Wahana-Bio: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya
ISSN 2085-8531 (*print*); ISSN 2721-5946 (*online*)
Volume 16, Nomor 1, Tahun 2024, Hal. 54 – 61
Available online at:
https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/wb

Viabilitas Sel Hasil Preservasi Suspensi dan Pelet *Staphylococcus aureus* Menggunakan Medium Base Gliserol

Rasyidah[1*], Rini Fariani [2],
Program Studi Biologi, FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru
*Surel penanggung jawab tulisan: rasyidah@ulm.ac.id

Article History
Received: 09 November 2023. Received in revised form: 20 April 2024.
Accepted: 13 May 2024. Available online: 23 May 2024.

Abstrak. Penyimpanan (*preservasi*) bertujuan untuk koleksi kultur dan konservasi stok mikroorganisme. Tujuan penelitian ini untuk menguji viabilitas atau kemampuan hidup sel bakteri dengan komposisi *cryprotectant agent* berbeda . Jenis cryprotectant agent yang digunakan yaitu medium base gliserol 10%, 30% dan 50%. Penelitian ini dilakukan untuk preservasi dalam bentuk suspensi dan pellet bakteri *Staphylococcus aureus* selama 30-180 hari yang disimpan dalam freezer kulkas suhu 4^0 C. Setiap 30 hari dilakukan uji viabilitas menggunakan metode *Plate Count* yang ditumbuhkan pada medium *Mueller Hinton Agar*. Hasil uji *Kruskal Wallis* dan *One Way Anova preservasi* suspensi menunjukkan waktu yang efektif adalah hari ke 30 pada konsentrasi gliserol 30% nilai *viabilitas* sel 1,5 x 10^6 CFU/ml dan maksimal 120 hari nilai *viabilitas* sel 1,4 x 10^6 CFU/ml. Uji *One Way Anova* untuk waktu *preservasi* pellet bakteri yang terbaik adalah 30 hari konsentrasi gliserol 50% memiliki nilai *viabilitas* 1,4 x 10^6 CFU/ml. Dari hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara *preservasi* menggunakan suspensi dan pellet, akan tetapi *preservasi* suspensi memiliki nilai rata-rata *viabilitas* sel lebih tinggi.

Kata Kunci: *base gliserol*, *cryprotectan agent, koleksi kultur, preservasi, viabilitas*

Abstract*. The aims of storage (preservation) as to culture collection and conserve stocks of microorganisms. The aim of this research was to determine the viability of bacterial cells on different cryprotectant agent. Three kind of cryprotectant agent glycerol base medium were applied to evaluatethe ability of bacteria growth in Agar medium. Isolat were used namely Staphylococcus aureus was preserved in 10%, 30% and 50% at 4^0 C for 180 days Immediately after preserved the bacteria was tested the viability at day 30 until 180 during storage. The enumeration of samples taken from cultures ini Mueller Hinton Agar. The results of the Kruskal Wallis and One Way Anova suspension preservation tests showed the effective time was day 30 at a glycerol concentration of 30%, the cell viability was 1.5 x 10^6 CFU/ml and a maximum of 120 days, the cell viability was 1.4 x 10^6 CFU/ml. The One Way Anova test for the best preservation time for bacterial pellets is 30 days with a 50% glycerol concentration which has a viability of 1.4 x 10^6 CFU/ml. The results of the Kruskal Wallis test show that there is no real difference between preservation using suspension and pellets, however, suspension preservation has a higher average cell viability.*

Keywords: *base glycerol, cryprotectant agent, culture collection, preservation, viability*

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

1. PENDAHULUAN

Pemeliharaan mikroba merupakan kunci penting dalam bidang mikrobiologi (Kusmiati & Priadi, 2003) sehingga perlu pengetahuan tentang sifat biokimiawi dan aktivitas metabolik mikroba tersebut (Susilawati & Purnomo, 2016) agar dapat dieksplorasi manfaatnya (Canovas & Iborra, 2003). Sifat biokimiawi mempunyai keterkaitan dengan koleksi kultur (*culture collection*). Pemeliharaan mikroba untuk keperluan tahap jangka pendek maupun panjang merupakan tahapan penting untuk mempelajari bidang mikrobiologi dalam rangka menjaga aktiitas metaboliknya tidak berubah (Susilawati & Purnomo, 2016). Machmud (2001) menyebutkan bahwa pemeliharaan (preservasi) bertujuan untuk menahan laju aktivitas mikroba, sehingga daya tumbuh (viabilitas) dapat dipertahankan dan untuk memelihara isolat agar daya tumbuh (*recovery*) dan kelangsungan hidupnya tidak mengalami perubahan yang signifikan. Metode preservasi ditentukan oleh sifat mikroba, antara lain adalah ciri morfologi, ciri fisiologis, biokimia, dan kemampuan untuk tumbuh di lingkungan alami maupun buatan (Machmud, 2001).

Penyimpanan (*preservasi*) kultur mikroba yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi saat ini menggunakan cara penyimpanan jangka pendek, yaitu dengan memindahkan kultur secara berkala ke medium yang baru. Hal ini masih terkendala karena tidak semua dapat dilakukan oleh tenaga yang terbatas, serta memerlukan medium yang banyak. Penyimpanan kultur dalam jangka pendek biasanya dilakukan untuk kegiatan yang bersifat rutin yaitu pendidikan dan penelitian yang sedang berlangsung. Kendala yang sering dihadapi pada saat kegiatan sudah selesai adalah kultur harus dipertahankan agar tetap hidup dan tidak rusak, sehingga perlu dilakukan penyimpanan jangka menengah atau panjang.

Penyimpanan jangka menengah dan panjang diperlukan agar apabila suatu saat mikroorganisme tersebut digunakan kembali diharapkan mempunyai kemampuan hidup yang tetap sama dengan kondisi sebelumnya. Preservasi jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi stok mikroorganisme dengan tujuan apabila suatu saat diperlukan, dapat ditumbuhkan kembali dan tetap memiliki kinerja seperti semula. Penyimpanan mikroorganisme pada prinsipnya adalah menghentikan atau mengurangi laju penggunaan energi sel selama masa simpan sehingga dapat diaktifkan kembali karena masih memiliki energi sel yang cukup atau *viabel* (Najmiyati & Akhadi, 2012).

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengetahui *viabilitas* sel *Staphylococcus aureus* setelah *preservasi* selama 6 bulan menggunakan medium *base* gliserol dengan konsentrasi berbeda. Hasil ini diharapkan dapat bermanfaat bagi laboratorium khususnya mikrobiologi dalam melakukan preservasi bakteri sehingga ketersediaannya selalu terjaga dan *viabilitas* selnya diharapkan tidak berubah.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Preparasi Kultur

Kultur yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus.* Isolat bakteri dikultur dalam medium Mueller Hinton Agar (MHA) kemudian diinkubasi 2 x 24 jam pada suhu 37^0 C.

2.2 Preparasi *Cryprotectant Agents*

Membuat Mueller Hinton Broth (MHB) sebagai medium pertumbuhan bakteri. Menyiapkan medium base gliserol steril dalam tabung falcon , yaitu dengan menambahkan konsentrasi gliserol 10%, 30% dan 50% dalam MHB.

2.3 Preparasi dan Preservasi Pelet Bakteri

Isolat yang sudah dikultur dalam medium agar kemudian dipindahkan ke dalam medium Mueller Hinton Broth (MHB) kemudian diinkubasi 24- 48 jam. Setelah dikultur selama 48 jam dipindahkan dalam 5 microtube 1,5 ml dan disentrifuge menggunakan microsentrifuge suhu 4^0 C selama 15 menit (12.000 rpm). Supernatan dibuang dan pellet sel dicuci dengan menggunakan akuades steril sebanyak 2x. Pelet sel ditambahkan *cryprotectant agent* sebanyak 1 ml dengan rancangan perlakuan sebagai berikut :

Microtube 1 : ditambahkan 1 ml gliserol 10 %
Microtube 2 : ditambahkan 1 ml gliserol 30%
Microtube 3 : ditambahkan 1 ml gliserol 50 %

Microtube yang berisi pellet dan *cryprotectant* disimpan dalam freezer suhu 4^0 C. Secara periodik dilakukan uji *viabilitas*.

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

2.4 Preparasi dan Preservasi Suspensi Bakteri

Isolat yang sudah dikultur dalam medium agar kemudian dipindahkan ke dalam medium Mueller Hinton Broth (MHB) kemudian diinkubasi 24- 48 jam. Setelah dikultur 48 jam suspensi dipindahkan dalam 5 microtube 1,5 ml sebanyak 0,5 ml. Suspensi bakteri ditambahkan *cryprotectant agent* sebanyak 0,5 ml dengan rancangan perlakuan sebagai berikut :

Microtube 1 : ditambahkan 0,5 ml gliserol 10 %

Microtube 2 : ditambahkan 0,5 ml gliserol 30%

Microtube 3 : ditambahkan 0,5 ml gliserol 50 %

Microtube yang berisi suspensi dan *cryprotectant* disimpan dalam freezer suhu 4^0 C. Secara periodik dilakukan uji *viabilitas*.

2.5 Uji Viabilitas Sel

Kultur bakteri sebanyak 0,2 ml diinokulasikan ke dalam 9 ml medium MHB kemudian diinkubasi pada suhu 37^0 C selama 24-48 jam. Setelah 48 jam, 1 ml kultur dari medium MHB dimasukkan dalam 9 ml larutan fisiologis dengan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-6}. Hasil pengenceran 1 ml diambil dan diinokulasikan ke dalam medium MHA dimulai dari pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} dengan metode pour plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37^0 C selama 24-48 jam. Kemudian jumlah koloni dihitung pada setiap perlakuan *cryprotectant.* Jumlah minimum sel hidup dihitung dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel (CFU/ml)} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \qquad (1)$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Preservasi suspensi dari bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan medium *base* gliserol dengan konsentrasi dan waktu yang berbeda pada penelitian ini menghasilkan *viabilitas* sel bervariasi pada setiap perlakuan (Tabel 1). *Viabilitas* sel pada *preservasi* suspensi bakteri menggunakan konsentrasi gliserol 10% hari ke 30 yaitu 8,7 x 10^5 CFU/ml kemudian menurun pada hari ke 60 yaitu 5,2 x 10^5 CFU/ml dan peningkatan *viabilitas* sel kembali pada *preservasi* hari ke 90 dan 120 hari berturut-turut 1,3 x 10^6 CFU/ml dan 1,9 x 10^6 CFU/ml. Penurunan *viabilitas* sel terjadi berulang pada hari ke 150 dan 180 hari dan yang paling rendah pada hari ke 180

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

yaitu 4,3 x 10^5 CFU/ml. *Viabilitas* sel pada *preservasi* suspensi bakteri menggunakan konsentrasi gliserol 50% pada hari ke 30 yaitu 1,1 x 10^6 CFU/ml dan terjadi penurunan pada hari ke 60 dan mengalami peningkatan kembali pad hari ke 90 dan 120 hari secara berurutan yaitu 1,3 x 10^6 CFU/ml dan 2,1 x 10^6 CFU/ml dan nilainya turun kembali pada hari ke 150 dan 180. *Preservasi* suspensi bakteri menggunakan gliserol 30% waktu 30 hari paling tinggi dibandingkan konsentrasi 10% dan 50 % yaitu 1,5 x 10^6 CFU/ml, kemudian pada hari ke 60 *viabilitas* sel menurun pada semua konsentrasi, akan tetapi konsentrasi gliserol 30% masih paling tinggi yaitu 6,4 x 10^5 CFU/ml. Hari ke 90 viabilitas sel naik yaitu 1,8 x 10^6 CFU/ml dan hari ke 120, 150 dan 180 hari semua *viabilitas* sel turun.

Tabel 1. Viabilitas Jumlah Sel Preservasi Suspensi *Staphylococcus aureus*

Waktu (Hari)	Preservasi	*Cryprotectant Agent*	Jumlah Sel (CFU/ml)
30		Gliserol 10%	8,7 x 10^5
		Gliserol 30%	1,5 x 10^6
		Gliserol 50 %	1,1 x 10^6
60		Gliserol 10%	5,2 x 10^5
		Gliserol 30%	6,4 x 10^5
		Gliserol 50 %	2,6 x 10^5
90		Gliserol 10%	1,3 x 10^6
		Gliserol 30%	1,8 x 10^6
		Gliserol 50 %	1,3 x 10^6
120		Gliserol 10%	1,9 x 10^6
		Gliserol 30%	1,4 x 10^6
		Gliserol 50 %	2,1 x 10^6
150		Gliserol 10%	5,6 x 10^5
		Gliserol 30%	3,8 x 10^5
		Gliserol 50 %	4,3 x 10^5
180		Gliserol 10%	4,3 x 10^5
		Gliserol 30%	4,3 x 10^5
		Gliserol 50 %	5,7 x 10^5

Hasil perlakuan preservasi suspensi menunjukkan semua perlakuan konsentrasi terjadi penurunan viabilitas sel pada hari ke 60. Penurunan viabilitas menunjukkan bahwa pada hari ke 60 bakteri mampu mempertahankan viabilitasnya karena cadangan nutrisi medium yang digunakan terpenuhi. Hal ini selaras dengan hasil penelitian (Advinda *et* al., 2015). Nutrisi yang terkandung dalam medium digunakan sebagai sumber energi untuk pembentukan dinding sel dan metabolisme bakteri (Jarod, 2015). Pada hari ke 60 ini juga diduga pertumbuhan bakteri berada pada fase lag atau adaptasi. Peningkatan viabilitas sel terjadi pada hari ke 90 dan 120 hari dimana pertumbuhan bakteri berada pada fase logaritma atau exponensial yaitu sel bakteri membelah dengan cepat dan konstan. Peningkatan jumlah sel

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

bakteri antara lain dipengaruhi oleh sifat mikroba, kandungan nutrisi dalam media dan temperatur (Suriawiria, 2005). Kemudian pada hari ke 150 dan 180 semua perlakuan viabilitas selnya menurun, dimana pada kondisi ini bakteri berada di fase stasioner dan kematian.

Untuk mengetahui pengaruh waktu *preservasi* suspensi bakteri terhadap *viabilitas* sel dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan hasilnya menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara waktu *preservasi* terhadap *viabilitas* sel. Waktu yang paling efektif digunakan adalah 30 hari dan waktu maksimal untuk *preservasi* adalah 120 hari. Untuk mengetahui *cryprotectant agent* yang baik digunakan untuk *preservasi* suspensi bakteri maka dilakukan uji *One Way Anova* dan hasilnya tidak ada perbedaan nyata *cryprotectant agent* yang digunakan, akan tetapi hasilnya menunjukkan konsentrasi gliserol 30% memiliki nilai rata-rata paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 10% dan 50%.

Preservasi pellet bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan medium *base* gliserol dengan konsentrasi dan waktu yang berbeda pada penelitian ini menghasilkan *viabilitas* sel bervariasi pada setiap perlakuan (Tabel 2). *Viabilitas* sel pada semua konsentrasi lebih stabil dari hari ke 30 dan 60. Viabilitas sel mengalami penurunan pada hari ke 90 dan 120 yang berarti pada waktu preservasi ini bakteri berada pada fase lag atau adaptasi. Jumlah sel meningkat pada hari ke 150 dan 180, dimana bakteri berada pada fase logaritmik. Konsentrasi gliserol 50% memiliki nilai viabilitas yang paling tinggi dibandingkan 10% dan 30% terutama pada hari ke 30 yaitu 1,4 x 10^6 CFU/ml.

Tabel 2. Viabilitas Jumlah Sel Preservasi Pellet *Staphylococcus aureus*

Waktu (Hari)	Preservasi	*Cryprotectant Agent*	Jumlah Sel (CFU/ml)
30		Gliserol 10%	1,1 x 10^6
		Gliserol 30%	1,1 x 10^6
		Gliserol 50 %	1,4 x 10^6
60		Gliserol 10%	1,1 x 10^6
		Gliserol 30%	1,2 x 10^6
		Gliserol 50 %	7,1 x 10^5
90		Gliserol 10%	5,7 x 10^5
		Gliserol 30%	2,6 x 10^5
		Gliserol 50 %	8,8 x 10^5
120		Gliserol 10%	3,8 x 10^5
		Gliserol 30%	5,3 x 10^5
		Gliserol 50 %	3,1 x 10^5
150		Gliserol 10%	1,0 x 10^6
		Gliserol 30%	8,4 x 10^5

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

	Gliserol 50 %	$1,2 \times 10^6$
180	Gliserol 10%	$8,3 \times 10^5$
	Gliserol 30%	$1,0 \times 10^6$
	Gliserol 50 %	$1,3 \times 10^6$

Untuk mengetahui pengaruh waktu *preservasi* pellet bakteri terhadap *viabilitas* sel dan *cryprotectant agent* yang baik digunakan maka dilakukan uji *One Way Anova*. Hasilnya menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara waktu *preservasi* terhadap *viabilitas* sel dan waktu yang terbaik digunakan adalah 30 hari. *Cryprotectant agent* yang digunakan tidak ada perbedaan signifikan pada semua konsentrasi, akan tetapi hasilnya menunjukkan konsentrasi gliserol 50% memiliki nilai rata-rata paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 10% dan 30%.

Untuk mengetahui *preservasi* suspensi atau pellet yang lebih baik maka dilakukan uji *Kruskal Wallis.* Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara *preservasi* menggunakan suspensi dan pellet, namun *preservasi* suspensi memiliki nilai rata-rata *viabilitas* sel lebih tinggi. Berdasarkan hal ini, maka untuk preservasi bakteri bisa dilakukan dengan menggunakan suspensi atau pellet bakteri dengan menyesuaikan kondisi yang ada di laboratorium.

Penggunaan gliserol sebagai cryprotectant agent bertujuan untuk mencegah kerusakan sel bakteri saat preservasi. Pada penelitian ini konsentrasi gliserol yang baik digunakan yaitu 30% untuk preservasi suspensi bakteri dan 50% untuk preservasi pellet bakteri. Gliserol secara umum digunakan untuk pengawetan atau penyimpanan jangka panjang dan juga dapat digunakan untuk media tumbuh mikroorganisme, karena gliserol dapat meningkatkan stabilitas struktur protein dari mikroba sehingga mampu mencegah protein dari proses termal dan agregasi. Gliserol dan DMSO telah banyak dimanfaatkan sebagai cryprotectant sel bakteri dengan metode simpan beku (*freezing storage*) karena kemampuannya dalam meminimalisir terbentuknya kristal es dalam sel (Park *et al*., 2001).

4. SIMPULAN

Dari 3 perlakuan konsentrasi gliserol 10%, 30%, dan 50% yang digunakan pada preservasi suspensi selama 30-180 hari menunjukkan waktu yang efektif adalah hari ke 30 pada konsentrasi gliserol 30% nilai *viabilitas* sel $1,5 \times 10^6$ CFU/ml dan maksimal 120 hari nilai *viabilitas* sel $1,4 \times 10^6$ CFU/ml. Adapun untuk waktu *preservasi* pellet bakteri yang terbaik adalah 30 hari konsentrasi gliserol 50%

ISSN 2085-8531 (*print*)
ISSN 2721-5946 (*online*)

memiliki nilai *viabilitas* 1,4 x 10^6 CFU/ml. Preservasi suspensi dan pellet menggunakan gliserol menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata akan tetapi *preservasi* suspensi memiliki nilai rata-rata *viabilitas* sel lebih tinggi. Berdasarkan hasil penelitian ini untuk selanjutnya dapat dilakukan preservasi menggunakan gliserol dengan teknik simpan beku agar preservasi dapat bertahan lebih lama.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana atas pendanaan yang dibiayai DIPA Universitas Lambung Mangkurat melalui LPPM ULM dengan skema Program Penelitian Pranata Laboratorium Pendidikan (P3LP) Tahun Anggaran 2023.

6. DAFTAR PUSTAKA

Advinda, L., Mades, F., & Khairatul, I. (2015). Penambahan gliserol pada bahan pembawa alginat sebagai penstabil pertumbuhan bakteri Pseudomonas Berfluoresen. *Prosiding Semirata Bidang MIPA BKS-PTN Barat*, Universitas Tanjungpura Pontianak. https://jurnal.untan.ac.id/index.php/semirata2015/article/view/14545/0

Canovas, M & Jose L Iborra. (2003). Culture collection and biochemestry. *Int Microbial*, (6): 105-112. https://doi.org/10.1007/s10123-003-0116-1

Jarod, S., Johan, T.I., & Widantari, M. (2015). Pengaruh gliserol pada media Tryptic Soya Broth (TSB) terhadap viabilitas bakteri aeromonas hydrophila. *Jurnal Dinamika Pertanian*, 30(1): 83-91. https://journal.uir.ac.id/index.php/dinamikapertanian/article/view/827

Kusmiati & Dody, P. (2003). Kriopreservasi bakteri selulolitik *Bacillus pumilus* dengan krioprotektan berbeda. *Biosmart, 5(1):* 1-6.

Machmud, M. (2001). Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin Agrobio*, *4(1):* 24-32. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/33567850/agrobio_4_1_24-32-libre.pdf

Najmiyati, E & Dominikus, H. Akhadi. (2012). Viabilitas dan kinerja konsorsium mikroba pendegredasi hidrokarbon setelah penyimpanan dalam pendingin dan penyimpanan beku. *Ecolab, 6(2)*: 61-104. https://www.neliti.com/publications/373384

Park, S.H., Sang Lee H., & Kum Lee H. (2001). Preservation of marine heterotropic bacteri by using a deep-freezing method. *The Journal of Microbiology*, 39(3): 240-243. https://koreascience.kr/article/JAKO200111920940713.pdf

Suriawiria, U. (2005). Mikrobiologi Dasar. Jakarta: Papas Sinar Sinanti. http://elib.upnb.ac.id/index.php?p=show_detail&id=5234

Susilawati, L & Ethik , SP. (2016). Viabilitas sel bakteri dengan cryprotectant agents berbeda (sebagai acuan dalam preservasi culture collection di Laboratorium Mikrobiologi). *Biogenesis*, 4(1): 34-40. https://doi.org/10.24252/bio.v4i1.1118