai dosis yang melewati proses sterilisasi oase lengkung dengan metode *streak* kuadran untuk mendapatkan koloni spesies *L. casei* dan dilakukan kultur pengayaan untuk memproduksi dalam jumlah yang besar. Hasil pengukuran *optical density* (OD) diperoleh setelah kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C, dengan kecepatan 100 rpm, selama 48 jam, kemudian dilakukan pengenceran sesuai dengan kepadatan bakteri yang diinginkan. Gambar 1 menunjukkan hasil uji identifikasi bakteri *L. casei*.



Gambar 1. Identifikasi bakteri *Lactobacillus casei*. K: Kelompok kontrol. P1:Dosis 2 ml/ tikus, P2: Dosis 2,25 ml/ tikus, P3: Dosis 2,5 ml/ tikus.

Hewan coba dibagi ke dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian ekstrak probiotik *L. casei strain Shirota* P1 (2ml/tikus/hari), P2 (2,25ml/tikus/hari), P3 (2,5ml/tikus/hari), masing-masing perlakuan diambil dari konsentrasi $6,5 \times 10^9$ CFU). Sedangkan kelompok kontrol (K) tidak mendapatkan dosis perlakuan pemberian ekstrak *Lactobacillus* (0ml/tikus/hari). Waktu perlakuan dimulai pada hari ke-15 setelah dilakukan *ovariectomy*, dan dilakukan perlakuan selama 14 hari.

Hasil Uji Asumsi yang Melandasi ANOVA

Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test*. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil pengujian dengan *Saphiro-Wilk test* lebih besar dari $\alpha = 0,05$. Sedangkan pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan *Levene test*.

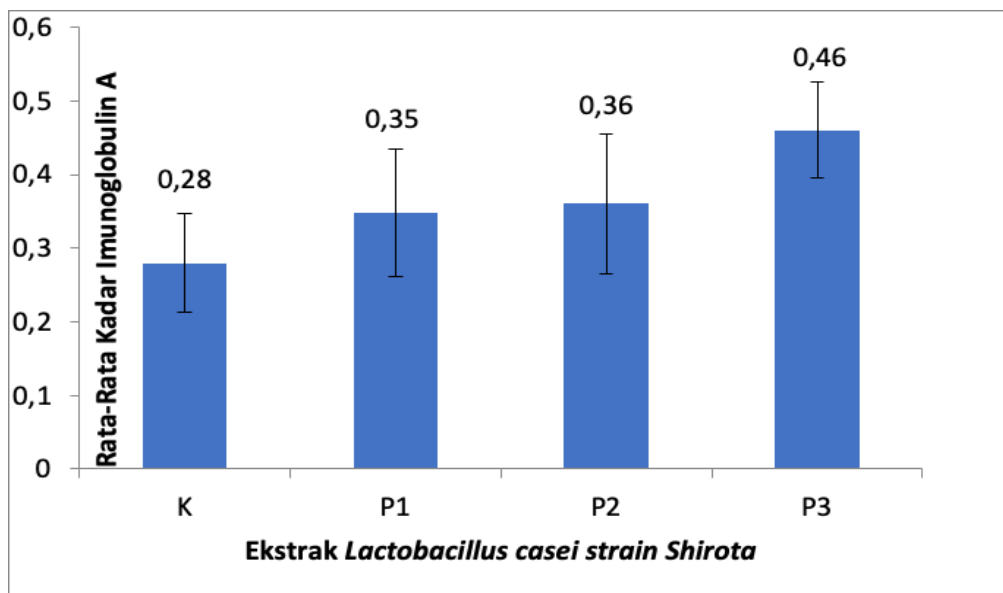
Tabel 1. Hasil uji asumsi normalitas dan homogenitas ragam

Variabel	Pengujian asumsi	Koefisien	p-value	Keterangan
Imunoglobulin A	Normalitas	0,968	0,626	Normal
	Homogenitas	0,615	0,613	Homogen

Berdasarkan pada Tabel 1, pengujian asumsi normalitas didapatkan koefisien Saphiro-Wilk pada variabel kadar imunoglobulin A sebesar 0,968 dengan p-value sebesar 0,626.

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap Kadar Imunoglobulin A

Perlakuan yang diberikan meliputi pemberian ekstrak *L. casei* strain Shirota 2 ml/ekor/hari (P1), ekstrak *L. casei* strain Shirota 2,25 ml/ekor/hari (P2), dan ekstrak *L. casei* strain Shirota 2,5 ml/ekor/hari (P3) dan kontrol (K). Gambar 1 menunjukkan hasil rata-rata kadar imunoglobulin A pada setiap perlakuan.



Gambar 2. Rata-rata kadar imunoglobulin A tiap perlakuan

Berdasarkan pada Gambar 1, kelompok kontrol memiliki rata-rata kadar imunoglobulin A paling rendah. Sedangkan pada tikus yang diberi ekstrak *L. casei* strain Shirota dengan beberapa level dosis, ditunjukkan bahwa rata-rata kadar imunoglobulin A lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan

adanya peningkatan kadar imunoglobulin A. Untuk menguji terjadinya peningkatan kadar imunoglobulin A secara signifikan atau tidak, selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan ANOVA. Berikut hasil ANOVA pengujian kadar imunoglobulin A (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil analisis pengujian kadar imunoglobulin A menggunakan ANOVA

Perlakuan	Mean $\pm$ SD	p-value
K	0,28 $\pm$ 0,067	0,006
P1	0,348 $\pm$ 0,087	
P2	0,36 $\pm$ 0,095	
P3	0,46 $\pm$ 0,065	

Berdasarkan Tabel 2, dapat dilihat bahwa sumber keragaman perlakuan memiliki p-value sebesar 0,006 dan lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$. Sehingga berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan

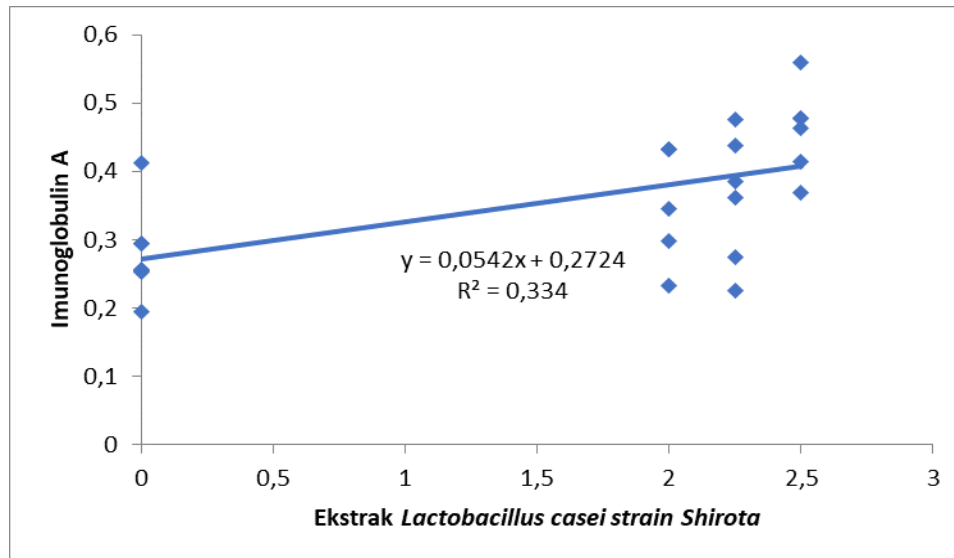
bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* berbagai dosis terhadap peningkatan kadar imunoglobulin A. Berikut hasil pengujian LSD 5% (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil uji LSD kadar imunoglobulin A

Perbandingan	Beda rata-rata	p-value
K P1	-0,068	0,154
P1 P2	-0,080	0,082
P2 P3	-0,180	0,001
P1 P2	-0,012	0,805
P2 P3	-0,112	0,029
P2 P3	-0,100	0,040

Berdasarkan hasil *post hoc test* menggunakan analisis LSD 5%, pada perbandingan kelompok kontrol (K) dengan pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* dosis 2 ml/ekor/hari (P1) dan 2,25 ml/ekor/hari (P2), didapatkan p-value $> 0,05$. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* dosis 2 ml/ekor/hari (P1) dan 2,25 ml/ekor/hari (P2) belum mampu meningkatkan kadar imunoglobulin A tikus secara signifikan. Sedangkan perbandingan kelompok kontrol (K) dengan pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* dosis 2,5 ml/ekor/hari (P3), didapatkan p-value $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* dosis 2,5 ml/ekor/hari mampu meningkatkan kadar imunoglobulin A tikus putih secara signifikan. Perbandingan antara pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* dosis 2 ml/ekor/hari (P1) dengan pemberian ekstrak

L. casei strain Shiota 2,25 ml/ekor/hari (P2) menunjukkan p-value $> 0,05$. Hal ini mengindikasikan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata kadar imunoglobulin A. Perbandingan antara pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* 2 ml/ekor/hari (P1) dengan pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* 2,5 ml/ekor/hari (P3) menunjukkan p-value $< 0,05$. Perbandingan antara pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* 2,25 ml/ekor/hari (P2) dengan pemberian ekstrak *L. casei strain Shiota* 2,5 ml/ekor/hari (P3) juga menunjukkan p-value $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan rata-rata kadar imunoglobulin A antara P1 dengan P3 dan P2 dengan P3. Secara grafis, hubungan antara ekstrak *L. casei strain Shiota* pada berbagai dosis terhadap kadar imunoglobulin A ditunjukkan dalam grafik berikut (Gambar 3).



Gambat 3. Korelasi antara ekstrak *L. casei* strain Shirota pada berbagai dosis terhadap kadar imunoglobulin A

Berdasarkan hasil pengujian pengaruh pemberian ekstrak *L. casei* strain Shirota terhadap kadar imunoglobulin A, ditunjukkan bahwa koefisien regresi pada persamaan regresi sebesar 0,054. Hal ini mengindikasikan bahwa peningkatan pemberian ekstrak *L. casei* strain Shirota sebesar 1 ml/ekor/hari, mampu meningkatkan kadar imunoglobulin A sebesar 0,054. Nilai R-Square sebesar 33,4% menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *L. casei* strain Shirota berpengaruh terhadap peningkatan kadar imunoglobulin A sebesar 33,4%.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu ekstrak probiotik *Lactobacillus casei* strain Shirota dapat menurunkan kadar keasaman vagina dengan peningkatan 1ml/ekor/hari sebesar -0,302 dengan nilai R-Square sebesar 43,3%. Selain itu, ekstrak probiotik *L. casei* strain shirota juga dapat meningkatkan kadar *immunoglobulin A sekretorik (s-IgA)* dengan peningkatan pemberian 1ml/ekor/hari

sebesar 0,054, dengan nilai R-Square sebesar 33,4%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anindita, R., Nathalia, D. D., Perwitasari, M., Putri, I. K., & Beandrade, M. U. (2022). Edukasi tentang pentingnya suplementasi probiotik untuk menjaga imunitas di masa pandemi COVID-19. *Jurnal Abdi Insani*, 9(4), 1237-1245.
- Chee, W. J. Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2020). Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>.
- Claesson, M. J., Van Sinderen, D., & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* - A genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 22–28. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>
- Farisin, M. S., & Kumaat, N. A. (2018). Pengaruh latihan senam bugar lansia terhadap menopause rating scale (MRS) pada wanita madya lansia Panti Werdha Surya Surabaya. *Jurnal Kesehatan Olahraga*, 2(7), 6-13.
- Kato-Kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K., Matsuki, T., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., & Rokutan, K. (2016). Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3649–3658.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.04134-15>.
- Mardiah, A. (2013). Skrining, isolasi, dan uji aktivitas antibakteri metabolit bioaktif jamur endofit dari tumbuhan ginseng kuning (*Rennellia elliptica* Korth.).[skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri (UIN) Jakarta.
- Marga, U., Via, B., Dharmana, E., & Hadi, P. (2015). Pengaruh pemberian minyak *Nigella sativa* dan kombinasinya dengan seftiakson terhadap jumlah kuman *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) pada kultur otak mencit Balb/c. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 4(4), 522-530.
- Megawanti, P. (2014). 文/石馨1 魏雪冬2 刘波2 赵晶1 *. 2(150), 59–61.
- Ni'mah, R. (2019). Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng china (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit dan titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. [Doctoral dissertation]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nowroozi, J., Mirzaei, M., & Norouzi, M. (2004). Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria. *Iranian Journal of Public Health*, 33(2), 1–7.
- Reid, G., & Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01544-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01544-7).
- Talib, N., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Hussin, Y., Mubin Aziz, M. N., Masarudin, M. J., Sharifuddin, S. A., Hui, Y. W., Ho, C. L., & Alitheen, N. B. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. From kefir samples in Malaysia. *Molecules*, 24(14), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules24142606>
- Tsamrotul, I., & Adah, F. U. (2019). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dari fermentasi kefir kolostrum. Universitas Negeri Lampung, 12–13.