

## Pengaruh Cryoprotectant Agents (Gliserol) Pada Media Preservasi Terhadap Daya Simpan *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063

**R. Rasyidah<sup>a</sup>, Rini Fariani<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Banjarbaru,  
Universitas Lambung Mangkurat, Kalimantan Selatan

<sup>b</sup>Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan  
Corresponding Author: rasyidah@ulm.ac.id

Received: 25<sup>th</sup> August 2025; Revised: 16<sup>th</sup> December 2025; Accepted: 21<sup>th</sup> December 2025;  
Available online: 22<sup>th</sup> December 2025; Published regularly: January 2026

### Abstract

Preservation using glycerol as cryoprotectant agents is expected to be an alternative in maintaining bacterial viability, so that when they are to be used again, the bacteria can grow. The objective of this study was to determine the effect of glycerol concentrations of 10%, 30%, and 50% in the preservation medium and preservation time on the viability of *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 during storage, as well as to determine the effective glycerol concentration and time. Preservation of *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 in the form of bacterial suspensions and pellets was conducted for 30–150 days at a freezer temperature of  $-40^{\circ}\text{C}$ . Viability tests were performed from day 30 to 150 using the Plate Count method with Nutrient Agar medium. Two-way ANOVA test of pellet preservation from cell viability data, significant value  $0.000 < 0.05$ , meaning that viability or the number of living cells is influenced by time and glycerol concentration. Preservation time and glycerol concentration based on the Tukey test results showed the highest average value on day 60 and a concentration of 50%, which was  $9.4 \times 10^5$  CFU/ml. Suspension preservation: the two-way ANOVA test results showed that preservation time had an effect, but glycerol concentration did not significantly affect cell viability. Tukey test showed that the preservation results on day 120 were significantly different from those at 30–90 days. As for concentration treatment, there were no significant differences between 10%, 30%, and 50%, but the 50% concentration had relatively stable and high viability compared to 10% and 30%, at  $6.7 \times 10^5$  CFU/ml.

**Key Words :** cryoprotectant agents, preservation, viability

### Abstrak

Preservasi menggunakan gliserol sebagai cryoprotectant agents diharapkan menjadi alternatif dalam mempertahankan viabilitas bakteri, sehingga saat akan digunakan kembali, bakteri dapat tumbuh. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh konsentrasi gliserol 10%, 30% dan 50% dalam media preservasi dan waktu preservasi terhadap viabilitas *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 selama penyimpanan, serta menentukan konsentrasi gliserol dan waktu yang efektif. Preservasi dalam bentuk suspensi dan pellet bakteri *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 selama 30-150 hari disimpan dalam freezer suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Uji viabilitas dilakukan dari hari ke-30 -150, menggunakan metode Plate Count dengan medium Nutrien Agar. Uji annova dua arah preservasi pellet dari data viabilitas sel, nilai signifikan  $0.000 < 0.05$ , artinya viabilitas atau jumlah sel hidup dipengaruhi oleh waktu dan konsentrasi gliserol. Waktu preservasi dan konsentrasi gliserol berdasarkan hasil Uji Tukey nilai rata-rata tertinggi hari ke-60 dan konsentrasi 50% yaitu  $9,4 \times 10^5$  CFU/ml. Preservasi suspensi, hasil uji annova dua arah menunjukkan waktu preservasi memberikan pengaruh, akan tetapi konsentrasi gliserol tidak berpengaruh signifikan terhadap viabilitas sel. Uji Tukey menunjukkan hasil hari ke-120 preservasi berbeda signifikan dengan waktu 30-90 hari, Adapun perlakuan konsentrasi tidak terdapat perbedaan signifikan antara 10%, 30%, dan 50%,

akan tetapi konsentrasi 50 % hasil viabilitasnya relatif stabil dan tinggi, dibandingkan konsentrasi 10% dan 30 %, yaitu  $6,7 \times 10^5$  CFU/ml.

**Kata Kunci :** *cryoprotectant agents, preservasi, viabilitas*

## PENDAHULUAN

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.

Teknik penyimpanan dan pengawetan mikroba menurut (Machmud, 2001) memerlukan waktu yang lama, panjang, dan rumit. Hal ini berhubungan dengan tujuan utama preservasi yaitu mengurangi laju metabolisme mikroorganisme, agar daya hidup (viabilitas) dapat dipertahankan dan memelihara isolat dengan baik sehingga tidak terjadi perubahan sifat morfologinya. Teknik penyimpanan untuk jangka pendek yaitu dengan memindahkan kultur secara ritun (berkala). Penyimpanan isolat dalam jangka pendek dan menengah antara lain penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, akuades steril, manik-manik porcelin, lempengan gelatin, dan  $P_2O_5$  dalam keadaan vakum. Metode penyimpanan ini dapat bermanfaat bagi lembaga yang belum memiliki peralatan canggih (Skerman, 1973).

Koleksi mikroorganisme yang ada di laboratorium mikrobiologi FMIPA ULM antara lain kapang, khamir dan bakteri. Penelitian preservasi menggunakan medium tepung tapioka, gliserol dan parafin cair sebagai *cryoprotectant agents* terhadap *Colletotrichum capsici* dan *Prycularia oryzae* sebelumnya sudah pernah dilakukan, hasil penelitian menunjukkan untuk kedua kapang tersebut dapat tumbuh kembali setelah disimpan dalam media PDB-parafin cair 50%, adapun setelah preservasi pada medium tapioka dan PDB-gliserol 50%, kapang tidak dapat tumbuh kembali (Rasyidah & Rini, 2021). Adapun penelitian yang telah dilakukan pada preservasi suspensi dan pellet bakteri menggunakan medium base gliserol pada *Staphylococcus aureus*, menunjukkan hasil preservasi suspensi yang baik adalah penambahan gliserol 30% dan waktu efektif 30 hari. Sementara untuk preservasi pellet, penambahan konsentrasi 50% dan waktu efektif 30 hari (Rasyidah & Rini, 2024). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, maka dilakukan penelitian terhadap bakteri yang berbeda agar preservasi yang dilakukan sesuai dengan sifat dan karakteristik bakteri.

Penambahan gliserol sebagai *cryoprotectant agents* ke dalam media diharapkan dapat menjadi alternatif dalam upaya mempertahankan viabilitas koleksi bakteri yang ada di laboratorium mikrobiologi, khususnya di FMIPA ULM, sehingga bakteri dapat digunakan kembali saat diperlukan pada kegiatan praktikum, penelitian dan kegiatan lainnya. Gliserol merupakan senyawa yang dapat melindungi sel atau jaringan dari kerusakan sehingga dapat menjaga viabilitas mikroorganisme selama penyimpanan (Swain & Smith, 2010; Stevenson, 2016). Gliserol merupakan *Cryoprotectants* yang efektif sebagai pelindung atau pertahanan sel jamur baik intraseluler maupun ekstraseluler. Keberadaannya pada media cair (liquid nitrogen) dapat mencegah kontaminasi dan memperpanjang umur simpan biakan (Nakasone, Peterson, & Shung-Chang Jong, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi gliserol dalam media preservasi dan waktu preservasi terhadap viabilitas *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 selama penyimpanan dalam bentuk pellet dan suspensi, serta menentukan konsentrasi gliserol yang efektif dan waktu preservasi untuk digunakan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan selama 7 bulan (Mei- Nopember 2023) di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru Kalimantan Selatan. Menggunakan koleksi isolat bakteri di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA ULM yaitu *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, rekultur isolat menggunakan medium nutrisi agar (NA) yang sudah steril, kemudian diinkubasi 2 x 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup> C. Desain penelitian adalah eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor. Faktor pertama konsentrasi 3 taraf perlakuan, faktor kedua waktu preservasi 5 taraf perlakuan, masing-masing perlakuan 3x ulangan.

### Preparasi *Cryoprotectant Agents*

Penelitian ini menggunakan gliserol sebagai *Cryoprotectant Agents*, pembuatan *cryoprotectant* gliserol menggunakan metode dari (Machmud 2001; Setiaji *et al.*, 2015) yang telah dimodifikasi. Gliserol masing-masing ditambahkan dalam medium nutrient broth (NB) dengan konsentrasi gliserol yaitu 10%, 30 %, dan 50 %, kemudian disterilisasi menggunakan autoclave.

### Preparasi dan Preservasi Pelet Bakteri

Preparasi pelet bakteri menggunakan metode dari Susilawati & Purnomo., 2016. Isolat yang sudah dikultur dalam medium agar dipindahkan ke dalam medium nutrisi broth (NB) kemudian diinkubasi 24-48 jam. Bakteri yang telah dikultur dalam medium NB dipindahkan dalam microtube 1,5 ml dan disentrifuge menggunakan microsentrifuge suhu 4<sup>0</sup> C selama 15 menit (12.000 rpm). Supernatan dibuang dan pellet sel dicuci dengan menggunakan akuades steril sebanyak 2x. Pelet sel ditambahkan *cryoprotectant agents* sebanyak 1 ml dengan rancangan perlakuan sebagai berikut :

P1 : Pellet + 1 ml *cryoprotectant agents* 10 %

P 2 : Pellet + 1 ml *cryoprotectant agents* 30%

P 3 : Pellet + 1 ml *cryoprotectant agents* 50 %

Microtube yang berisi pellet dan *cryoprotectant* disimpan dalam freezer suhu 4<sup>0</sup> C. Secara periodik dilakukan uji viabilitas.

### Preparasi dan Preservasi Suspensi Bakteri

Preparasi suspensi bakteri menggunakan metode Setiaji *et al.*, 2015 yang telah dimodifikasi. Isolat yang sudah dikultur dalam medium agar dipindahkan ke dalam medium nutrisi broth (NB) kemudian diinkubasi 24- 48 jam. Suspensi bakteri dipindahkan dalam microtube 1,5 ml sebanyak 0,5 ml. Suspensi bakteri ditambahkan *cryoprotectant agents* sebanyak 0,5 ml dengan rancangan perlakuan sebagai berikut :

S 1 : 0,5 ml suspensi + 0,5 ml *cryoprotectant agents* 10 %

S 2 : 0,5 ml suspensi + 0,5 ml *cryoprotectant agents* 30%

S 3 : 0,5 ml suspensi + 0,5 ml *cryoprotectant agents* 50 %

Microtube yang berisi suspensi dan *cryoprotectant* disimpan dalam freezer suhu 4<sup>0</sup> C. Secara periodik dilakukan uji viabilitas.

### Uji Viabilitas Sel

Uji viabilitas dilakukan dengan enumerasi pengenceran untuk mengetahui viabilitas sel ( Susilawati *et al.*, 2016; Setiaji *et al.*, 2015 ). Kultur bakteri sebanyak 0,2 ml diinokulasikan ke dalam 9 ml medium NB kemudian diinkubasi menggunakan waterbath shaker suhu 37<sup>0</sup> C selama 24-48 jam. Kemudian 1 ml kultur dari medium dimasukkan dalam 9 ml larutan fisiologis dengan pengenceran 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-6</sup>. Hasil pengenceran 1 ml diambil dan diinokulasikan ke dalam medium NA dimulai dari pengenceran 10<sup>-4</sup> sampai 10<sup>-6</sup> dengan metode pour plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24-48 jam.

1. Menghitung jumlah koloni pada setiap perlakuan *cryoprotectant*
2. Menghitung jumlah minimum sel hidup dengan rumus perhitungan sebagai berikut

$$\text{Jumlah sel hidup} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{fp}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk melihat tingkat kelangsungan hidup *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063. Teknik preservasi yang digunakan pada penelitian ini dengan menggunakan preservasi jangka menengah menggunakan medium base gliserol sebagai *cryptoprotectant agent* yaitu dengan menambahkan konsentrasi gliserol yang berbeda (10%, 30% dan 50%) pada masing-masing medium Nutrien Broth (NB). Preservasi terhadap kultur bakteri selama 30-150 hari dengan menggunakan suspensi dan pellet bakteri, kemudian setiap per 30 hari dilakukan uji viabilitas dengan enumerasi melalui serangkaian seri pengenceran dan diinokulasikan dalam media agar yang sesuai dengan bakteri uji. Adapun preservasi yang dilakukan selama ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi yaitu rekultur secara berkala. Data yang diamati dalam penelitian ini adalah tumbuhnya bakteri dan kepadatan jumlah sel bakteri. Hasil pertumbuhan bakteri dari pellet suspensi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 dari preservasi pellet dan suspensi selama 30-150 Hari

Hari ke-	Metode Preservasi	Parameter	Pengenceran (CFU/ml)		
			<i>Cryptoprotectant agents</i> 10 %	<i>Cryptoprotectant agents</i> 30 %	<i>Cryptoprotectant agents</i> 50 %
30	Pellet	Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
60		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
90		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
120		Tumbuh	$10^{-4}$	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	$10^{-4}$ – $10^{-5}$
150		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
30	Suspensi	Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
60		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
90		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
120		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$
150		Tumbuh	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	$10^{-4}$ – $10^{-6}$

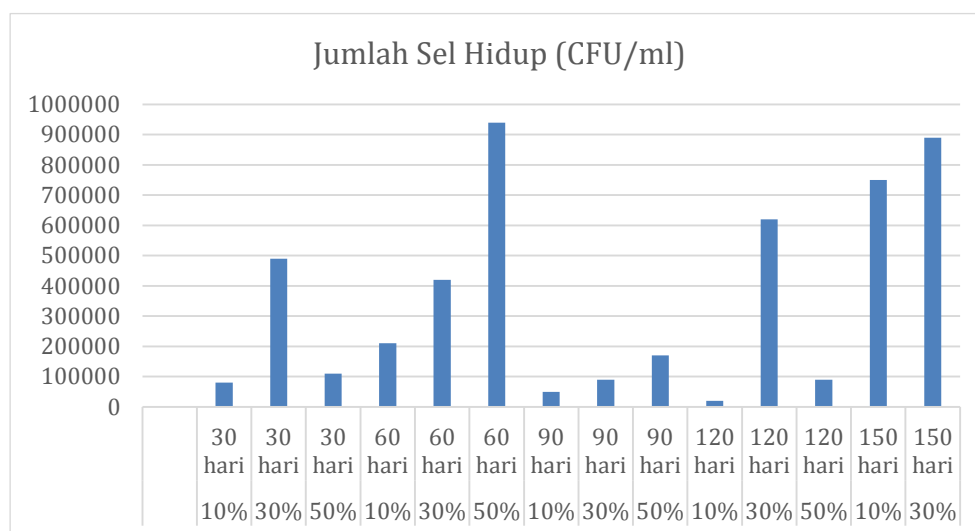
Data Tabel 1 menunjukkan setelah disimpan dalam bentuk pellet dan suspensi kemudian dengan metode enumerasi pengenceran dan diinokulasikan dari  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$ . Data pertumbuhan bakteri dari pellet menunjukkan pada hari ke 30 konsentrasi *cryptoprotectant agents* 10% dan 30% yang dapat tumbuh hanya pengenceran  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$ . Hari ke 120 pada konsentrasi 10% hanya pengenceran  $10^{-4}$  yang dapat tumbuh, konsentrasi 30% dan 50 % hanya pengenceran  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  yang dapat tumbuh. Akan tetapi, dari hasil keseluruhan menunjukkan pertumbuhan bakteri masih bagus, sehingga penambahan gliserol sebagai *cryptoprotectant agents* mampu mendukung tumbuhnya bakteri setelah disimpan selama 30-150 hari. Machmud (2001) menyebutkan bahwa metode preservasi sangat ditentukan oleh jenis mikroba dan tujuan preservasi, metode yang dipilih harus dapat mempertahankan sifat sel, sifat genetik tetap stabil, hemat biaya dan tenaga.

Perbedaan daya tumbuh bakteri pada masing-masing konsentrasi gliserol dapat dilihat dengan melakukan perhitungan kepadatan sel bakteri secara tidak langsung dengan *Total Plate Count* (TPC) metode *pour plate*. Kepadatan bakteri menjadi salah 1 parameter viabilitas bakteri, yaitu dengan mengetahui jumlah koloni bakteri yang dapat tumbuh setelah penyimpanan dalam jangka waktu tertentu. Hasil perhitungan kepadatan bakteri dari penyimpanan dalam bentuk pellet dan suspensi yang diperoleh pada penelitian ini disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Hasil viabilitas preservasi pellet *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 selama 30-150 hari

Hari ke-	Metode Preservasi	Jumlah Sel (CFU/ml)		
		<i>Cryptoplectan agents</i> 10 %	<i>Cryptoplectan agents</i> 30 %	<i>Cryptoplectan agents</i> 50 %
30	Pellet	$8,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
60		$2,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$
90		$5,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$	$9,4 \times 10^5$
120		$2,0 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$
150		$7,5 \times 10^5$	$8,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$

Preservasi pellet dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 menggunakan *cryptoplectant agents* gliserol dengan konsentrasi dan waktu yang berbeda viabilitas selnya bervariasi pada setiap perlakuan. Kepadatan sel konsentrasi gliserol 10% dan 30% hari ke-30 secara berurutan yaitu  $8,0 \times 10^4$  CFU/ml, dan  $4,9 \times 10^5$  CFU/ml dan mengalami penurunan signifikan dari hari ke-90, dapat dilihat pada Grafik 1.



Grafik 1. Pengaruh konsentrasi gliserol dan waktu preservasi terhadap viabilitas preservasi pellet *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063

Konsentrasi gliserol 10% nilai kepadatan selnya lebih kecil dibandingkan konsentrasi 30% dan 50%. Hal ini dapat terjadi karena tekanan osmosis sitoplasma dari bakteri yang disimpan dengan konsentrasi gliserol 10% lebih tinggi dari media lingkungannya, dan sebaliknya bakteri yang disimpan dengan gliserol 30% dan 50% tekanan osmosis sitoplasmanya lebih rendah dari media lingkungannya. (Waluyo, 2012) menjelaskan bahwa tekanan osmosis menjadi salah 1 faktor pengendali mikroorganisme. Data hasil pengujian viabilitas sel pada preservasi pellet bakteri kemudian dilakukan uji *Two Way Anova*, Hasil uji annova dua arah pada preservasi dalam bentuk pellet yang dipengaruhi oleh konsentrasi dan waktu preservasi menunjukkan bahwa nilai signifikan  $0.000 < 0.05$ . sehingga dapat disimpulkan bahwa viabilitas atau jumlah sel hidup dipengaruhi oleh kedua faktor tersebut.

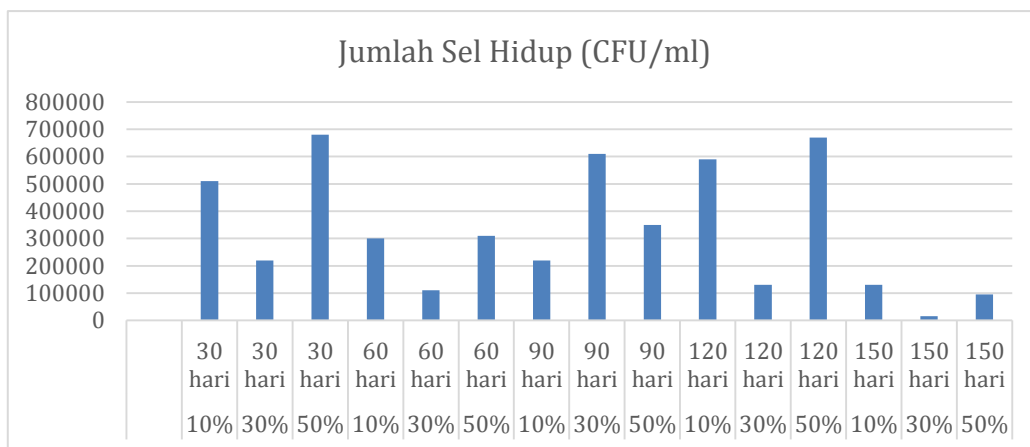
Konsentrasi gliserol 50% mempunyai nilai rata-rata tinggi pada pada semua waktu preservasi dan yang paling tinggi kepadatan selnya pada hari ke 60 yaitu  $9,4 \times 10^5$  CFU/ml. Hasil ini didukung dengan uji lanjut (uji *Tukey*) menunjukkan nilai rata-rata tertinggi waktu preservasi terbaik pada hari ke-60 dan konsentrasi *cryptoplectant agents* 50%, hal ini menunjukkan perlakuan konsentrasi dan waktu preservasi

memberikan pengaruh sangat nyata terhadap viabilitas sel. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa untuk preservasi *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 dalam bentuk pellet yang ditambahkan *cryptoprotectant agents* konsentrasi 50 % selama 60 hari penyimpanan, viabilitas selnya masih terjaga. Hasil penelitian Simanjuntak dkk (2008) menyebutkan bahwa hasil preservasi *Aeromonas salmonicida* pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dengan menggunakan gliserol 15-20% dapat bertahan selama 5 bulan, sedangkan pada konsentrasi gliserol 10% dan 25% dapat bertahan selama 4 bulan tanpa terjadi perubahan karakteristik bakteri. Hermawan *et al* (2008) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa *Streptococcus* sp yg disimpan dalam medium TSB yang ditambahkan gliserol 15-20% dapat bertahan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 3 bulan.

Tabel 3. Hasil viabilitas preservasi suspensi *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 selama 30-150 hari

Hari ke-	Metode Preservasi	Jumlah Sel (CFU/ml)		
		<i>Cryptoprotectan agents</i> 10 %	<i>Cryptoprotectan agents</i> 30 %	<i>Cryptoprotectan agents</i> 50 %
30	Suspensi	$5,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$
60		$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$
90		$2,2 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
120		$5,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$
150		$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^4$

Penurunan viabilitas *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 yang disimpan dalam bentuk suspensi pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada hari ke 60 kemampuan bakteri untuk mempertahankan viabilitasnya mulai menurun dapat dilihat pada Grafik 2. Hal ini berkaitan dengan nutrisi medium. Hal ini selaras dengan penelitian (Advinda *et al.*, 2015), dimana viabilitas *Pseudomonas* berflouresen mulai menurun pada inkubasi hari ke 42 dan 56. (Jarod, 2015) menyebutkan bahwa nutrisi yang terkandung dalam medium digunakan sebagai sumber energi untuk pembentukan dinding sel dan metabolisme bakteri. Terjadinya penurunan viabilitas dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain tekanan osmosis bakteri dengan *cryptoprotectant agents*, nutrisi, penurunan suhu, dan proses *thawing* (pencairan isi tube) setelah dikeluarkan dari freezer. Pada penelitian ini proses thawing pada suhu kamar, sehingga waktu yang diperlukan untuk es mencair jadi lebih lama. Proses pencairan suspensi bakteri yang cukup lama ini kemungkinan bisa merusak sel, sehingga bakteri yang dikultur kembali setelah disimpan, hanya sedikit yang bisa tumbuh.



Grafik 2. Pengaruh konsentrasi gliserol dan waktu preservasi terhadap viabilitas preservasi suspensi *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063

Hasil uji *Two Way Annova* waktu preservasi suspensi nilai signifikan  $0.000 < 0.05$  sedangkan pengaruh konsentrasi *cryoprotectant agents* nilai signifikan  $0.125 > 0.05$ , akan tetapi jika dilihat nilai interaksi kedua faktor, nilai signifikan  $0.002 < 0.05$  sehingga dapat disimpulkan bahwa untuk preservasi suspensi waktu memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel, sedangkan *cryoprotectant agents* tidak berpengaruh signifikan, tetapi ada interaksi antara kedua faktor tersebut. Kepadatan sel dari hasil *preservasi* suspensi bakteri menunjukkan pada hari ke 30 dan 120 konsentrasi 50% nilainya lebih tinggi dibandingkan konsentrasi 10% dan 30 %, yaitu  $6,8 \times 10^5$  CFU/ml dan  $6,7 \times 10^5$  CFU/ml, selain itu viabilitasnya relatif stabil dan tinggi untuk semua hari penyimpanan. Untuk mengetahui waktu preservasi dan konsentrasi yang direkomendasikan, maka dilakukan uji *Tukey*, hasilnya menunjukkan waktu 120 hari berbeda signifikan dengan waktu 30-90 hari, akan tetapi 90 hari tidak berbeda signifikan dengan 30-60 hari preservasi, sehingga waktu preservasi dapat direkomendasikan sampai 120 hari. Adapun perlakuan konsentrasi tidak terdapat perbedaan signifikan antara 10%, 30%, dan 50%, akan tetapi konsentrasi 50 % hasil viabilitasnya relatif stabil dan tinggi, sehingga dapat direkomendasikan untuk digunakan.

Menurut Badjoeri (2010) *cryoprotectant agent* yang ditambahkan pada kultur sel akan menjaga sel dari penyimpanan dengan suhu ekstrim dan meminimalisir kerusakan sel selama pembekuan. Beberapa agensia *cryoprotective* antara lain dimethylsulfoxide, gliserol, DMSO, dan polyvinilpyrrolidone (PPV). Gliserol merupakan salah satu yang dimanfaatkan sebagai *cryoprotectan* sel bakteri dengan metode simpan beku, karena mampu meminimalisir terbentuknya kristal es dalam sel (Park, *et al.*, 2001). Penetrasi *cryoprotectant agent* menstimulasi pembentukan struktur kristalin es halus yang membentuk fase *gel-type glass* sehingga mampu mencegah kerusakan hiperosmotik terhadap sel (Hubalek, 2003). Dalam penelitian Advinda, *et al* (2015) penambahan gliserol pada media preservasi suhu beku berpengaruh terhadap viabilitas sel *Pseudomonas fluorescens*.

## KESIMPULAN

Penambahan gliserol sebagai *cryoprotectant agents* pada preservasi dalam bentuk pellet menunjukkan perlakuan konsentrasi dan waktu preservasi memberikan pengaruh sangat nyata terhadap viabilitas sel. Dari hasil penelitian perlakuan preservasi dalam bentuk pellet dapat menggunakan penambahan gliserol 50% dan waktu yang efektif adalah 60 hari. Adapun perlakuan pada preservasi suspensi, pengaruh konsentrasi gliserol tidak terdapat perbedaan signifikan antara 10%, 30%, dan 50%, akan tetapi konsentrasi 50 % hasil viabilitasnya relatif stabil dan tinggi, sehingga dapat direkomendasikan untuk digunakan, dan waktu yang efektif sampai hari ke-120.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh jajaran pimpinan Universitas Lambung Mangkurat, khususnya Rektor, Wakil Rektor Bidang Akademik, Wakil Rektor Bidang Perencanaan, Keungan dan Umum, Dekan Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Wakil Dekan Bidang Umum dan Keuangan FMIPA, Kepala Laboratorium FMIPA, Kepala Bagian Laboratorium Mikrobiologi FMIPA, dan Kepala Laboratorium Terpadu yang telah mendukung terlaksananya penelitian yang dibiayai DIPA Universitas Lambung Mangkurat Tahun Anggaran 2023 Nomor : SP-DIPA- 023.17.2.677518/2023

## DAFTAR PUSTAKA

- Advinda L., Fifendy, M., In'am, K. 2015. Penambahan Gliserol Pada Bahan Pembawa Alginat Sebagai Penstabil Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* Berfluoresen. Prosiding Semirata 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat Universitas Tanjungpura Pontianak. Hal 87 – 94.
- Badjoeri, M. 2010. Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma Nutfah. *Warta Limnologi*. 23 (45): 1-9.
- Machmud, M. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin Agrobio*. 4(1): 24-32.

- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., & Jong, Shung-Chang. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. In Gregorym, M., Gerald, B., & Mercedes, S.F. (Eds.), *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. USA: Elsevier Academic Press.
- Hermawan, T., A. Syarief, M. H. Arisandi, M. D. Saptano, N. Destiana & M. Atmomarsono. 2008. Viabilitas *Streptococcus* sp Menggunakan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda dalam TSB Selama Empat Bulan Preservasi Beku. Prosiding Hasil Uji Coba Preservasi. Vol (3). Pusat Karantina Ikan. Jakarta
- Hubalek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46: 205-229.
- Park. SH, Sang Lee H and Kum Lee H. 2001. Presevation of Marine Heterotropic Bacteria by Using a Deep freezing Method. *The Journal of Microbiology*. 39(3): 240-243.
- Rasyidah & R. Fariani. 2021. Perbandingan Teknik Penyimpanan Menggunakan Medium yang Berbeda Terhadap Viabilitas Kapang *Colletotrichum capsici* dan *Prycularia oryzae*. Jurnal Pengelola Laboratorium Pendidikan. 3(2): 1-8.
- Rasyidah & R. Fariani. 2024. Viabilitas Sel Hasil Preservasi Suspensi dan Pellet *Staphylococcus aureus* Menggunakan Medium Base Gliserol. *Wahana-Bio*. 16(1) : 54-61.
- Setiaji, J., I. Johan., M. Widantari. 2015. Pengaruh Gliserol Pada Media Tryptic Soya Broth (TSB) Terhadap Viabilitas Bakteri *Aeromonas hydrophila*. 30 (1): 83-91.
- Simanjuntak, R., S. Baddu, T. S. Ekawati, M. Widantari, M. M As'adi. 2008. Preservasi *Aeromonas salmonicida* dengan Gliserol dalam TSB Selama 6 Bulan. Prosiding Hasil Uji Coba Preservasi. Vol (3). Pusat Karantina Ikan. Jakarta.
- Skerman, V.B.D. 1973. *The organization of a small general culture collection*. In Pestana de Castro, A.F., E.J. Da Silva, V.B.D. Skerman, and W.W. Leveritt (Eds.). *Proceedings of the Second International Conference on Culture Collections*. Brisbane: Unesco/ UNEP/ICRO/WFCC/Word Data Center for Microorganisms.
- Stevenson, A., Hamill, P.G., Medina, A., Kminek, G., Rummel, J.D., Dijksterhuis, J.,... Hallsworth, J.E. (2016). Glycerol enhances fungal germination at the water-activity limit for life. *Environmental Microbiology*, 00, 00–00. doi: 10.1111/1462-2920.13530.
- Susilawati, L & E. S. Purnomo. 2016. Viabilitas Sel Bakteri dengan Cryoprotectans Agents Berbeda (Sebagai Acuan dalam Preservasi Culture Collection di Laboratorium Mikrobiologi). *Biogenesis*. 4(1): 34-40.
- Swain, J.E., & Smith, G.D. (2010). Cryoprotectant. In Chian, R.C., & Quinn, P. (Eds.), *Cryopreservation in female fertility preservation* (pp. 288). Cambridge: Cambridge University Press.
- Waluyo, L. 2012. Mikrobiologi Umum. UMM Press. Malang.