



IDENTITAS PENULIS

Author Pertama – *as Corresponding author*

Nama * : Novita Cholifah Ida
Departemen * : UPT Laboratorium Biosain
Institusi * : Politeknik Negeri Jember
No Telp/HP ** : 081249715515
Email * : novita@polije.ac.id
Orcid ID + : <https://orcid.org/0000-0002-2457-2842>
Google Scholar ID + : v2xKgpIAAAAJ

Author Kedua

Nama * : Hadi Sariono
Departemen * : UPT Laboratorium Biosain
Institusi * : Politeknik Negeri Jember
No Telp/HP ** : 082232229191
Email * : hadi_sariono@polije.ac.id
Orcid ID + : <https://orcid.org/0000-0002-7770-2807>
Google Scholar ID + : cMAbdDkAAAAJ

Author Ketiga

Nama * : Herman Estu Eka Putra
Departemen * : Jurusan Produksi Pertanian
Institusi * : Politeknik Negeri Jember
No Telp/HP ** : 08565379060
Email * : hermanestu.ep@polije.ac.id
Orcid ID + : <https://orcid.org/0000-0003-3198-1385>
Google Scholar ID + : ughedYIAAAAJ

Dengan menyerahkan manuskrip ini, menyatakan bahwa semua penulis:

1. Telah membaca dan menyetujui naskah dan bertanggung jawab penuh atas isinya
2. Telah membaca dan menyetujui kebijakan hak cipta dan lisensi artikel yang dipublikasikan di Jurnal Pengembangan Potensi Laboratorium
3. Tidak memiliki konflik kepentingan sehubungan dengan penelitian ini atau pendanaannya.

(*) *Required*

(**) *Required, for corresponding author*

(+) *Optional*

Metode Penyimpanan Mikroba *Saccharomyces cerevisiae* Dengan Menggunakan Teknik Cryogenic Freezing Di Laboratorium Biosain

*Method of Storage of Microbes of *Saccharomyces cerevisiae* using Cryogenic Freezing Technique in Bioscience Laboratory*

Novita Cholifah Ida¹, Hadi Sariono², Herman Estu Eka Putra³

¹ UPT Laboratorium Biosain, Politeknik Negeri Jember

² UPT Laboratorium Biosain, Politeknik Negeri Jember

³ Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember

*novita@polije.ac.id

SUBMITTED : DEC 27, 2021

ACCEPTED : JAN 12, 2022

PUBLISHED : AUG 31, 2022

ABSTRAK

Di Laboratorium Biosain Politeknik Negeri Jember memiliki stok isolat *Saccharomyces cerevisiae* dalam jumlah yang banyak dengan biaya yang minimalis untuk proses penyimpanan. Selama ini di Laboratorium tersebut melakukan metode peremajaan secara berkala dengan cara inokulasi berulang pada media agar sehingga beresiko terkontaminasi yang mengakibatkan harus dilakukan identifikasi untuk memperoleh kultur standar mikroba yang murni. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode penyimpanan yang optimum untuk penyimpanan mikroba dalam jangka waktu panjang di Laboratorium Biosain. Metode penelitian ini adalah pengujian dan perbandingan viabilitas mikroba (*Saccharomyces cerevisiae*) pada penyimpanan jangka pendek yang dilakukan pada suhu dingin non-beku (refrigerator), dan penyimpanan jangka panjang, dengan cryogenic freezing. Metode tersebut dilakukan dengan pemberian agen krioprotektan (gliserol). Sehingga diharapkan mendapatkan ketersediaan isolat mikroba yang stabil dan pemanfaatannya berkelanjutan dalam jangka waktu yang diinginkan. Perlakuan penyimpanan *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode cryogenic freezing memberikan daya viabilitas lebih baik dibandingkan metode penyimpanan lainnya. Preservasi secara cryogenic, adalah teknik penyimpanan mikroba dalam media cair dengan penambahan senyawa cryoprotectant (gliserol 10 %) dan dibekukan pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair.

Kata kunci — penyimpanan isolat, cryogenic, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The Jember State Polytechnic Bioscience Laboratory has a large stock of *Saccharomyces cerevisiae* isolates with minimal costs for the storage process. So far, the laboratory has carried out periodic rejuvenation methods by repeated inoculation of the media so that it is at risk of contamination which results in identification to obtain pure microbial standard culture. This study aims to obtain the optimum storage method for long-term storage of microbes in the Bioscience Laboratory. The method of this research is to test and compare the viability of microbes (*Saccharomyces cerevisiae*) in short-term storage carried out at cold non-freezing temperatures (refrigerator), and long-term storage, with cryogenic freezing. The method is carried out by administering a cryoprotectant agent (glycerol). So it is hoped that the availability of stable microbial isolates and their sustainable use in the desired period of time will be obtained. Storage treatment of *Saccharomyces cerevisiae* with cryogenic freezing method provides better viability than other storage methods. Cryogenic preservation is a technique for storing microbes in liquid media with the addition of cryoprotectant compounds (10% glycerol) and frozen at very low temperatures in liquid nitrogen.

Keywords — *Saccharomyces cerevisiae*, cryoprotectant, cryogenic freezing

 OPEN ACCESS

© 2022. Novita Cholifah Ida, Hadi Sariono, Herman Estu Eka Putra



Creative Commons
Attribution 4.0 International License

1. Pendahuluan

Untuk menjaga biakan mikroba tetap bertahan lama pertumbuhan dan metabolismenya maka diperlukan suatu metode pembuatan dan penyimpanan koleksi mikroba (preservasi) yang sesuai. Metode preservasi tersebut bertujuan untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang, efisiensi pemakaian bahan, efisiensi tenaga serta untuk menjaga kestabilan genetic biakan mikroba. Tentu saja metode yang digunakan harus mempertimbangkan sifat dari mikroba serta tujuan dari preservasinya.

Tujuan metode preservasi jangka pendek biasanya dilakukan untuk keperluan rutin penelitian sedangkan metode preservasi jangka panjang dilakukan untuk koleksi dan konservasi plasma nutfah mikroba. Ada tiga faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuatan koleksi plasma nutfah mikroba yaitu adanya penguasaan teknologi, tersedianya fasilitas preservasi, dan tersedianya tenaga yang terampil.

Untuk menentukan teknik penyimpanan atau pengawetan mikroba diperlukan penelitian yang cukup rumit, dengan jangka waktu lama, serta dana yang besar karena sesuai dengan tujuan metode preservasi, yaitu mengurangi laju metabolisme dari mikroorganisme sampai dengan sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitas (daya hidupnya) dan memelihara sebaik mungkin biakan. Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan memindahkan secara berkala jangka pendek misalnya sebulan sekali dari media lama ke media baru. Teknik ini memerlukan waktu dan tenaga yang banyak serta mempunyai berbagai kendala yaitu kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian, peluang terjadinya kontaminasi dan terjadinya kekeliruan pemberian label. Metode penyimpan jangka panjang yang paling efektif dan banyak digunakan ialah metode liofilisasi atau kering beku (*liophylization* atau *freeze drying*) dan kriopreservasi (*cryopreservation* cryogen-ic preservation)(Clark, 1976). Kedua teknik tersebut dilaporkan paling berhasil untuk penyimpanan jangka panjang berbagai mikroba.

Di Laboratorium Biosain Politeknik Negeri Jember memiliki stok isolat *Saccharomyces cerevisiae* dalam jumlah yang banyak dengan biaya yang minimalis untuk

proses penyimpanan. Selama ini di Laboratorium tersebut melakukan metode peremajaan secara berkala dengan cara inokulasi berulang pada media agar sehingga berisiko terkontaminasi yang mengakibatkan harus dilakukan identifikasi untuk memperoleh kultur standar bakteri yang murni. Hal ini dapat menyebabkan penambahan biaya dan waktu pada pelaksanaan mutu internal.

Berdasarkan uraian tersebut, maka PLP/peneliti bermaksud melakukan penelitian dengan judul “Metode Penyimpanan Isolat *Saccharomyces cerevisiae* dengan Menggunakan Metode *Cryogenic Freezing* di Laboratorium Biosain.

2. Metodologi

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental meliputi penyiapan bahan, pembuatan media *cryoprotectant*, penanaman *Saccharomyces cerevisiae*, penyimpanan pada *deep freezer* dan pengamatan. Parameter penelitian yaitu Angka Lempeng Total (ALT) *Saccharomyces cerevisiae*. Masing-masing penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dilakukan pengujian viabilitas perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) dan Identifikasi *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi erlenmeyer (Pyrex), beaker glass (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan petri (Herma), inkubator (Mettler), Autoklaf (Tomy SEIKO), Laminar Air Flow Cabinet (Lokal), Oven (Mettler), Mikro Pipet, Plastic wrap, jarum ose, Parafilm, lemari pendingin (Samsung), kapas, bunsen, pinset, tabung reaksi, sprayer, spatula, batang pengaduk, timbangan digital (Sartorius), HotPlate (Cimarec), Deep Freezer -80°C (Thermoscientific), *Cryotube* 2 ml steril, kertas label, tissue, sarung tangan, vorteks, *Cryotube* box, Mikroskop Trinokuler (Olympus).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat murni *Saccharomyces cerevisiae*, Gliserol 10 %, Alkohol 97 %, *Potato Dextrose agar* (PDA), spirtus, aquades steril, Liquid Nitrogen.



2.2. Prosedur/cara penelitian

2.2.1. Persiapan media

- Menyiapkan media Potato Dextrose Agar (PDA) sebagai media tumbuh *Saccharomyces cerevisiae*
- Menyiapkan media cryoprotectant gliserol.
- Menumbuhkan *Saccharomyces cerevisiae* pada media agar cawan
- Menginkubasi isolat pada suhu 37°C selama tiga hari hingga isolat tumbuh dengan baik.

2.2.2. Pelaksanaan

- Menyiapkan *cryotube* yang diberi label.
- Memindahkan koloni *Saccharomyces cerevisiae* secara aseptik menggunakan ose dan memasukkan ke dalam *cryotube* yang telah berisi 1,5 mL *cryo-protectant* gliserol 10 %.
- Menghomogenkan *cryotube* yang telah berisi suspensi sel *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan vorteks.
- Memasukkan *cryotube* dalam box *cryotube* dan simpan dalam pendingin bersuhu 4°C dengan minimal waktu penyimpanan empat jam dan maksimal waktu penyimpanan 4 jam. Proses ini merupakan tahap aklimatisasi untuk mencegah rusaknya protoplasma dan dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* yang diakibatkan oleh perubahan suhu.
- Mengalirkan liquid Nitrogen (N₂ cair).
- Memindahkan kotak penyimpanan dalam *deep freezer* bersuhu -80°C.

2.2.3. Pengujian viabilitas *Saccharomyces cerevisiae*

- Pengujian ALT (Angka Lempeng Total) spora *Saccharomyces cerevisiae* yang disimpan pada media PDA dengan penyimpanan pada suhu ruang selama 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan.
- Pengujian ALT (Angka Lempeng Total) spora *Saccharomyces cerevisiae* yang disimpan pada media PDA dengan penyimpanan pada lemari pendingin bersuhu 4°C selama 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan.
- Pengujian ALT (Angka Lempeng Total) spora *Saccharomyces cerevisiae* yang

disimpan pada media cryoprotectant dengan penyimpanan pada *deep freezer* bersuhu -80 °C selama 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan.

3. Pembahasan

3.1. Viabilitas *Saccharomyces cerevisiae*

Daya hidup sel (viabilitas) *Saccharomyces cerevisiae* dari hasil pengamatan melalui perhitungan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* pada *Potatoe Dextrose Agar* memiliki perbedaan jumlah koloninya dengan perlakuan penyimpanan yang berbeda. Jumlah koloni awal sebelum penyimpanan dan data hasil perhitungan jumlah koloni setelah masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Jumlah koloni awal *Saccharomyces cerevisiae* sebelum penyimpanan.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jumlah koloni (cfu/ml)
Ulangan 1	1,40 x 10 ⁸
Ulangan 2	1,42 x 10 ⁸
Ulangan 3	1,41 x 10 ⁸
Rata-rata	1,41 x 10 ⁸

Tabel 2. Jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* setelah dilakukan masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dengan metode penyimpanan yang berbeda.

Lama Penyimpanan	Viabilitas dengan metode penyimpanan yang berbeda (cfu/ml)		
	Penyimpanan suhu ruang	Penyimpanan suhu 4°C	Penyimpanan dengan cryogenic freezing suhu -80°C
1 bulan	1,18 x 10 ⁸	1,33 x 10 ⁸	1,40 x 10 ⁸
2 bulan	9,14 x 10 ⁶	8,86 x 10 ⁷	1,40 x 10 ⁸
3 bulan	2,29 x 10 ⁶	2,13 x 10 ⁷	1,23 x 10 ⁸



Dari Tabel. 2 diatas menjelaskan bahwa penyimpanan *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode cryogenic freezing memberikan daya viabilitas lebih baik apabila dibandingkan dengan metode penyimpanan lainnya. Dengan penambahan gliserol 10 % sebagai cryoprotectant pada proses penyimpanan menunjukkan daya viabilitas *Saccharomyces cerevisiae* yang cukup tinggi. (Hubálek, 2003) melaporkan dari hasil penelitian yang menunjukkan bahwa dengan pemilihan gliserol sebagai cryoprotectant harus disesuaikan dengan jenis mikroba yang akan dilakukan penyimpanan. Gliserol adalah agensia cryoprotectant yang digunakan untuk mencegah sel rusak karena disebabkan proses freezing.

Preservasi secara cryogenic, adalah teknik penyimpanan mikroba dalam media cair dengan penambahan senyawa cryoprotectant (larutan konservatif) dan dibekukan pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair. *Saccharomyces cerevisiae* menunjukkan daya viabilitas yang stabil setelah 2 bulan masa simpan di freezer -80°C dengan cryoprotectant 10 % gliserol yang semula jumlah koloni induk awal *Saccharomyces cerevisiae* sebelum penyimpanan $1,41 \times 10^8$ cfu/ml menjadi $1,40 \times 10^8$ cfu/ml setelah penyimpanan 1 bulan dan $1,40 \times 10^8$ cfu/ml setelah penyimpanan 2 bulan (Tabel 2). Semakin rendah suhu penyimpan mikroba akan semakin kecil kemungkinan kehilangan kemampuan viabilitasnya. Penyimpanan pada suhu sangat rendah dapat dilakukan dengan merendamnya dalam nitrogen cair yang suhunya mencapai -196°C. Menurut (Park et al., 2001) selain gliserol, bahan DMSO juga telah dimanfaatkan sebagai cryoprotectant melalui metode simpan beku karena mampu mengurangi efek larutan yang dapat menyebabkan terbentuknya kristal es dalam sel.

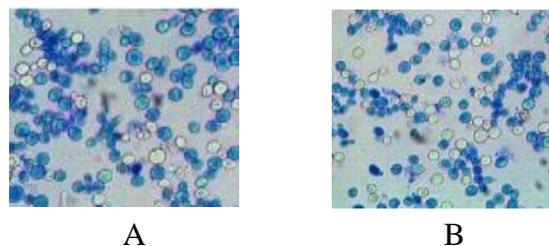
Kedua teknik yang dilaporkan paling efektif dan banyak dilakukan untuk penyimpanan jangka panjang mikroba adalah metode liofilisasi dan kriopreservasi. Menurut (Machmud, 2001) pemilihan metode penyimpanan ditentukan oleh jenis mikroba dan tujuan penyimpanannya metode yang dipilih tersebut harus tetap menjaga sifat sel mikroba, kestabilan sifat genetiknya, hemat biaya serta tenaga.

3.2. Identifikasi *Saccharomyces cerevisiae*

(Wuczowski et al., 2006) menjelaskan untuk mengetahui ciri morfologi sel kultur *Saccharomyces cerevisiae* yang meliputi bentuk sel dan sifat sel berdasarkan pewarnaan dapat dilakukan dengan pengecatan sederhana, pengecatan gram, dan ada tidaknya spora dengan membuat preparat ulas diikuti oleh pengecatan yang diamati di bawah mikroskop

3.2.1. Pengecatan Sederhana

Pengecatan sederhana ini untuk mempermudah identifikasi dengan mengamati bentuk sel menggunakan zat warna (methylen blue) untuk mengikat kontras antara mikroba dengan sekelilingnya. Setelah dilakukan pengecatan dengan methylen blue akan diperoleh koloni yang berwarna biru (Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., 1980).



Gambar 1. Hasil pengecatan sederhana *Saccharomyces cerevisiae* perbesaran 400 x

Keterangan :

A = Sel *Saccharomyces cerevisiae* sebelum penyimpanan (kultur standar)

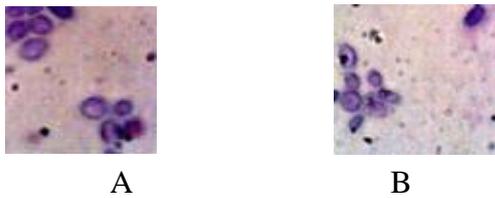
B = Sel *Saccharomyces cerevisiae* setelah penyimpanan 3 bulan dengan cryogenic freezing

Dari hasil pengamatan terlihat sel *Saccharomyces cerevisiae* (kultur standar) sebelum penyimpanan yang dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* setelah penyimpanan 3 bulan dengan cryogenic freezing yaitu berbentuk bulat oval.

3.2.2. Pengecatan Gram

Untuk proses identifikasi mikroba diperlukan pengecatan. Dengan pengecatan gram mikroba teridentifikasi menjadi kelompok gram positif dan gram negatif. Dari pengecatan tersebut, mikroba yang termasuk dalam kelompok gram positif memiliki range

warna dari biru ungu sampai kehitaman sedangkan untuk mikroba kelompok gram negatif tampak berwarna merah. (Lay, 1994)



Gambar 2. Hasil pengecatan gram *Saccharomyces cerevisiae* perbesaran 1000 x

A = Sel *Saccharomyces cerevisiae* sebelum penyimpanan (kultur standar) berwarna biru ungu karena bersifat gram positif

B = Sel *Saccharomyces cerevisiae* setelah penyimpanan 3 bulan dengan cryogenic freezing berwarna biru ungu karena bersifat gram positif

Berdasarkan hasil pengecatan gram diperoleh bahwa sel *Saccharomyces cerevisiae* (kultur standar) sebelum penyimpanan yang dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* setelah penyimpanan 3 bulan dengan cryogenic freezing sama-sama merupakan kelompok gram positif dan berwarna biru/ungu.

Struktur dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* pada sel-sel yang masih muda sangat tipis dan semakin lama semakin tua menjadi semakin tebal. Komponen terbesar dari dinding sel *yeast* adalah Glukan yang memiliki afinitas kuat terhadap crystal violet dan iodine sehingga hasil pewarnaan gram berwarna biru keunguan. (Fardiaz & Srikandi, 1992)

3.2.3. Pengecatan Spora

Tujuan dilakukan pengecatan spora adalah untuk mengetahui adanya spora atau tidak adanya spora pada *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae memiliki beberapa ciri diantaranya dengan membentuk tunas multilateral (*budding*) pada sistem reproduksinya (Pitt & Hocking, 2009).



A B

Gambar 3. Hasil pengecatan spora *Saccharomyces cerevisiae* dengan perbesaran 1000 x

A = Sel vegetatif *Saccharomyces cerevisiae* sebelum penyimpanan (kultur standar) mempunyai warna merah

B = Sel vegetatif *Saccharomyces cerevisiae* setelah penyimpanan 3 bulan dengan cryogenic freezing mempunyai warna merah

4. Kesimpulan

Dalam penelitian ini penyimpanan cryogenic dengan memanfaatkan gliserol sebagai cryoprotectant menunjukkan daya viabilitas koloni *Saccharomyces cerevisiae* yang relatif tinggi dan stabil. Penambahan 10% gliserol dan Liquid Nitrogen dapat digunakan untuk alternatif metode penyimpanan cryogenic freezing *Saccharomyces cerevisiae* di Lab Biosain Politeknik Negeri Jember dan merupakan metode yang paling efektif untuk penyimpanan mikroba jangka panjang.

5. Ucapan Terima Kasih

Kami ucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Politeknik Negeri Jember atas kesempatan pendanaan yang diberikan kepada peneliti melalui dana DIPA Politeknik Negeri Jember SP DIPA-023.18.2.677607/2021 tanggal 23 November 2020 Tahun Anggaran 2021

Daftar Pustaka

- Clark, W. A. (1976). *Selected bibliography of literature on preservation of microorganisms, blood, tissues, and vaccines with emphasis on freezing and freeze-drying (1968- 1976)*.
- Fardiaz, & Srikandi. (1992). Mikrobiologi pangan 1 / Srikandi Fardiaz. In *Koleksi Buku UPT Perpustakaan Universitas Negeri Malang* (Vol. 0, Issue 0). Gramedia, Pustaka Utama.

Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S.,

- S. D. (1980). *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta*. UGM Press. Yogyakarta.
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Machmud, M. (2001). Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*, 4(1), 24–32.
- Park, S. H., Lee, H. S., & Lee, H. K. (2001). Preservation of Marine Heterotrophic Bacteria by Using a Deep-freezing Method. *Journal of Microbiology*, 39(3), 240–243.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Wuczkowski, M., Gherbawy, Y., Kraus, G. F., Kubicek, C. P., Sterflinger, K., & Prillinger, H. (2006). Identification of filamentous fungi and yeasts and their diversity in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna , Austria (“ Nationalpark Donauauen ”). In *International Journal* (Vol. 54, Issue 2).

