

Uji Viabilitas Bakteri *Aeromonas hydrophila* Dengan Metode Penyimpanan Beku Pada Media TSB dan Gliserol

Viability testing of *Aeromonas hydrophila* by freezing with glycerol in TSB Media

Seniati¹⁾, Rahmi Mulyani¹⁾, Syahrudin¹⁾

¹Jurusan Budidaya Perikanan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep

Article history:

received October 5, 2020

Accepted Desember 6, 2020

Keyword:

Viabilitas, *A. hydrophila*, sifat dan karakteristik.

*Corresponding Author:

seniatipasca@gmail.com

Abstrak: Bakteri *A. hydrophila* merupakan salah satu bahan yang sering digunakan dalam dunia pendidikan baik sebagai bahan praktikum maupun bahan penelitian, sehingga intensitas kebutuhannya sangat tinggi khususnya di laboratorium Kesehatan Ikan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian metode penyimpanan *A. hydrophila* yang tepat sehingga ketersediaannya di laboratorium selalu berkesinambungan, sifat fisika dan kimianya selalu terjaga dan kemungkinan untuk munculnya strain baru lebih kecil. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi media TSB dan gliserol yang terbaik yang dapat mempertahankan kehidupan *A. hydrophila* yang disimpan pada suhu beku dalam jangka waktu tertentu. Penelitian ini berlangsung selama empat bulan di Laboratorium Kesehatan Ikan Politeknik Pertanian Negeri Pangkep. Metode yang digunakan adalah penyimpanan *A. hydrophila* dengan menggunakan media TSB dan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda-beda (80% + 20%, 70% + 30% dan 60% + 40%). Pemantauan perubahan sifat dan karakterisasi *A. hydrophila* dilakukan pada awal penyimpanan, dua minggu, sebulan, dua bulan dan tiga bulan umur penyimpanan. Hasil yang diperoleh setelah 3 bulan masa penyimpanan menunjukkan bahwa penyimpanan bakteri *A. hydrophila* pada media 70 % TSB yang ditambahkan gliserol 30% dapat mempertahankan pertumbuhan bakteri dengan penurunan populasi terkecil dibandingkan perlakuan lainnya. Disisi lain, bakteri *A. hydrophila* dapat mempertahankan sifat dan karakteristiknya, yaitu tipe penggandengan sel, sifat pembentukan koloni dan sifat kimia selama masa penyimpanan.

Abstract: *Aeromonas hydrophila* bacteria is one of the materials often used in the learning process both as practical and research materials, where the intensity of the bacteria requirement is very high, particularly in the Fish Health Laboratory, Pangkep State Polytechnic of Agriculture. Therefore, it is necessary to conduct research on the proper storage method of *A. hydrophila* so that its availability in the laboratory is always sustainable, its physical and chemical properties are always maintained and the possibility of the emergence of new strains is smaller. This study aims to determine the best composition of TSB and glycerol media that can sustain the life of *A. hydrophila* stored at freezing temperatures for a certain period. This research lasted for four months. The method used was the storage of *A. hydrophila* using TSB and glycerol media at different concentrations (80% + 20%, 70% + 30% and 60% + 40%). Monitoring of changes in the

properties and characterization of *A. hydrophila* was carried out at the beginning of storage, two weeks, a month, two months, and three months of storage. The results obtained after 3 months of storage showed that storage of *A. hydrophila* on 70% TSB media added with 30% glycerol was able to maintain bacterial growth with the smallest population decline compared to other treatments. On the other hand, *A. hydrophila* can maintain their properties and characteristics, i.e., the type of cell coupling, the nature of colony formation, and chemical properties during the storage period.

PENDAHULUAN

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri paling sering dijumpai dalam dunia perikanan, baik di perikanan air tawar, air payau maupun air laut. Bahkan bakteri ini merupakan salah satu bahan yang sering digunakan dalam dunia pendidikan baik sebagai bahan praktikum maupun bahan penelitian, sehingga intensitas kebutuhannya di laboratorium sangat tinggi. Secara umum, bakteri *A. hydrophila* sangat mudah mengalami perubahan sifat dan karakteristik sehingga dapat memunculkan strain baru yang berbeda dengan aslinya. Oleh karena itu perlu melakukan koleksi, penyimpanan dan memelihara bakteri dengan tepat, baik untuk kebutuhan sehari-hari di laboratorium, untuk jangka menengah maupun untuk jangka panjang sehingga ketersediaannya di laboratorium selalu berkesinambungan, ciri-ciri genetik serta viabilitasnya akan selalu terjaga dan kemungkinan untuk munculnya strain baru lebih kecil (Machmoed, 2001).

Penyimpanan bakteri *A. hydrophila* dengan metode yang tepat dapat menjaga viabilitasnya (daya hidupnya), ciri-ciri genetiknya tetap stabil dan tidak berubah serta hemat biaya dan tenaga pemeliharaan. Metode yang dipilih sangat tergantung pada sifat mikroba dan tujuan preservasi. Sifat bakteri secara umum dapat diketahui melalui ciri-ciri morfologi, fisiologi dan biokimia serta kemampuan bakteri dapat bertahan hidup pada lingkungan alaminya maupun pada lingkungan buatan. Untuk mempelajari mikroorganisme diperlukan pengetahuan yang komprehensif tentang biokimiawi atau aktivitas metabolik dari mikrobia tersebut karena menurut Cánovas and 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.

Tujuan koleksi dan preservasi bakteri mencakup jangka pendek dan jangka panjang. Preservasi jangka pendek dilakukan untuk keperluan rutin sehari-hari misalnya untuk kegiatan praktikum mahasiswa dan kegiatan penelitian. Preservasi jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi jangka panjang plasma nutfah bakteri, sehingga apabila suatu saat diperlukan dapat diperoleh kembali sesuai dengan sifat dan karakteristik semula.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi terbaik media TSB dan gliserol sebagai media penyimpanan yang dapat mempertahankan sifat dan karakteristik bakteri *A. hydrophila* yang disimpan pada suhu beku dalam jangka waktu 3 bulan. Hasil penelitian diharapkan dapat bermanfaat bagi tenaga laboran dalam melakukan penyimpanan stock bakteri *A. hydrophila* pada suhu beku sehingga ketersediaannya di laboratorium selalu terjaga dan berkesinambungan.

METODE

Preparasi dan Purifikasi bakteri *A. hydrophila*

Preparasi Bakteri *A. hydrophila* diregenerasikan pada media miring TSA selama 24-48 jam. Kemudian isolat dipurifikasi beberapa kali menggunakan media TSA. Pengamatan kemurnian isolat dilakukan dengan pewarnaan isolat bakteri. Isolat dikatakan murni apabila memiliki reaksi gram dan bentuk sel seragam. Selanjutnya isolat *A. hydrophila* dikultur pada media TSB selama 24-48 jam. Sebanyak 1.5 ml dimasukkan ke dalam mikrotube lalu disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dibuang dan pellet ditambah dengan media TSB plus gliserol dengan perbandingan 80% TSB + 20% gliserol (Media A), 70% TSB + 30% gliserol (Media B) dan 60% TSB + 40% gliserol (Media C). Setiap perlakuan di buat dalam 5 mikrotube lalu kesemua mikrotube disimpan dalam freezer suhu -20 °C dan secara periodik berawal dari sejak penelitian dimulai, dua minggu, sebulan, dua bulan dan tiga bulan penelitian berjalan akan dilakukan analisa pembentukan morfologi sel dan koloni, sifat kimia sel, serta daya viabilitasnya.

Pengamatan pembentukan morfologi sel dan koloni, sifat kimia sel, serta daya viabilitas

Pengamatan morfologi sel dengan melihat bentuk dan tipe pengandangan sel melalui pewarnaan bakteri. Pengamatan morfologi koloni dengan melihat warna, bentuk, penampakan permukaan dan penyebaran sel. Pengamatan viabilitas dilakukan dengan metode Total Plate Count (TPC) melalui seri pengenceran (SNI, 2008). Pengujian di lakukan dengan cara mengambil 0.2ml kultur dari freezer selanjutnya di inokulasikan pada media TSB. Inkubasikan selama 24-48 jam (suhu 37°C). Selanjutnya diambil 1ml kultur dan dimasukkan pada 9 ml akuades steril (nilai pengenceran 10⁻¹), diambil 1ml dari pengenceran sebelumnya dan dimasukkan pada 9 ml akuades steril (nilai pengenceran 10⁻²). Pengenceran dilakukan hingga diperoleh nilai pengenceran 10⁻⁶. Dari pengenceran 10⁻⁵-10⁻⁶ masing-masing diambil 1 ml dan diinokulasikan pada media TSA melalui metode pour plate. Plate kemudian diinkubasikan (suhu 37 °C; 24-48 jam). Jumlah sel bakteri dihitung dengan rumus :

$$\text{Jumlah koloni bakteri (cfu/ml)} = \text{Jumlah koloni terhitung} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Kemampuan bakteri dalam mempertahankan kelulushidupannya dinyatakan sebagai viabilitas bakteri. Pengamatan viabilitas, sifat dan karakter bakteri dilakukan pada 0 hari, 2 minggu, 4 minggu, 8 minggu dan 12 minggu masa penyimpanan.

Analisis Data

Data morfologi sel, koloni bakteri, sifat kimia sel dan viabilitas bakteri *A. hydrophila* selama 4 bulan perlakuan dianalisa secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi sel dan koloni *A. hydrophila*

Pengamatan morfologi sel *A. hydrophila* selama masa penyimpanan pada suhu -20 °C menunjukkan bahwa bakteri *A. hydrophila* termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek dan type penggandengan selnya menyebar secara haploid. Pengamatan morfologi koloni bakteri *A. hydrophila* dengan komposisi media TSB dan gliserol yang berbeda-beda menunjukkan bahwa penyimpanan hingga bulan kedua tidak menunjukkan perbedaan, namun pada bulan ketiga terjadi perubahan pada penyebaran koloni pada komposisi media A dan C. Koloni terlihat berkumpul atau bergerambol sehingga cenderung terbentuk koloni berukuran besar. Berbeda dengan komposisi media B yang tetap sama dengan media kontrol, dimana koloni tetap menyebar secara haploid di seluruh permukaan media TSA. Hasil pengamatan morfologi koloni selama masa penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan morfologi koloni bakteri *A. hydrophila*

No.	Kode Perlakuan	Waktu pengamatan			
		0 hari	2 minggu	4 minggu	8 minggu
1	A (80% TSB + 20% gliserol)	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Beberapa koloni berkumpul, berwarna krem, bentuk bundar dan permukaan cembung dan mengkilap,
2	B (70% TSB + 30% gliserol)	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berukuran agak besar, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.
3	C (60% TSB + 40% gliserol)	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Beberapa koloni berkumpul, berwarna krem, bentuk bundar dan permukaan cembung dan mengkilap.
4	Media TSB (kontrol)	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.	Koloni menyebar secara haploid, berukuran agak besar, berwarna krem, mengkilap, bentuk bundar dan permukaan cembung.

Sifat kimia sel *A. hydrophila*

Pengamatan sifat kimia sel *A. hydrophila* selama masa penyimpanan dapat terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat kimia *A. hydrophila* selama penyimpanan

No	Perlakuan	Waktu Pengamatan	Reaksi Gram	KOH 3%	Katalase	Oksidase	Motil	Indol	Ornithin	O/F
1	A (80% TSB + 20% gliserol)	0 hari	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		2 minggu	Gram -	-	+	++	+	-	+	F
		4 minggu	Gram -	-	+	++	+	-	+	F
		12 minggu	Gram -	- lemah	+	+	+	-	+	F lemah
2	B (70% TSB + 30% gliserol)	0 hari	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		2 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		4 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		12 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F lemah
3	C (60% TSB + 40% gliserol)	0 hari	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		2 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		4 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		12 minggu	Gram -	- lemah	+	+	+	-	+	F lemah
4	TSB (Kontrol)	0 hari	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		2 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		4 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F
		12 minggu	Gram -	-	+	+	+	-	+	F lemah

Pengamatan sifat kimia selama penelitian berlangsung menunjukkan bahwa pada bulan ketiga masa penyimpanan mulai terjadi perubahan sifat kimia khususnya pada uji KOH 3%, uji Oksidase dan uji Oksidatif/Fermentatif (OF). Pengujian KOH 3% menghasilkan sedikit lendir, sangat berbeda dengan jumlah lendir pada uji KOH 3% di bulan pertama dan kedua. Kurangnya lendir pada uji KOH disebabkan karena berkurangnya lemak pada dinding sel bakteri *A. hydrophila*. Secara teoritis gram (+) memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis sedangkan gram (-) berlemak tebal dan berdinding sel tipis yang berada di ruang periplasma. KOH akan menyerang lemak (bilayer lipid) ini dan membuat sel gram (-) pecah. Pecahnya sel melepaskan materi genetik (DNA) yang merupakan substansi melimpah di dalam sel bakteri. Molekul DNA sangat panjang bersifat sticky strings (menyerupai lendir, getah atau dapat berarti lengket) yang memberikan hasil seperti lendir saat diangkat dengan jarum inokulum (Edwin, 2011).

Perubahan kedua adalah pada uji OF dengan menggunakan media OF membentuk warna kuning lemah. Sangat berbeda dengan warna kuning terang yang terbentuk pada 1 dan 2 bulan masa penyimpanan. Perubahan media OF menjadi sedikit kuning diasumsikan sebagai F lemah. Hal ini menunjukkan adanya perubahan sifat kimia *A. hydrophila* mulai pada bulan ke-3 masa penyimpanan, khususnya pada uji KOH dan uji O/F.

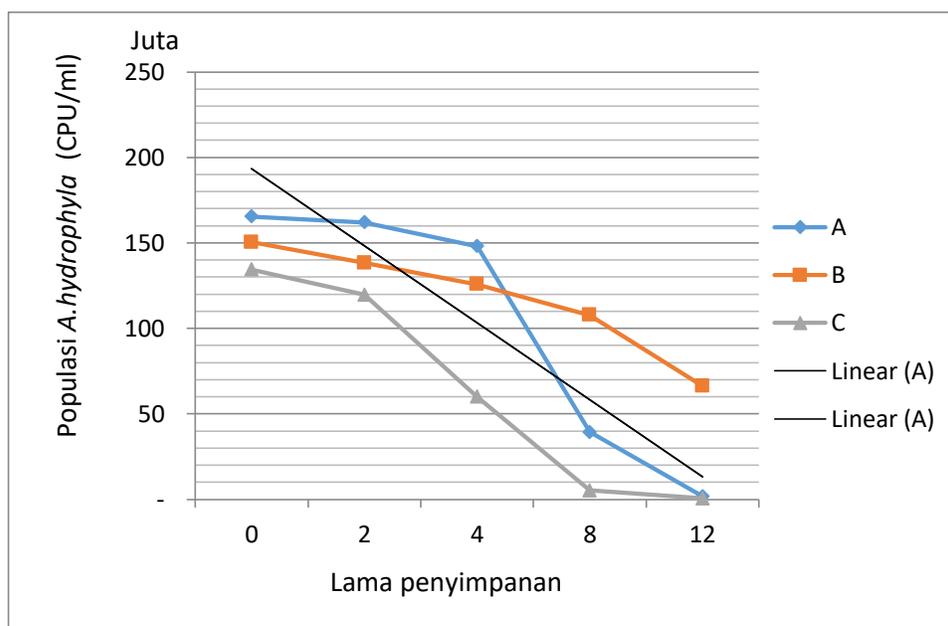
Viabilitas Bakteri *A. hydrophila*

Viabilitas bakteri merupakan kemampuan bakteri untuk tetap bertumbuh dan berkembang. 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. Salah satu metode preservasi yang sering dilakukan adalah penambahan gliserol pada media tumbuh untuk mempertahankan viabilitas bakteri. Advinda, dkk. (2015), menyatakan bahwa dengan penambahan gliserol pada penyimpanan suhu beku mempengaruhi viabilitas *Pseudomonas fluorescens* dalam bahan pembawa alginat pada 14 hari, 28 hari dan 42 hari masa inkubasi.

Hasil viabilitas bakteri *A. hydrophila* selama penyimpanan memperlihatkan pertumbuhan *A. hydrophila* semakin menurun. Penurunan pertumbuhan sel terendah terjadi pada perlakuan B, kemudian perlakuan A dan penurunan pertumbuhan sel tertinggi pada perlakuan C. Pada suhu kamar, jumlah sel yang optimum sebesar $1,7 \times 10^8$ cfu/mL sedangkan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jumlah sel $1,3 \times 10^5$ cfu/mL setelah disimpan selama 3 bulan. Hal ini dikarenakan suhu dapat menyebabkan lambatnya pertumbuhan. Laju pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. Grafik pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* selama penyimpanan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$



Penurunan pertumbuhan bakteri terendah pada perlakuan B, menunjukkan bahwa perlakuan tersebut dapat mempertahankan populasi bakteri lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya hingga 3 bulan. Penurunan pertumbuhan bakteri yang rendah dapat terjadi apabila kandungan nutrisi yang ada pada media terpenuhi. Komposisi 70% TSB pada perlakuan B mampu menyediakan cadangan nutrisi yang cukup bagi bakteri *A. hydrophila* selama penyimpanan beku berlangsung. Nutrisi yang ada pada media tersebut digunakan sebagai energi untuk memenuhi pembentukan dinding sel bakteri menjadi lebih baik, energi yang ada dalam sel tersebut digunakan untuk melakukan metabolisme (Jarod, 2015). Media TSB mengandung kasein dan pepton kedelai yang menyediakan asam amino dan substansi nitrogen lainnya yang membuatnya menjadi media bernutrisi untuk bermacam mikroorganisme. Dextrosa adalah sumber energi dan natrium klorida mempertahankan kesetimbangan osmotik (Anonim, 2014). Perbedaan pertumbuhan pada tiap media dimungkinkan karena adanya perbedaan dari

kemampuan bakteri dalam menyerap nutrisi yang ada pada media tumbuhnya untuk proses pertumbuhan dan metabolismenya. Murwantoko (2008), menyatakan bahwa tidak ada teknik penyimpanan yang bisa merecovery 100% bakteri yang disimpan. Metode penyimpanan menghasilkan tingkat recovery yang berbeda-beda, tergantung pada spesies bakteri yang disimpan.

Perbedaan laju pertumbuhan disebabkan oleh banyak faktor antara lain tipe dan jenis bakteri itu sendiri maupun kemampuan bakteri tersebut dalam menggunakan nutrisi yang ada pada media serta aktivitas enzim yang dihasilkan. Penyimpanan yang dilakukan masih tergolong jangka pendek dan menengah yaitu 1 minggu hingga 3 bulan. Untuk penyimpanan jangka panjang bisa mencapai 1 tahun. Penelitian lain menunjukkan bahwa untuk penyimpanan jangka panjang memerlukan metode liofilisasi atau kering beku (liophilization atau freeze drying) dan kriopreservasi (cryopreservation atau cryogenic preservation) (Badjoeri, 2010; Machmoed, 2001).

Selain itu, kemungkinan komposisi 30 % gliserol paling mampu mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan. Gliserol juga akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis. Gliserol memiliki daya larut yang tinggi dengan media cair triptic soy broth (TSB) walaupun pada kondisi suhu dingin, memiliki daya penetrasi sampai ke dalam sel dan memiliki daya toksisitas yang rendah. Menurut Herdis dkk. (2003), gliserol mampu mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan. Gliserol juga akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis.

Gliserol adalah senyawa bahan kimia dengan rumus kimia HOCH₂CH(OH)CH₂OH, tidak berwarna, tidak berbau dan berupa cairan kental dengan titik leleh 18°C dan titik didih 290°C, sering digunakan pada formula obat-obatan. Gliserol sering juga disebut glycerin atau glicerine, bermassa jenis 1,1261, berasa manis dengan kadar racun rendah. Gliserol dapat mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan. Gliserol, seperti banyak zat lain yang memiliki sifat antibeku, benar-benar larut sebagai cairan tetapi bercampur dalam fase padat. Bakteri tertentu dapat dibekukan dengan penambahan gliserol tanpa mengalami kerusakan (Rojas-Tapias, et. al., dalam Lela, dkk., 2016)

Gliserol pada umumnya digunakan sebagai media dalam pengawetan atau penyimpanan jangka panjang atau sekedar sebagai media untuk memindahkan mikroorganisme. Gliserol dapat digunakan sebagai media karena gliserol dapat melindungi aktivitas antimikroba dengan cara meningkatkan stabilitas struktur protein asli dari mikroba sehingga dapat mencegah protein dari proses termal dan agregasi (Ariwulan, 2013). Gliserol 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.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian penyimpanan bakteri *A. hydrophila* pada media 60% TSB + 40% Gliserol, 70% TSB + 30% Gliserol dan 80% TSB + 20% Gliserol adalah sebagai berikut:

1. Sifat fisika bakteri *A. hydrophila* selama 3 bulan penyimpanan pada suhu -20 °C tidak mengalami perubahan fisik.
2. Perubahan sifat kimia terjadi pada bulan ketiga masa penyimpanan, yaitu hasil uji oksidase menunjukkan kemampuan bakteri untuk melakukan oksidase mulai melemah yang ditandai warna biru muda pada strip sitokrom, dan hasil uji oksidatif/fermentative

menunjukkan bahwa sifat fermentatif bakteri sangat lemah yang ditandai dengan perubahan warna media OF menjadi sedikit kuning (lemah).

3. Viabilitas bakteri *A. hydrophila* dengan penurunan terkecil diperoleh pada komposisi media 70% TSB + 30% Gliserol pada penyimpanan suhu -20 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2014. Media Pertumbuhan Mikroba. www.asalkamutahuaja.blogspot.com. Diakses tanggal 20 Pebruari 2014.
- 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.
- Ariwulan, D.R. 2013. Metode Penyimpanan Mikroba. <http://nightray13-kuro.blogspot.com/2013/01/boiteknologireviewtugas2.html>. Diakses tanggal 4 Nopember 2013
- Badjoeri, M. 2010. Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma Nutfah. *Warta Limnologi Tahun XXIII* No. 45: 1-9.
- Edwin. 2011. *Materi Kuliah Mikrobiologi*. Universitas Lambung Mangkurat, Banjar baru. Diakses pada tanggal 1 november 2014
- Herdis, KusumaI., M. Surachman, R.E..2003. Optimalisasi Kualitas Semen Beku Domba Garut dengan Pemberian Glyserol. Prosiding Seminar Teknologi untuk Negeri, Vol II. Bogor.
- ISO 6887-1: 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs – preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution.
- Jarod S, Johan T.I, Widantari, M. 2015. Pengaruh Gliserol Pada Media *Tryptic Soy Broth* (Tsb) Terhadap Viabilitas Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Jurnal Dinamika Pertanian* Volume XXX Nomor 1 April 2015 (83 - 91).
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Penerbit Rajawali Press. Jakarta. hlm 75
- SNI 2897. 2008. Sisni. [Bsn .go. id / index. php / SNI_main / SNI / detail_SNI / 7779](http://bsn.go.id/index.php/SNI_main/SNI/detail_SNI/7779)
- Machmoed, M. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikrobia. *Buletin AgriBio*. (4): 24-32.
- Murwantoko. 2008. Preservasi Bakteri. Pelatihan Metode Standar Pemeriksaan HPIK. 21-26 April 2008. Yogyakarta.
- Lela, S., Purnomo, ES. 2016. Viabilitas Sel Bakteri Dengan Cryoprotectant Agents Berbeda (Sebagai Acuan Dalam Preservasi Culture Collection di Laboratorium Mikrobiologi). Available online <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/biogenesis>. Vol 4, No. 1, Juni 2016, hal 34-40