
Pengaruh Penambahan *Bifidobacterium* dalam Susu terhadap Perkembangan Mikroflora Saluran Cerna Anak Usia 12-24 Bulan

Mien Karmini*, Badriul Hegar**, Budi Agus Pranoto***

* Pusat Penelitian Pengembangan Gizi dan Makanan-Departemen Kesehatan RI, Bogor

** Divisi Gastroenterologi Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM

*** Departemen Research PT Sanghiang Perkasa

Latar belakang. *Bifidobacterium* telah diketahui sebagai mikroflora saluran cerna yang dominan pada bayi dan mempunyai efek positif bagi kesehatan. Namun, dengan bertambahnya usia jumlah mikroflora tersebut menurun dan digantikan oleh bakteri lain termasuk bakteri patogen.

Tujuan Penelitian. Mengetahui pengaruh pemberian susu yang mengandung *Bifidobacterium* terhadap perkembangan mikroflora saluran cerna dan respon imun pada anak usia 12-24 bulan.

Metode. *Randomized double blind controlled trial*, pengamatan dilakukan selama 4 minggu dengan data yang dikumpulkan meliputi antropometri, jumlah *Bifidobacterium* dalam tinja, dan titer antibodi.

Hasil. *Bifidobacterium* dalam susu formula dapat meningkatkan jumlah *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* dalam saluran cerna anak dan menurunkan jumlah bakteri *Coliform*. Konsumsi susu formula yang mengandung *Bifidobacterium* juga dapat meningkatkan sistem imun humoral. Penambahan *Bifidobacterium* ke dalam susu formula tidak mempengaruhi aseptabilitas anak.

Kesimpulan. Penambahan *Bifidobacterium longum* BB536, *B. breve* M16V, dan *B. infantis* M63 pada susu formula untuk anak usia di atas 1 tahun dapat meningkatkan mikroflora saluran cerna *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* serta menekan pertumbuhan bakteri merugikan, *Coliform*. Pemberian *Bifidobacteria* dalam susu formula meningkatkan beberapa komponen sistem imun (**Sari Pediatri** 2007; 9(2):87-92).

Kata kunci: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, mikroflora saluran cerna, respon imun humoral

Alamat korespondensi

Dr. Badriul Hegar, Sp.A.(K)

Divisi Gastroenterologi, Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM, Jl. Salemba no. 6, Jakarta 10430.

Telepon: 021-3915665. Fax.021-390 7743.

Diare merupakan penyebab kesakitan yang perlu mendapat perhatian di Indonesia.¹ Daya tahan tubuh (*host*) dan intensitas paparan mikroorganisme patogen merupakan dua faktor utama pada pengembangan penyakit diare. Hasil survey tahun 2003, diare

memiliki prevalensi paling tinggi pada anak usia 6-24 bulan.² Kajian terhadap tinja anak usia 3-24 bulan yang menderita diare akut tanpa dehidrasi dan dehidrasi ringan-sedang di Poliklinik rawat Jalan Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSCM ditemukan Rotavirus pada 60% anak dan bakteri pada 17% anak.³

Dengan mempertimbangkan kejadian diare akibat infeksi cukup tinggi dan sistem kebersihan sanitasi serta individu yang kurang, maka strategi pencegahan diare melalui peningkatan sistem imun saluran cerna menjadi salah satu alternatif pilihan.⁴

Akhir-akhir ini banyak diteliti tentang manfaat probiotik terhadap kesehatan manusia. Probiotik adalah bakteri hidup yang bila diberikan atau dikonsumsi dalam jumlah cukup dapat memberikan efek menguntungkan bagi tubuh.⁵ Bakteri yang mempunyai sifat probiotik adalah bakteri penghasil asam laktat seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*. Bakteri penghasil asam laktat terbukti dapat menurunkan tingkat keparahan infeksi *rotavirus* pada manusia.⁶ *Bifidobacterium* merupakan bakteri yang mendominasi saluran cerna bayi baru lahir, namun dengan bertambahnya umur, bakteri tersebut akan digantikan oleh bakteri lain.⁷ Makin bertambah umur, peluang paparan bakteri lain makin tinggi termasuk bakteri patogen. Oleh karena itu, menjaga keseimbangan mikroflora yang didominasi oleh bakteri yang termasuk golongan probiotik di dalam saluran cerna anak menjadi hal yang sangat penting. Penelitian ini bertujuan melihat pengaruh pemberian susu yang mengandung *Bifidobacterium* terhadap perkembangan mikroflora usus dan respon imun pada anak berusia 12-24 bulan.

Metode

Penelitian *randomized double blind controlled trial* dilakukan selama 4 minggu yang dibagi menjadi tiga periode. Periode pertama selama 1 minggu, semua subjek yang ikut dalam penelitian tidak mengkonsumsi probiotik atau prebiotik jenis apapun (periode kontrol). Periode kedua (periode uji) selama minggu ke-2 dan minggu ke-3, subjek dibagi menjadi dua kelompok secara random: kelompok uji diberikan susu yang sudah ditambahkan probiotik, sedangkan kelompok kontrol diberikan susu tanpa penambahan probiotik. Periode ketiga (minggu ke-4), pemberian

susu mengandung probiotik dihentikan, semua subjek hanya mendapat susu tanpa penambahan probiotik dan pada akhir minggu ke-4 dilakukan pengambilan data.

Susu dan Probiotik

Jenis probiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bifidobacterium longum* BB536, *B. breve* M16V dan *B. infantis* M63. Ketiga jenis probiotik tersebut terdapat di dalam susu formula dengan dosis $2,7 \times 10^9$ CFU/100 g. Sedangkan sebagai kontrol digunakan susu tanpa penambahan ketiga jenis probiotik tersebut. Semua susu dikemas dalam kemasan aluminium foil dan disimpan dalam ruangan sejuk. Distribusi susu formula dilakukan dengan kendaraan yang dilengkapi dengan *air conditioner*. Kode *double blind* baru dibuka setelah semua data diolah dan dianalisis.

Subjek Penelitian

Penelitian ini dilakukan terhadap 60 anak yang dibagi menjadi dua kelompok; kelompok uji dan kelompok kontrol (masing-masing 30 anak). Penelitian dilakukan di Kecamatan Bogor Barat dan Tanah Sareal, Kabupaten Bogor. Kriteria inklusi: anak berusia 12-24 bulan, status nutrisi BB/TB $\geq 90\%$ (CDC 2000), anak dalam keadaan 'sehat', dan orangtua bersedia anaknya diambil darah untuk pemeriksaan laboratorium.

Pengambilan tinja dan kultur mikroflora

Sebanyak 1-3 g tinja dimasukkan ke dalam plastik tertutup yang berisi aquabidest, diaduk hingga tercampur sempurna, dan disimpan dalam *cool box*. Tinja yang telah dikumpulkan diencerkan dengan akuabides dan dibiakkan dalam Agar Semi Solid dengan cara memasukkan sampel yang sudah diambil dengan pipet Pasteur ke dasar tabung dan diinkubasi secara anaerobik dengan menambahkan CO₂ 10% pada suhu 37°C selama 48 jam. Keseluruhan proses tidak lebih dari 24 jam.

Izin Komite Etik

Penelitian ini telah mendapat ijin penelitian dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan di Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan.

Hasil

Karakteristik Subjek

Pada akhir penelitian 53 anak dapat menyelesaikan penelitian, terdiri dari 26 anak pada kelompok uji dan 27 anak pada kelompok kontrol. Karakteristik subjek dari kedua kelompok tertera pada Tabel 1. Kisaran umur pada kelompok uji 12-22 bulan (rerata $16,1 \pm 3$), sedangkan pada kelompok kontrol 12-23 bulan (rerata $17,1 \pm 4$). Tidak terdapat perbedaan bermakna usia di antara kedua kelompok ($p > 0,05$). Jumlah anak yang masih mendapat air susu ibu (ASI) pada kelompok uji sebanyak 12 anak dan pada kelompok kontrol sebanyak 17 anak.

Pada akhir pengamatan terdapat kenaikan BB rerata sebesar 0,4 kg (400 g), baik pada kelompok uji maupun kelompok kontrol. Panjang badan pada masing-masing kelompok menunjukkan pertambahan sebesar 1,2 cm (Tabel 2).

Jumlah susu yang dikonsumsi oleh kelompok kontrol sebesar 793,0 g, sedangkan pada kelompok

uji sebanyak 790,7 g dan secara statistik tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) (Tabel 3).

Pada awal pengamatan, kadar hemoglobin (Hb) pada kelompok uji sebesar 11,46 g/dL, sedangkan pada kelompok kontrol 11,1 g/dl. Kadar Hb pada akhir pengamatan pada kelompok uji sebesar 11,57 g/dl, sedangkan pada kelompok kontrol 12,07 g/dl. Kenaikan Hb pada kelompok kontrol terlihat sedikit lebih tinggi dibanding kelompok uji tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$) (Tabel 4).

Pada kelompok uji, kenaikan nilai IgG sebesar 1,19 g/L (11,4%), sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 0,52 g/L (5,1%). Meskipun secara statistik hasil tersebut tidak memperlihatkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$), tetapi kenaikan kadar IgG pada kelompok uji 2,2 kali lebih tinggi dibanding kelompok kontrol (Tabel 5).

Kadar IgA darah pada kelompok uji menunjukkan kenaikan sebesar 0,06 g/L (13,6%), sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 0,02 g/L (4%). Meskipun kenaikan kadar IgA pada kelompok uji 3 kali lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, namun perbedaan ini juga tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$) (Tabel 6).

Pertumbuhan mikroflora saluran cerna pada uji klinis ini ditentukan berdasarkan jumlah *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* dalam tinja sebelum dan setelah intervensi. Nilai yang sebenarnya adalah angka yang tercantum dalam tabel $\times 10^5$ untuk *Bifidobacterium* dan 10^6 untuk *Lactobacillus*. Penyederhanaan ini dilakukan untuk mempermudah perhitungan statistik. Jumlah

Tabel 1. Karakteristik subjek

Kelompok	Umur (rerata bulan)	Jumlah anak yang masih mendapat ASI
Kelompok kontrol	$17,1 \pm 4$	17
Kelompok uji	$16,1 \pm 3$	12

$p > 0,05$ df 1

Tabel 2. Kenaikan berat badan dan pertambahan panjang badan

Parameter	Kelompok Kontrol		Kelompok Uji	
	Awal pengamatan	Akhir pengamatan	Awal pengamatan	Akhir pengamatan
Berat badan (kg)	$9,6 \pm 1,26$	$10,0 \pm 1,35$	$9,7 \pm 10,96$	$10,1 \pm 1,24$
Tinggi badan (cm)	$77,6 \pm 3,96$	$78,8 \pm 3,99$	$77,9 \pm 3,89$	$79,2 \pm 3,60$

$p > 0,05$ df = 1

Tabel 3. Jumlah susu yang dikonsumsi

	Kelompok Uji			Kelompok Kontrol		
	Diberikan	Jumlah Susu (g) Dikonsumsi	Cakupan %	Diberikan	Jumlah Susu (g) Dikonsumsi	Cakupan %
Rerata	1400,0	790,7	56,5	1400,0	793,0	56,6
SD	0,0	344,8	24,6	0	269,96	19,28

Tabel 4. Kadar hemoglobin

Kelompok	Kadar hemoglobin	
	Sebelum	Setelah
Kelompok kontrol	11,51 ± 1,27	12,07 ± 0,97
Kelompok uji	11,46 ± 1,22	11,57 ± 1,20

p>0,05 df 1

Tabel 5. Kadar imunoglobulin G darah

Kelompok	Kadar IgG (g/L)	
	Sebelum	Setelah
Kelompok kontrol	10,15 ± 2,67	10,67 ± 2,83
Kelompok uji	10,44 ± 3,08	11,62 ± 3,03

p>0,05 df 1

Tabel 6. Kadar imunoglobulin G darah

Kelompok	Kadar IgA (g/L)	
	Sebelum	Setelah
Kelompok kontrol	0,50 ± 0,25	0,52 ± 0,22
Kelompok uji	0,44 ± 0,15	0,50 ± 0,16

p>0,05 df 1

Bifidobacterium sebelum intervensi pada kelompok uji rerata sebanyak 38 x 10⁵ CFU/g dan setelah intervensi rerata sebanyak 87 x 10⁵ CFU/g; rerata kenaikan 49 x 10⁵ CFU/g atau 128,9%. Pada kelompok kontrol jumlah *Bifidobacterium* sebelum intervensi rerata sebanyak 32 x 10⁵ CFU/g dan setelah intervensi rerata sebanyak 46 x 10⁵ CFU/g; rerata kenaikan 14 x 10⁵ CFU/g atau 43,8%. Perbedaan kenaikan *Bifidobacterium* pada kedua kelompok tersebut secara statistik bermakna (p < 0,001) (Tabel 7).

Jumlah *Lactobacillus* rerata pada kelompok uji sebanyak 30 x 10⁶ CFU/g dan setelah intervensi 255 x 10⁶ CFU/g; rerata kenaikan 225 x 10⁶ CFU/g atau 750%. Pada kelompok kontrol jumlah *Lactobacillus* sebelum intervensi sebanyak 14 x 10⁶ CFU/g dan setelah intervensi 76 x 10⁶ CFU/g; rerata kenaikan 63 x 10⁶ CFU/g atau 450%. Kenaikan jumlah *Lactobacillus* pada kedua kelompok tersebut juga memperlihatkan perbedaan yang bermakna secara statistik (p < 0,001) (Tabel 7)

Pada tabel 7 juga diperlihatkan jumlah bakteri *Coliform* untuk kedua kelompok baik sebelum maupun sesudah intervensi. Pada kelompok uji, rerata total *coliform* sebelum intervensi sebanyak 4,7 x 10³ koloni/g dan setelah intervensi 2,8 x 10³ koloni/g; rerata penurunan sebanyak 1,9 x 10³ koloni/g (40%). Pada kelompok kontrol, jumlah *coliform* sebelum intervensi sebanyak 4,1 x 10³ koloni/g dan setelah intervensi 3,5 x 10³ koloni/g; rerata penurunan sebanyak 0,6 x 10³ koloni/g (14,6%). Secara statistik perbedaan tersebut tidak bermakna (p > 0,05).

Diskusi

Probiotik saat ini sudah banyak digunakan dalam berbagai macam jenis makanan, termasuk susu formula. Berbagai jenis bakteri digunakan tetapi, hanya genus *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* yang boleh dinyatakan sebagai probiotik.⁵ Pemberian *Bifidobacterium* belum pernah dilaporkan menyebabkan kejadian infeksi.⁵ Bakteri ini aman karena tidak memiliki risiko terhadap fenomena transfer gen yang resisten terhadap antibiotik.⁸ Komposisi *Bifidobacterium* pada orang dewasa berbeda pada bayi maupun anak. Pada orang dewasa, komposisi

Tabel 7. Mikroflora dalam tinja

Bakteria	Kelompok Kontrol		Kelompok Uji	
	Sebelum intervensi	setelah intervensi	Sebelum intervensi	setelah intervensi
<i>Bifidobacterium sp</i>	32 ± 25,88 ^a	46 ± 22,28	38 ± 31	87 ± 59 [†]
<i>Lactobacillus sp</i>	14 ± 16,23 ^b	76 ± 77,15	30 ± 25	255 ± 283 [†]
<i>Coliform</i>	4,1 ± 3,08 ^c	3,5 ± 2,57	4,7 ± 2,9	2,8 ± 2,7

a Jumlah bakteri mean ± SD of x 10⁵ CFU/g

b Jumlah bakteri mean ± SD of x 10⁶ CFU/g

c Jumlah bakteri mean ± SD of x 10³ CFU/g

† p < 0.001 (kelompok uji dibanding kelompok kontrol)

Bifidobacterium didominasi *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, dan *B. longum*, sedangkan pada bayi dan anak didominasi oleh *B. breve*, *B. longum* dan *B. Infanti*.^{7,9}

Selama pengamatan berlangsung terdapat 4 anak pada kelompok uji dan 3 anak pada kelompok kontrol mengalami demam akibat infeksi saluran napas akut dan sembuh setelah hanya mendapat parasetamol selama 1-2 hari. Tidak adanya perbedaan dari jumlah susu yang dikonsumsi oleh kelompok kontrol dan kelompok uji menunjukkan bahwa bila terjadi perbedaan nilai dari variabel yang diukur berarti bukan disebabkan oleh jumlah susu atau zat gizi yang dikonsumsi. Data tersebut juga memperlihatkan bahwa penambahan probiotik kedalam susu formula tidak mempengaruhi akseptabilitas susu tersebut.

Rerata kadar hemoglobin (Hb) kedua kelompok berada pada kisaran normal, meskipun ada beberapa anak mempunyai kadar Hb di bawah nilai normal (11 g/dl), yaitu 4 anak pada kelompok uji dan 4 anak pada kelompok kontrol. Setelah dilakukan intervensi, masih terdapat 4 anak pada kelompok uji dan 3 anak pada kelompok yang mempunyai kadar Hb di bawah normal.

Probiotik dapat menginduksi mekanisme sistem pertahanan tubuh, baik melalui respons non-imunologik dengan menjaga kestabilan mikroflora usus maupun melalui respons imun humoral.¹⁰ Beberapa penelitian baik pada hewan maupun manusia menunjukkan hubungan antara probiotik dengan sistem imun.^{6,9} Pemberian probiotik dapat meningkatkan IgA anti-rotavirus pada tinja tikus yang sebelumnya diberi probiotik dan rotavirus secara bersamaan dibanding tikus yang hanya diberi rotavirus saja.⁶ Hubungan positif antara peningkatan jumlah probiotik (*B. longum-infantis* dan *B. breve*) dan jumlah antibodi IgA (tinja) juga terlihat pada bayi yang mendapat susu fermentasi.⁹

Adanya IgA-sekresi pada sel mukosa usus merupakan mekanisme pertahanan tubuh pertama,¹¹ memiliki fungsi utama sebagai inhibitor terhadap bakteri atau virus yang akan menempel pada sel epitel saluran cerna. Fungsi lainnya adalah mengaglutinasi antigen dengan cara memerangkap antigen ke dalam mukus dan selanjutnya memfasilitasi proses pengeluaran antigen tersebut dari dalam tubuh.¹² Pada mekanisme *bacterial translocation*, IgA juga merupakan salah satu faktor immunomodulator sistem imun.¹³ Pada penelitian ini tidak memperlihatkan perbedaan, peningkatan IgA serum juga terlihat pada

kelompok uji dibanding kelompok kontrol pada penelitian ini.

Pengambilan serum untuk pemeriksaan antibodi hanya dapat dilakukan pada 50% subjek untuk setiap kelompoknya karena masalah teknis. Idealnya dilakukan pemeriksaan IgA pada sel mukosa usus, tetapi biopsi merupakan metode yang invasif sehingga tidak etik dilakukan pada bayi 'sehat'. Pengukuran IgA pada tinja dapat pula dilakukan sebagai alternatif karena tidak invasif.^{6,9} Meskipun data ini tidak dapat dikatakan mewakili populasi secara keseluruhan, tetapi data tersebut dapat digunakan untuk melihat kecenderungan pengaruh pemberian probiotik terhadap beberapa parameter sistem imun.

Beberapa penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian *bifidobacterium* dapat mempengaruhi mikroflora usus, frekuensi defekasi dan karakteristik tinja.¹⁴⁻¹⁶ Peningkatan jumlah *bifidobacteria* juga terlihat pada anak alergi berusia 3-18 bulan yang diberi *bifidobacteria*.¹⁷ Pada penelitian ini, pemberian *bifidobacterium* mampu mempengaruhi komposisi mikroflora usus dengan meningkatkan jumlah *bifidobacterium* dan *lactobacillus* secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Walaupun ada kemungkinan *bifidobacteria* yang diukur adalah bakteri yang ditambahkan, namun adanya peningkatan jumlah *blactobacillus* menunjukkan bahwa pemberian *bifidobacteria* terbukti mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri menguntungkan lainnya. Hasil yang sama juga diperoleh oleh Schrezenmeier dkk (2004), pemberian probiotik pada anak usia 1-6 tahun mampu meningkatkan jumlah *lactobacillus* dalam waktu 14 hari.¹⁸ Ogata dkk. (1997) melaporkan bahwa pemberian susu yang sudah ditambahkan *bifidobacteria* menyebabkan peningkatan frekuensi defekasi secara signifikan, penurunan pH dan peningkatan asam organik tinja.¹⁴

Kolonisasi bakteri komensal pasca melahirkan merupakan faktor penting untuk membentuk dan mengatur sistem pertahanan sel epitelial saluran cerna.¹¹ Kelompok kontrol pada penelitian ini masih memperlihatkan kenaikan jumlah *bifidobacteria* dan *lactobacillus* dalam tinja. Hal ini mungkin disebabkan beberapa anak masih mendapat ASI (16 orang) yang seperti diketahui ASI mengandung faktor bifidus, seperti oligosakarida. Faktor kemungkinan lainnya adalah kedua susu mengandung laktulosa yang juga merupakan jenis prebiotik yang dapat meningkatkan pertumbuhan *bifidobacteria* dan aktifitas enzim lisozim.^{19,20}

Kesimpulan

Penambahan *bifidobacterium longum* BB536, *B. breve* M16V, dan *B. infantis* M63 pada susu formula untuk anak usia di atas 1 tahun dapat meningkatkan mikroflora saluran cerna *bifidobacteria* dan *lactobacillus* serta menekan pertumbuhan bakteri merugikan, *coliform*. Pemberian *bifidobacteria* pada susu formula meningkatkan beberapa komponen sistem imun.

Daftar Pustaka

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Survey Kesehatan Rumah Tangga 2001: Studi morbiditas dan disabilitas. Jakarta: Departemen Kesehatan RI;2001
2. Badan Pusat Statistik Indonesia, ORC Macro. Indonesia demographic and health survey 2002-2003. Maryland: BPS and ORC Macro;2003
3. Hegar B, Kadim M, Pasaribu A. Karakteristik mikroorganisme saluran cerna pada anak dengan diare akut. Maj Kedokt Indon 2004; 54: 367-71
4. Soenarto SY. Diarrhea case management: Using research findings directly for case management and teaching in teaching hospital in Yogyakarta Indonesia. Disertasi Doktor pada Free University Amsterdam, Netherland 1997
5. FAO-WHO Joint Working Group Report. Guidelines for the evaluation of probiotics in food 2002. Ontario: WHO-FAO; 2002.
6. Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, Rich G, Talty MR, Locniskar M. Immune respons in rhesus rotavirus-challenged balb/c mice treated with *Bifidobacterium* and prebiotic supplements. *Pediatr Res* 2002; 51:750-5.
7. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-Gene-Targeted species-specific primers. *Appl Environ Micro* 1999; 65:4506-12.
8. Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 55: 38-44
9. Mullie C, Yazourh A, Thibault H, Odou MF, Singer E, Kalach N, Kremp O, Romond MB. Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium longum*-*infantis* and *Bifidobacterium breve* in Infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Res* 2004; 56: 791-5.
10. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin* 2002; 73(suppl):444S-50S.
11. Brandtzaeg P. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 964: 13-45
12. Mayer L. Mucosal Immunity. *Pediatrics* 2003; 111:1595-1600.
13. Yamazaki S, Machii K, Tsuyuki S, Momose H, Kawashima T, Ueda K. Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunology* 1985; 56:43-50.
14. Ogata T, Nakamura T, Yaeshima T, Takahashi S, Fukuwatari Y, Ishibashi N, Fujisawa T, Iino H. Effect of bifidobacterium longum BB536 administration on the intestinal environment, defecation frequency and fecal characteristics of human volunteers. *Bioscience Microflora* 1997;16:53-8.
15. Yaeshima T, Takahashi S, Matsumoto N, Ishibashi N, Hayasawa H, Iino H. Effect of yogurt containing bifidobacterium longum BB536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency, a comparison with standard yogurt. *Bioscience Microflora* 1997;16:73-7.
16. Ogata T, Nakamura TK, Yaeshima T, Teraguchi S, Fukuwatari Y, Ishibiashi N, Hayasawa H, Fujisawa T, Iino H. Effect of bifidobacterium longum BB536 yogurt administration on the intestinal environment of healthy adults. *Microbiol Ecology in Health and Dis* 1999; 11:41-6.
17. Taniuchi S, Hattori K, Yamamoto A, Sasai M, Hatano Y, Kojima K, Kobayashi Y, Iwamoto H, Yaeshima T. Administration of bifidobacterium to infants with atopic dermatitis: changes in fecal microflora and clinical symptoms. *The journal of Appl Res* 2005; 5:387-96.
18. Schrezenmeir J, Heller K, McCue M, Llamas C, Lam W, Burow H, Kindling-Rohracker M, Fischer W, Sengespeik HC, Comer GM, Alarcon P. Benefits of oral supplementation with and without synbiotics in young children with acute bacterial infections *Clin Pediatr* 2004; 43:239-49.
19. Kawase K, Suzuki T, Kiyosawa I, Okonogi S, Kawashima T, Kuboyama M. Effect of composition of infant formulas on the intestinal microflora of infants. *Bifidobacteria Microflora* 1983; 2:25-31.
20. Kiyosawa I, Takase M, Yamauchi K, Ono J, Yaeshima T, Okonogi S. Lactulose and intestinal microflora in infant nutrition. *Bifidobacteria Microflora* 1986; 5:27-35.