

## Viabilitas Sel Bakteri Dengan *Cryoprotectant Agents* Berbeda (Sebagai Acuan Dalam Preservasi *Culture Collection* di Laboratorium Mikrobiologi)

LELA SUSILAWATI<sup>1</sup>, ETHIK SUSIAWATI PURNOMO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Prodi Pendidikan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta  
Jl. Laksda Adisutjipto No. 1 Yogyakarta 55282  
email: lela.susilawati@uin-suka.ac.id

### ABSTRACT

The aim of this research was to determine the viability of bacterial cells on different cryoprotectant agents. Three kind of cryoprotectant agents and two types of mixed cryoprotectant were applied to evaluate the ability of bacteria to growth on Agar medium. Four isolates were used namely *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Shigella flexneri* ATCC 12022 and *Bacillus subtilis* ATCC 6051. All strains were preserved in 10% skimmed milk, 10% glycerol, 10% DMSO, 10% glycerol:10% skimmed milk and 10% DMSO:10% skimmed milk at -80°C for sixty days. Immediately after preserved, the bacteria were tested their viability at day 30 and 60 during storage. The enumeration of samples taken from cultures in NA media. Better survival of bacterial cells after freezing was shown in all tested cryoprotectant agents. Highest microbial viability was shown in 10% skimmed milk, 10% glycerol and mixed 10%DMSO:10% skimmed milk. Hence, those three types of cryoprotectant agents can be recommended to preserve bacterial cell for long term storage.

Keywords: bacterial cell, cryoprotectant agents, preservation, viability

### INTISARI

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji viabilitas atau kemampuan hidup sel bakteri dengan komposisi agensia *cryoprotectant* berbeda. Jenis *cryoprotectant* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10% gliserol, 10% DMSO, 10% gliserol, kombinasi 10% gliserol : 10% skim milk dan kombinasi 10% DMSO : 10% skim milk. Kultur yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Shigella flexneri* ATCC 12022 dan *Bacillus subtilis* ATCC 6051. Bakteri di simpan dalam *freeze* -80°C (simpan beku) selama 60 hari dan setiap 30 hari bakteri di uji daya viabilitasnya menggunakan metode *plate count* yang di tumbuhkan pada media NA. Lima perlakuan dengan beragam agensia *cryoprotectant* memberikan daya viabilitas yang relatif baik karena jumlah koloni setelah di simpan beku dengan starter awal relatif stabil. Akan tetapi perlakuan simpan beku dalam *cryoprotectant* 10% skim milk, 10% gliserol dan 10% DMSO:10% skim milk memberikan jumlah koloni yang relatif bertambah dari hasil sampling 30 hari dan setelah 60 hari.

Kata kunci: agensia *cryoprotectant*, bakteri, preservasi, viabilitas

### PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati tidak hanya terbatas pada spesies tumbuhan dan hewan tetapi termasuk di dalamnya keanekaragaman mikrobial. Menurut Sembiring (2004) mikrobial memiliki peran paling *crusial* dan unik di alam karena keterlibatannya pada berbagai siklus elemen penting yang sangat dibutuhkan semua jasad hidup di alam. Dengan demikian seluruh jasad hidup yang

ada di alam ini merupakan perwujudan dari keanekaragaman hayati termasuk di dalamnya adalah hewan, tumbuhan dan mikrobial.

Telah banyak dikaji secara mendalam akan peran mikrobial terutama untuk kepentingan pemenuhan kebutuhan manusia seperti perannya dalam bidang industri obat, makanan, pertanian dan bidang lainnya bahkan memanipulasi gennya untuk menghasilkan metabolit tertentu yang

dikehendaki. Laporan penelitian tentang keanekaragaman hayati mikrobia terkait perannya di alam telah banyak dilaporkan. Yanti *et al.* (2009) berhasil mengidentifikasi bakteri *Bacillus megaterium* PSA10 yang diisolasi dari limbah cair sagu sebagai strain yang dapat menghasilkan PHB yaitu polimer bahan dasar plastik yang bersifat *degradable*. Anggota genus lain yang juga unggul dalam memproduksi granula PHB adalah *Alcaligenes eutropus* (Arun *et al.*, 2006) dan *Bacillus subtilis* (Singh *et al.*, 2009).

Peran mikrobia dalam bidang medis sangat signifikan, hal ini dimulai sejak ditemukannya antibiotik penicillin secara *serendipity* oleh Alexander Flemming yang diproduksi oleh *Penicillium notatum* (Satyanarayana, 2005). Sejak saat itu mulai dieksplorasi lebih mendalam tentang peran penting mikrobia dalam menghasilkan *natural product* yang bermanfaat sebagai obat. Menurut Peláez (2005) antibiotik yang saat ini beredar di pasaran berasal dari produk alami yang dihasilkan mikrobia. Streptomisin, penisilin, eritromisin, vancomisin dan daptomisin (Peláez, 2005) merupakan contoh metabolit yang dihasilkan mikrobia dan telah dikomersilkan mendunia dengan nama merk dagang berbeda. Tercatat lebih dari 69.000 spesies fungi dari 5.100 genus, 3.600 spesies bakteri dari 700 genus telah dilaporkan. Jumlah spesies ini cukup kecil akan tetapi mampu memberikan kontribusi signifikan pada berbagai bidang.

Untuk mempelajari mikroorganisme diperlukan pengetahuan yang komprehensif tentang biokimiawi atau aktivitas metabolik dari mikrobia tersebut karena menurut Cánovas & Iborra (2003) sifat biokimiawi terkait dengan komposisi kimia, reaksi kimia dan karakteristik khas metabolisme yang terjadi pada jasad hidup tertentu sehingga dengan mengetahuinya dapat dieksplorasi manfaatnya.

Terdapat keterkaitan antara biokimiawi dengan *culture collection*. Kultur yang disimpan dapat dikaji lebih mendalam aktivitas metaboliknya sehingga potensial untuk dilakukan manipulasi gen atau diaplikasikan langsung misal dalam bioproses

untuk menghasilkan produk tertentu. Usaha *maintenance* dan preservasi kultur dibutuhkan komitmen dan kerja keras karena kemampuan metabolik kultur dan keotentikannya harus terjaga dengan baik.

Preservasi mikroba untuk keperluan jangka pendek maupun panjang merupakan tahapan crucial dalam mengkaji mikrobiologi dalam rangka memelihara dan menjaga aktivitas metaboliknya tidak berubah. Menurut Machmoed (2001), tujuan dilakukan preservasi adalah untuk menahan laju aktivitas metabolisme mikroba sehingga viabilitas atau daya tumbuhnya dapat dipertahankan dan juga untuk memelihara isolat mikroba sehingga mempunyai *recovery* (daya tumbuh kembali) dan kelangsungan hidup yang tinggi dengan perubahan karakter yang minimum. Metode preservasi ditentukan oleh sifat mikroba dan juga preservasi (Machmoed, 2001). Lebih lanjut dijelaskan Machmoed bahwa sifat mikroba meliputi ciri morfologi, ciri fisiologis dan biokimia dan kemampuan mikroba untuk hidup pada lingkungan alami maupun buatan. Oleh karena itu tujuan preservasi untuk jangka pendek atau jangka panjang perlu disesuaikan dengan tujuan dari program yang akan dirancang (Machmoed, 2001).

Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan untuk kepentingan rutin di lab misal untuk penelitian dan praktikum. Caranya adalah dengan memindahkan mikroba dari media lama ke media baru dan dilakukan secara rutin misal sebulan sekali. Adapun preservasi jangka panjang diperlukan *cryoprotectant agent* sebagai pelindung sel selama proses penyimpanann dalam freezer dengan suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Menurut Badjoeri (2010) *cryoprotectant agent* yang ditambahkan pada kultur sel akan menjaga sel dari penyimpanan dengan suhu ekstrim (sangat dingin) dan meminimalisir kerusakan sel selama pembekuan. Beberapa agensia *cryoprotective* seperti dimethylsulfoxide ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), gliserol, DMSO, dan polyvinylpyrrolidone (PVP).

Saat ini preservasi mikroba untuk jangka panjang telah dilakukan di beberapa Laboratorium Mikrobiologi tidak terkecuali di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains

dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga. *Cryoprotectant* agent yang seringkali digunakan adalah gliserol yang dikombinasi dengan skim milk karena gliserol tidak toksik dan penambahan skim milk sebagai *protective additive* dapat mendukung efektivitas penyimpanan. Akan tetapi pemilihan jenis *cryoprotectant* dan *protective additive* ini perlu dikembangkan lebih lanjut mengingat jenis sel mikroba yang dikoleksi Lab Mikrobiologi cukup beragam dari jenis bakteri dan kapang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas atau daya hidup sel bakteri koleksi Lab Mikrobiologi dengan agensia *cryoprotectant* berbeda.

Inisiasi pembuatan *culture collection* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga dimulai sejak 2012 (Ainy *et al.*, 2012). Keberadaannya sangat membantu dalam kegiatan praktikum maupun penelitian karena digunakan sebagai *reference strain* sehingga memperlancar proses kegiatan tersebut. Untuk memelihara koleksi kultur tersebut diperlukan teknik penyimpanan yang sesuai dengan sarana dan prasarana yang ada di laboratorium. Laboratorium di Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga telah dilengkapi dengan *freezer* dengan suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  sehingga memungkinkan apabila dilakukan metode penyimpanan jangka panjang.

## METODE

**Preparasi kultur.** Kultur yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Shigella flexneri* ATCC 12022 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Umum UGM, dan *Bacillus subtilis* ATCC 6051 diperoleh dari Lab Bioteknologi UGM. Isolat diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam.

**Purifikasi isolat.** Isolat bakteri di purifikasi beberapa kali menggunakan media NA. Pengamatan kemurnian isolat dilakukan dengan pengecatan Gram. Isolat dikatakan murni apabila memiliki reaksi Gram dan bentuk sel yang seragam.

## Preparasi *Cryoprotectant agents*:

Penelitian menggunakan tiga agensia *Cryoprotectant* yaitu gliserol, skim milk dan DMSO. Ketiga jenis *cryoprotectant* tersebut akan di kombinasikan yaitu gliserol:skim milk dan DMSO:skim milk (dengan perbandingan 1:1). Konsentrasi gliserol dan DMSO dibuat 10% (Machmoed, 2001), skim milk 10% (Rahayu, 2003).

**Preparasi pelet sel bakteri.** Kultur cair bakteri (umur 24-48 jam) di masukkan pada microtube 1.5ml dan di sentrifuge selama 15 menit (12,000 rpm). Supernatan di buang dan pelet sel di cuci dengan akuades steril selama 2 kali. Setiap isolat di siapkan masing-masing 5 microtube.

## Penambahan *cryoprotectant agents*.

Setiap *microtube* (isi pelet sel) ditambahkan *cryoprotectant* dengan volume total 1 ml dengan rancangan perlakuan sebagai berikut:

1. Microtube 1: ditambahkan 1 ml gliserol 10%
2. Microtube 2: ditambahkan 1 ml DMSO 10%
3. Microtube 3: ditambahkan skim milk 10%
4. Microtube 4: ditambahkan 0.5 ml gliserol 10% - 0.5 ml skim milk 10%
5. Microtube 5: ditambahkan 0.5 ml DMSO 10% - 0.5 ml skim milk 10%

**Penyimpanan dalam freezer.** Microtube yang berisi pelet dan *cryoprotectant* selanjutnya di simpan dalam *freezer*  $-80^{\circ}\text{C}$ . Secara periodik (satu bulan sekali) di uji daya viabilitasnya.

**Uji viabilitas sel.** Uji viabilitas dilakukan dengan enumerasi melalui serangkaian seri pengenceran (Harley & Prescott, 2001). Pengujian di lakukan dengan cara mengambil 0.2ml (200 $\mu$ l) kultur dari *freezer* selanjutnya di inokulasikan pada media NB. Inkubasikan selama 24-48 jam (suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ). Selanjutnya diambil 1ml kultur dan dimasukkan pada 9ml akuades steril (nilai pengenceran  $10^{-1}$ ), diambil 1ml dari pengenceran sebelumnya dan dimasukkan pada 9ml akuades steril (nilai pengenceran  $10^{-2}$ ). Pengenceran dilakukan hingga diperoleh nilai pengenceran  $10^{-6}$ . Dari pengenceran  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  masing-masing di ambil 1ml dan diinokulasikan pada media NA

melalui metode *pour plate*. Plate kemudian diinkubasikan (suhu 37°C; 24-48 jam). Hasil jumlah koloni yang telah dihitung dibandingkan dengan perlakuan penambahan *cryoprotectant* berbeda.

## HASIL

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap daya hidup sel (viabilitas) melalui perhitungan jumlah koloni pada media NA tampak pada beberapa perlakuan tidak berbeda jumlah koloninya, tetapi pada perlakuan lainnya jumlah koloni mengalami penurunan pada periode sampling hari ke-60. Jumlah koloni starter awal sebelum perlakuan dan data hasil perhitungan jumlah koloni sel bakteri setelah masa penyimpanan dua bulan (60 hari) disajikan pada Tabel 1. dan Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2 tampak bahwa jumlah koloni setiap sel bakteri uji bervariasi setelah masa simpan 30 hari dan 60 hari. Secara keseluruhan diketahui bahwa perlakuan penyimpanan dengan gliserol 10% (perlakuan 1), skim milk 10% (perlakuan 3) dan kombinasi 10% DMSO : 10% gliserol (perlakuan 5) memberikan daya viabilitas lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya.

Viabilitas bakteri *E. coli* setelah masa simpan 30 hari dan 60 hari paling baik jika digunakan agen *cryoprotectant* skim milk meski dengan selisih jumlah koloni awal dan setelah disimpan relatif besar yaitu dari  $3,82 \times 10^7$  cfu/ml dan setelah 60 hari masa simpan menurun menjadi  $2,48 \times 10^7$  cfu/ml. Selisih starter awal dan setelah masa simpan untuk bakteri uji lain relatif sama.

Tabel 1. Jumlah koloni awal bakteri uji sebelum perlakuan

Bakteri	Jumlah koloni (cfu/ml)
<i>B. subtilis</i>	$1,50 \times 10^8$
<i>E. coli</i>	$3,82 \times 10^7$
<i>S. flexneri</i>	$1,64 \times 10^7$
<i>S. aureus</i>	$2,28 \times 10^7$

Tabel 2. Jumlah koloni bakteri uji setelah masa simpan 60 hari pada freezer -80°C dengan perlakuan berbeda.

Bakteri Uji	Perlakuan	Jumlah koloni (cfu/ml) hari ke-	
		30	60
<i>E. coli</i>	1	$2,88 \times 10^7$	$2,62 \times 10^7$
	2	$1,92 \times 10^8$	$2,89 \times 10^7$
	3	$1,64 \times 10^7$	$2,48 \times 10^7$
	4	$2,44 \times 10^7$	$2,65 \times 10^7$
	5	$1,52 \times 10^8$	$2,67 \times 10^7$
<i>B. subtilis</i>	1	$2,72 \times 10^8$	$1,41 \times 10^7$
	2	$1,09 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$
	3	$3 \times 10^7$	$2,23 \times 10^8$
	4	$8,1 \times 10^7$	$2,49 \times 10^7$
	5	$1,55 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
<i>S. aureus</i>	1	$9,65 \times 10^6$	$1,95 \times 10^7$
	2	$2,93 \times 10^7$	$2,73 \times 10^7$
	3	$2,89 \times 10^7$	$2,92 \times 10^7$
	4	$2,16 \times 10^7$	$2,73 \times 10^7$
	5	$1,39 \times 10^8$	$2,36 \times 10^7$
<i>S. flexneri</i>	1	$2,73 \times 10^7$	$2,64 \times 10^7$
	2	$1,98 \times 10^7$	$1,31 \times 10^7$
	3	$2,58 \times 10^8$	$1,99 \times 10^7$
	4	$1,74 \times 10^7$	$1,60 \times 10^7$
	5	$2,96 \times 10^7$	$2,36 \times 10^7$

## PEMBAHASAN

Agensia *cryoprotectant* yang digunakan dalam penelitian ini memberikan daya viabilitas sel yang bervariasi. Untuk bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* agensia skim milk merupakan agensia *cryoprotectant* paling baik. Penggunaan skim milk sebagai *cryoprotectant* telah banyak dilaporkan (Rathnayaka, 2013; Trši -Milanovi *et al.*, 2001; Cody *et al.*, 2008). Umumnya skim milk paling baik sebagai *cryopreserve* untuk anggota bakteri asam laktat atau BAL (Hubálek, 2003). Rathnayaka (2013) melaporkan anggota genus BAL *Lactobacillus rhamnosus* dan *L. plantarum* menunjukkan daya viabilitas paling unggul setelah di simpan dalam UHT milk saja tanpa campuran agensia *cryoprotectant* lainnya seperti trehalose, sorbitol dan sukrosa. Penggunaan skim milk 10% sebagai *cryoprotectant* telah direkomendasikan oleh Cody *et al.* (2008) karena berdasarkan hasil penelitiannya, skim milk 10% memberikan daya viabilitas tinggi pada beberapa bakteri yang diujikan antara lain *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *P. putida*, *Klebsiella pneumonia* dan beberapa bakteri lainnya.

Skim milk 10% sebagai *cryoprotectant* sel bakteri dikatakan lebih unggul dalam mempertahankan daya hidup sel dibandingkan gliserol 15% (Cody *et al.*, 2008), hal ini di dimungkinkan karena adanya efek dari skim milk terhadap kandungan asam lemak yang terdapat pada membran sel sehingga mengubah fluiditas membran (Carvalho *et al.*, 2004 *cit* Cody *et al.*, 2008), mungkin juga di sebabkan adanya kalsium (Ca) pada skim milk yang berkontribusi terhadap enzim selular (Barach *et al.*, 1976 *cit* Cody *et al.*, 2008).

Bakteri uji *B. subtilis* menunjukkan kenaikan jumlah koloni setelah 60 hari masa simpan di freezer -80°C dengan *cryoprotectant* kombinasi 10% DMSO : 10% skim milk yang semula  $1,55 \times 10^7$  cfu/ml naik menjadi  $2,9 \times 10^7$  cfu/ml (Tabel 2). Menurut Rojas-Tapias *et al.*, (2013) DMSO dan gliserol merupakan agensia *cryoprotectant* yang dapat mereduksi *eutentic point* air

sehingga mencegah terjadinya pembentukan kristal es yang dapat berakibat pada terbentuknya *intracellular ice*. Akan tetapi pemilihan *cryoprotectant* tergantung tipe sel yang di simpan. DMSO lebih mudah berpenetrasi ke dalam sel dan biasanya lebih banyak digunakan untuk sel-sel yang lebih kompleks seperti protista (Simione, 2009). Agensia DMSO mampu menjadikan membran sel lebih plastis sehingga dapat mengikat air dalam sel secara *colligative* yang pada akhirnya akan mencegah dehidrasi sel, mereduksi sifat racun garam dan mencegah terbentuknya kristal es dalam sel (Hubálek, 2003).

Bakteri *S. aureus* menunjukkan daya viabilitas tinggi ketika di simpan pada agensia *cryoprotectant* 10% gliserol (Tabel 2). Hubálek (2003) telah merangkum beberapa hasil penelitian yang melaporkan bahwa pemilihan gliserol sebagai *cryoprotectant* harus disesuaikan dengan tipe sel yang akan di simpan. Gliserol memiliki daya protektif rendah terhadap bakteri genus *Methylococcus*, *Methylomonas* dan *Methylocystic* (Green *et al.*, 1992 *cit* Hubálek, 2003), tetapi memiliki daya viabilitas tinggi terhadap *Leptospira interrogans* (Stalheim, 1971 *cit* Hubálek, 2003). Trši -Milanovi *et al.* (2001) melaporkan bahwa *Bifidobacterium breve* A71 memiliki daya survival tinggi ketika di simpan dalam *cryoprotectant* kombinasi 5% lakotas:1,5% 1% gelatin:gliserol) dengan persentase survival 83,3%. Gliserol merupakan agensia *cryoprotectant* yang dapat mencegah sel rusak karena adanya proses *freezing*.

Gliserol dan DMSO secara luas telah dikenal dan dimanfaatkan sebagai *cryoprotectant* sel bakteri melalui metode simpan beku (*freezing storage*) karena mampu meminimalisir efek larutan yang dapat menyebabkan terbentuknya kristal es dalam sel (Park *et al.*, 2001). Penetrasi agensia *cryoprotectant* ke dalam sel akan menstimulasi pembentukan struktur kristalin es halus (*quasiamorphous*) selanjutnya membentuk fase *gel-type glass* di bawah *eutectic point* sehingga hal ini akan mencegah

dari kerusakan hyperosmotik terhadap sel atau dikenal dengan efek larutan (*solution effects*) (Hubálek, 2003).

Konsentrasi agensia *cryoprotectant* akan berpengaruh pada viskositasnya. Pop *et al.*, (2015) melaporkan bahwa 40% gliserol tidak efisien untuk digunakan sebagai *cryoprotectant* sel bakteri *Bifidobacterium lactis* 300B karena viskositasnya tinggi. DMSO dan gliserol umumnya digunakan pada konsentrasi 5 – 10% (v/v) (Simione, 2009). Susu skim (susu bebas lemak padat) pada konsentrasi 1 – 10% (rata-rata 10%), kadang juga dikombinasikan dengan *cryoprotectant* yang lain (Hubálek, 2003).

Metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan adalah metode liofilisasi atau kering beku (*liophilization* atau *freeze drying*) dan kriopreservasi (*cryopreservation* atau *cryogenic preservation*) (Badjoeri, 2010; Machmoed, 2001). Kedua teknik tersebut dilaporkan paling berhasil untuk penyimpanan jangka panjang berbagai mikroba. Pemilihan metode preservasi sangat ditentukan oleh jenis mikroba dan tujuan preservasi (Machmoed, 2001). Metode yang dipilih ini harus dapat mempertahankan sifat sel mikroba, sifat genetiknya tetap stabil, hemat biaya serta tenaga (Machmoed, 2001).

## KESIMPULAN

Lima perlakuan agensia *cryoprotectant* yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan daya viabilitas sel yang relatif bervariasi. Akan tetapi secara keseluruhan kelima perlakuan tersebut dapat di gunakan. Penggunaan 10% skim milk, 10% gliserol dan kombinasi 10% DMSO: 10% skim milk dapat direkomendasikan untuk di gunakan sebagai referensi simpan beku (*freezing*) sel bakteri di Lab Mikrobiologi. Akan tetapi tetap harus dengan mempertimbangkan jenis sel mikroba yang akan di preservasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana atas pendanaan yang disediakan oleh LPPM UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta melalui skema Hibah Penelitian Pengembangan Berbasis-

Kompetensi Integrasi-Interkoneksi Tahun Anggaran 2015.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ainy EQ, Susilawati L and Susiawati E. 2015. Pioneering of *Culture Collection* in Microbiology Laboratory (As a Means to Provide *Reference Strains* on Microbial Research). *Integrated Lab Journal*. vol 03(01): 30-38.
- Badjoeri M. 2010. Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma Nutfah. *Warta Limnologi Tahun XXIII No. 45*: 1-9.
- Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, Nickerson CA and Schurr MJ. 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *J Microbiol Methods*. vol 75(1): 135–138.
- Cánovas M and Jose L Iborra. 2003. Culture Collection and Biochemistry. *Int. Microbiol.* (6): 105-112.
- Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. (46): 205-229.
- Harley JP and Prescott LM. 2001. *Laboratory Exercise in Microbiology* fifth edition. The McGraw-Hill Companies.
- Machmoed M. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikrobial. *Buletin Agri Bio*. (4): 24-32.
- Park SH, Sang Lee H and Kum Lee H. 2001. Preservation of Marine Heterotropic Bacteria by Using a Deep-freezing Method. *The Journal of Microbiology*. vol 39 (3): 240-243.
- Peláez F. 2006. The Historical delivery of Antibiotics from Microbial Natural Products-can history repeat?. *Biochem Pharm.* (71): 981-990.
- Pop OL, Diaconeasa Z, Brandau T, Cuizan O, Pamfil D, Vodnar DC and Socaciu C. 2015. Effect of glycerol, as cryoprotectant in the encapsulation and Freeze Drying of Microspheres Containing Probiotic Cells. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*. vol 72 (1): 27-32.
- Rojas-Tapias D, Ortiz-Vera M, Rivera D, Kloepper J and Bonnilai R. 2013.

- Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Univ. Scientarum Journal of the Faculty of sciences*. vol 18(2): 129-139.
- Rathnayaka K. 2013. Effect of freeze-drying on viability and probiotic properties of a mixture of probiotic bacteria. *Journal of Science and Technology*. vol 3(11): 1074.
- Rahayu ES. 2003. Lactic Acid Bacteria in fermented foods of Indonesian origin. *Agritech*. vol 23 (22): 75-84.
- Satyanarayana. 2005. Microbial Diversity. *Current Science* (89): 926-928.
- Sembiring L. 2004. *Sistematika Mikrobia Sebagai Sarana Penyingkap Keanekaragaman Mikrobia Dalam Upaya Pelestarian dan Pemanfaatan Sumberdaya Hayati Mikrobia*. Disampaikan pada seminar nasional Biologi “peranan biosistematika dalam menunjang pemanfaatan keanekaragaman hayati” 25 September 2004. Surabaya: ITS.
- Simione PF. 1998. *Preservation Manual*. Nalge Nunc International Corp.
- Tršić-Milanović N., A. Kodrić J. Baras & S. Dimitrijević-Branković. 2001. The Influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. *J. Serb. Chem. Soc.* vol 66 (7): 435-441.
- Yanti N, Arfa, Sembiring L dan Margino S. 2009. Production of Poly- $\gamma$ -hydroxybutyrate (PHB) from Sago Starch by the Native Isolate *Bacillus megaterium* PSA10. *Indonesian Journal of Biotechnology* (14): 1111-1116.