

Modifikasi Metode Freezing dengan Krioprotektan DMSO terhadap Kualitas Penyimpanan Mikroba *Saccharomyces cerevisiae* Di Laboratorium Biosain

*Modification of the Freezing Method with DMSO Cryoprotectant on the Storage Quality of *Saccharomyces cerevisiae* in the Bioscience Laboratory*

Novita Cholifah Ida ¹, Hadi Sariono ², Endang Widayatiningrum ³

¹ UPA Biosains, Politeknik Negeri Jember

² UPA Biosains, Politeknik Negeri Jember

³ Jurusan Kesehatan, Politeknik Negeri Jember

*novita@polije.ac.id

ABSTRAK

Proses perbanyakan dan penyimpanan kultur mikroba menjadi hal yang harus diperhatikan karena cara penyimpanan sangat terkait dengan perubahan sifat mikroba yang disimpan. Di Laboratorium, kultur murni dipindahkan dengan metode subkultur. Beberapa dampak subkultur yang berulang akan memakan waktu, berisiko kontaminasi dan mutasi genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan penyimpanan mikroba *Saccharomyces cerevisiae* jangka panjang yang aplikatif di Laboratorium Biosain serta menentukan jenis *Cryoprotectant* Agent yang dapat mempertahankan viabilitas sel mikroba *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode *Freezing*. Dalam penelitian sebelumnya peneliti menggunakan metode preservasi cryogenic freezing dengan menggunakan gliserol. Gliserol atau sukrosa dapat berperan sebagai krioprotektan, namun keduanya juga dapat mengakibatkan kematian sel akibat toksisitas dari krioprotektan tersebut. Penggunaan agensia krioprotektan DMSO 5 % dan gliserol 10 % dapat direkomendasikan untuk di gunakan sebagai referensi simpan beku (*freezing*) sel *Saccharomyces cerevisiae* di Laboratorium Biosain dan merupakan metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif untuk dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan agent krioprotektan yang menghasilkan persentase penurunan viabilitas paling stabil dengan metode freezing adalah krioprotektan DMSO 5 % dengan persentase penurunan viabilitas sebesar 3,28 % untuk penyimpanan selama 1 bulan, persentase penurunan viabilitas sebesar 4,10 % untuk penyimpanan selama 2 bulan dan persentase penurunan viabilitas sebesar 16,39 % untuk penyimpanan selama 3 bulan. Kemudian diikuti agent krioprotektan gliserol 10 % dengan persentase penurunan viabilitas sebesar 5,74 % untuk penyimpanan selama 1 bulan, persentase penurunan viabilitas sebesar 7,38 % untuk penyimpanan selama 2 bulan dan persentase penurunan viabilitas sebesar 18,20 % untuk penyimpanan selama 3 bulan.

Kata kunci — krioprotektan, DMSO, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The process of propagation and storage of microbial cultures is something that must be considered because the method of storage is closely related to changes in the properties of the stored microbes. In the Laboratory, pure cultures are transferred by subculture method. Some effects of repeated subcultures will take time, risk contamination and genetic mutations. This research aims to develop a long-term storage of applicable *Saccharomyces cerevisiae* microbes in the Bioscience Laboratory and determine the type of *Cryoprotectant* Agent that can maintain the viability of *Saccharomyces cerevisiae* microbial cells using the *Freezing* method. In a previous study, researchers used the cryogenic freezing preservation method using glycerol. Glycerol or sucrose can act as cryoprotectants, but both can also cause cell death due to the toxicity of these cryoprotectants. The use of cryoprotectant agents DMSO 5% and 10% glycerol can be recommended for use as a reference for freezing *Saccharomyces cerevisiae* cells in the Bioscience Laboratory and is the most effective long-term storage method to do. The results showed that the cryoprotectant agent that produced the most stable percentage of decreased viability by the freezing method was DMSO 5% cryoprotectant with a percentage of decreased viability of 3,28% for storage for 1 month, a percentage of decreased viability of 4,10% for storage for 2 months and a percentage of decreased viability of 16,39% for storage for 3 months. Then followed by 10% glycerol cryoprotectant agent with a percentage decrease in viability of 5,74% for storage for 1 month, a percentage decrease in viability of 7,38% for storage for 2 months and a percentage decrease in viability of 18,20% for storage for 3 months.

Keywords — *Cryoprotectant*, DMSO, *Saccharomyces cerevisiae*

 OPEN ACCESS

© 2023. Novita Cholifah Ida, Hadi Sariono, Endang Widayatiningrum



Creative Commons
Attribution 4.0 International License

1. Pendahuluan

Penyimpanan biakan mikroba tanpa terjadi perubahan karakternya merupakan aspek yang sangat penting dalam suatu penelitian maupun industri. *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan untuk melakukan pertumbuhan yang cepat dan dapat berubah atau menurun selama proses penyimpanan. Keadaan tersebut dapat dihindari dengan menjaga kondisi penyimpanan dengan baik sehingga mutasi dan tingkat kematian sel yang tinggi tidak terjadi. Salah satu cara penyimpanan sel *Saccharomyces cerevisiae* adalah dengan penyimpanan suhu rendah yang dapat memperlambat reaksi sehingga memperlambat proses metabolisme. Namun, suhu rendah atau beku dapat menyebabkan efek yang merusak sel.

Berbagai proses kerusakan fisiologi sel diakibatkan karena suhu yang rendah dan beku. Sel dapat rusak dikarenakan peristiwa fisik, yaitu terbentuknya kristal es yang merusak membran sel. Pembekuan yang cepat dan pencairan yang lambat juga dapat menyebabkan mortalitas yang tinggi pada *Saccharomyces cerevisiae* akibat terbentuknya kristal es. Membran plasma juga dapat sebagai target utama dari kerusakan fisiologis pada sel yang disimpan pada suhu yang rendah dikarenakan berubahnya karakter semi-permeabilitas membran, perubahan aktivitas enzim membran, transisi fase dan membran yang mengalami fusi.

Laboratorium Biosain Politeknik Negeri Jember adalah laboratorium yang mempunyai koleksi biakan *Saccharomyces cerevisiae* akan terus diupayakan metode penyimpanan preservasi yang optimal dan pemanfaatannya berkelanjutan dalam jangka waktu yang diinginkan. Dalam penelitian sebelumnya peneliti menggunakan metode preservasi cryogenic freezing dengan menggunakan gliserol 10 %. Gliserol atau sukrosa dapat berperan sebagai krioprotektan, namun keduanya juga dapat mengakibatkan kematian sel akibat toksisitas dari krioprotektan tersebut. Sifat toksik kedua krioprotektan tersebut tinggi pada konsentrasi yang rendah. Mengingat sifat membran sel yang tidak permeabel terhadap gliserol dan sukrosa.

Berdasarkan uraian tersebut, maka PLP/peneliti bermaksud melakukan penelitian

lanjutan dengan judul “Modifikasi Metode Freezing dengan Krioprotektan DMSO Terhadap Kualitas Penyimpanan Mikroba *Saccharomyces cerevisiae* di Laboratorium Biosain.

2. Metodologi

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi penyiapan bahan, pembuatan media krioprotektan DMSO dan gliserol, penanaman *Saccharomyces cerevisiae*, penyimpanan pada *deep freezer* dan pengamatan. Parameter penelitian yang digunakan adalah viabilitas jumlah koloni dengan menghitung Angka Lempeng Total (ALT) *Saccharomyces cerevisiae* dan mengukur OD (optical density) serta pengamatan Mikroskopis. Masing-masing pengujian dilakukan tiga kali pengulangan pada penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan.

2.1. Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan alat-alat yang 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), Hot Plate (Cimarec), Deep Freezer -80°C (GEA), *Cryotube* 2 ml steril, kertas label, tissue, sarung tangan, vorteks, *Cryotube box*, Spektrofotometer.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat murni *Saccharomyces cerevisiae*, gliserol, DMSO (Dimethyl sulfoxide), Alkohol, *Potato Dextrose agar* (PDA), spirtus, aquades steril, Liquid Nitrogen.

2.2. Prosedur/cara penelitian

2.2.1. Persiapan media

Menyiapkan media tumbuh *Saccharomyces cerevisiae* yaitu media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan media cryoprotectant DMSO dan gliserol dengan konsentrasi masing-masing 5 % dan 10 %, kemudian menumbuhkan *Saccharomyces cerevisiae* pada media agar cawan dan melakukan inkubasi isolat pada suhu



37°C selama tiga hari hingga isolat tumbuh dengan baik.

2.2.2. Pelaksanaan

Menyiapkan *cryotube*, kemudian memindahkan koloni *Saccharomyces cerevisiae* secara aseptik menggunakan ose dan memasukkan ke dalam *cryotube* yang telah berisi 1,5 mL *cryo-protectant* gliserol dan DMSO dengan konsentrasi masing-masing 5 % dan 10 %, Menghomogenkan *cryotube* yang telah berisi suspensi sel *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan vortex, memasukkan *cryotube* dalam box *cryotube* dan menyimpan dalam pendingin bersuhu 4°C dengan minimal waktu penyimpanan 4 jam dan maksimal waktu penyimpanan 24 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) dan memindahkan kotak penyimpanan dalam *deep freezer* bersuhu -80°C.

2.2.3. Pengujian viabilitas *Saccharomyces cerevisiae*

- Menentukan 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.

- Menentukan 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.
- Menentukan 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

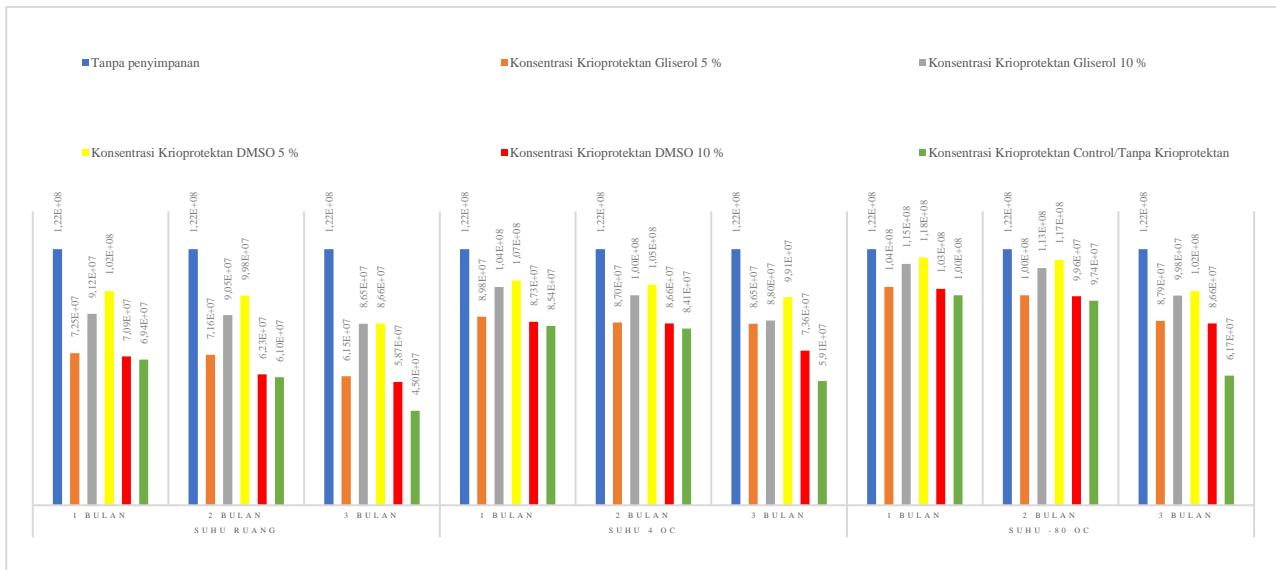
3.1. Viabilitas *Saccharomyces cerevisiae*

Hasil pengamatan daya hidup sel (viabilitas) melalui perhitungan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* pada media *Potatoe Dextrose Agar* memiliki perbedaan jumlah koloninya dengan metode penyimpanan yang berbeda dan jenis krioprotektan yang berbeda. Jumlah koloni starter awal sebelum/tanpa dilakukan penyimpanan dan data hasil perhitungan jumlah koloni setelah masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dengan krioprotektan yang berbeda ditampilkan pada Tabel dan Gambar 1.

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

Penyimpanan		Tanpa penyimpanan	Konsentrasi Krioprotektan				Tanpa Krioprotektan
			Gliserol		DMSO		
			5 %	10 %	5 %	10 %	
suhu ruang	1 bulan	1,22x10 ⁸	7,25x10 ⁷	9,12x10 ⁷	1,02x10 ⁸	7,09x10 ⁷	6,94x10 ⁷
	2 bulan		7,16x10 ⁷	9,05x10 ⁷	9,98x10 ⁷	6,23x10 ⁷	6,10x10 ⁷
	3 bulan		6,15x10 ⁷	8,65x10 ⁷	8,66x10 ⁷	5,87x10 ⁷	4,50x10 ⁷
suhu 4°C	1 bulan		8,98x10 ⁷	1,04x10 ⁸	1,07x10 ⁸	8,73x10 ⁷	8,54x10 ⁷
	2 bulan		8,70x10 ⁷	1,00x10 ⁸	1,05x10 ⁸	8,66x10 ⁷	8,41x10 ⁷
	3 bulan		8,65x10 ⁷	8,80x10 ⁷	9,91x10 ⁷	7,36x10 ⁷	5,91x10 ⁷
Suhu -80°C	1 bulan		1,04x10 ⁸	1,15x10 ⁸	1,18x10 ⁸	1,03x10 ⁸	1,00x10 ⁸
	2 bulan		1,00x10 ⁸	1,13x10 ⁸	1,17x10 ⁸	9,96x10 ⁷	9,74x10 ⁷
	3 bulan		8,79x10 ⁷	9,98x10 ⁷	1,02x10 ⁸	8,66x10 ⁷	6,17x10 ⁷





Gambar 1. Jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* setelah masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dengan metode penyimpanan yang berbeda dan jenis krioprotektan yang berbeda.

Berdasarkan tabel dan gambar 1 di atas penyimpanan *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode freezing menunjukkan daya viabilitas lebih stabil ketika disimpan pada agensia krioprotektan DMSO 5 % dan gliserol 10 %. Dari data tersebut diketahui sebelum penyimpanan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* sebesar $1,22 \times 10^8$ cfu/ml kemudian dengan penambahan agensia krioprotektan DMSO 5 % dengan metode freezing suhu -80°C jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* sebesar $1,18 \times 10^8$ cfu/ml selama penyimpanan 1 bulan, sebesar $1,17 \times 10^8$ cfu/ml selama penyimpanan 2 bulan dan sebesar $1,02 \times 10^8$ cfu/ml selama penyimpanan 3 bulan. Sedangkan dengan penambahan agensia krioprotektan Gliserol 10 % dengan metode freezing suhu -80°C jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* sebesar $1,15 \times 10^8$ cfu/ml selama penyimpanan 1 bulan, sebesar $1,13 \times 10^8$ cfu/ml selama penyimpanan 2 bulan dan sebesar $9,98 \times 10^7$ cfu/ml selama penyimpanan 3 bulan.

(Hubálek, 2003) menjelaskan bahwa gliserol yang digunakan sebagai cryoprotectant harus disesuaikan dengan tipe sel yang akan disimpan. Gliserol merupakan agensia cryoprotectant yang dapat mencegah rusaknya sel karena adanya proses freezing. DMSO merupakan agensia cryoprotectant yang dapat mereduksi eutentic point air sehingga mencegah

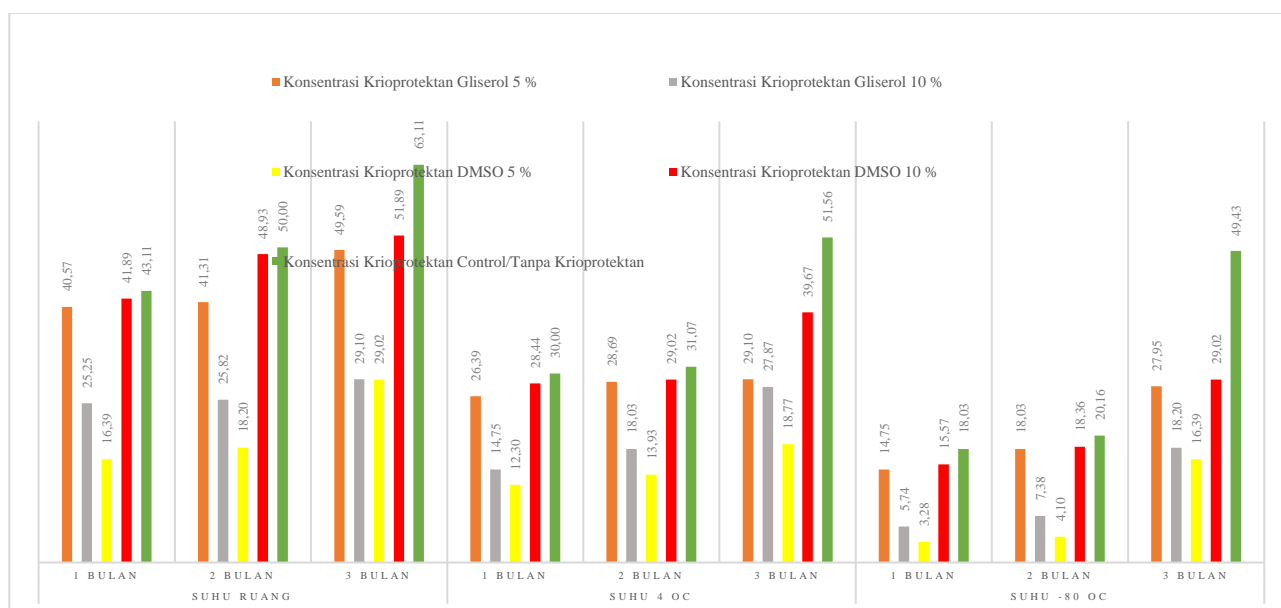
terbentuknya kristal es yang dapat berakibat pada terbentuknya *intracellular ice*. Akan tetapi pemilihan cryoprotectant tergantung tipe sel yang disimpan. DMSO lebih mudah berpenetrasi ke dalam sel.

3.2. Efektivitas penurunan viabilitas

Berdasarkan tabel dan gambar 2 di bawah ini agensia krioprotektan yang menghasilkan persentase penurunan viabilitas paling stabil dengan metode freezing adalah krioprotektan DMSO 5 % dengan persentase penurunan viabilitas sebesar 3,28 % untuk penyimpanan selama 1 bulan, persentase penurunan viabilitas sebesar 4,10 % untuk penyimpanan selama 2 bulan dan persentase penurunan viabilitas sebesar 16,39 % untuk penyimpanan selama 3 bulan. Kemudian diikuti agensia krioprotektan gliserol 10 % dengan persentase penurunan viabilitas sebesar 5,74 % untuk penyimpanan selama 1 bulan, persentase penurunan viabilitas sebesar 7,38 % untuk penyimpanan selama 2 bulan dan persentase penurunan viabilitas sebesar 18,20 % untuk penyimpanan selama 3 bulan. Baik DMSO 5 % maupun gliserol 10 % efektif penyimpanannya dengan metode penyimpanan freezing suhu -80°C .

Tabel 2. Efektifitas persentase penurunan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* setelah masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dengan metode penyimpanan yang berbeda dan jenis krioprotektan yang berbeda.

Penyimpanan		Konsentrasi Krioprotektan				Control/Tanpa Krioprotektan
		Gliserol 5 %	Gliserol 10 %	DMSO 5 %	DMSO 10 %	
suhu ruang	1 bulan	40,57	25,25	16,39	41,89	43,11
	2 bulan	41,31	25,82	18,20	48,93	50,00
	3 bulan	49,59	29,10	29,02	51,89	63,11
suhu 4 °C	1 bulan	26,39	14,75	12,30	28,44	30,00
	2 bulan	28,69	18,03	13,93	29,02	31,07
	3 bulan	29,10	27,87	18,77	39,67	51,56
suhu -80 °C	1 bulan	14,75	5,74	3,28	15,57	18,03
	2 bulan	18,03	7,38	4,10	18,36	20,16
	3 bulan	27,95	18,20	16,39	29,02	49,43



Gambar 2. Efektifitas persentase penurunan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* setelah masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dengan metode penyimpanan yang berbeda dan jenis krioprotektan yang berbeda.

Untuk konsentrasi DMSO 10 % dan gliserol 5 % menghasilkan persentase penurunan viabilitas yang tidak stabil sehingga efektifitas persentase penurunan koloninya besar. Konsentrasi agensia krioprotektan tersebut akan berpengaruh pada viskositasnya. Konsentrasi DMSO yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi

enzim pada suhu ruang dan menyebabkan ketidakstabilan protein. Konsentrasi DMSO kurang dari 2% tidak efektif dalam mempreservasi, sedangkan apabila konsentrasi DMSO lebih dari 12% akan menyebabkan toksik. DMSO dan gliserol umumnya digunakan pada konsentrasi 5 – 10% (v/v) (Simione, 2009).

3.3. Optical Density (OD) *Saccharomyces cerevisiae*

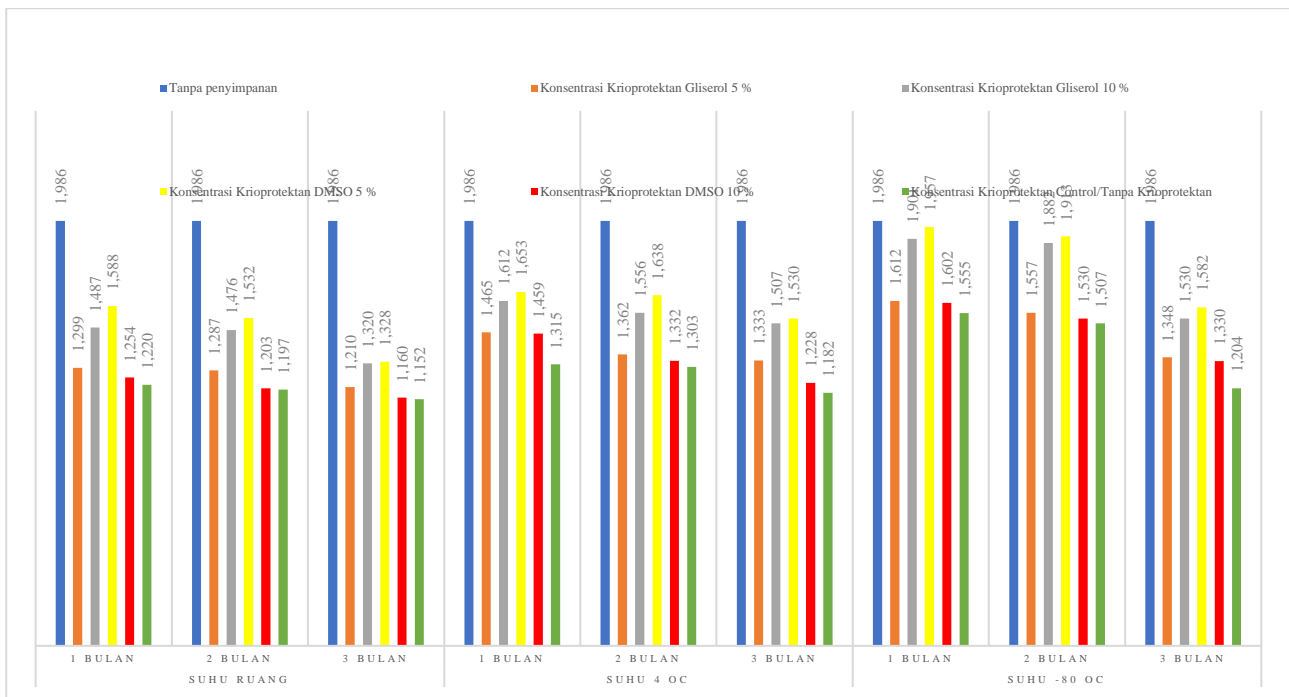
Viabilitas koloni *Saccharomyces cerevisiae* juga dapat dilakukan secara kuantitatif dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prinsip spektrofotometri UV-Vis berdasarkan hukum Lambert-Beer, yaitu cahaya monokromatis dilewatkan melalui suatu media, dengan bertambah turunnya intensitas cahaya

yang ditransmisikan maka sebanding dengan tebal dan kepekaan media yang digunakan.

Parameter *Optical Density* (OD) yang digunakan adalah absorbansi. Suspensi *Saccharomyces cerevisiae* divortex lalu diukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer (λ 480 nm). Pengukuran *Optical Density* (OD) dilakukan sebelum dan setelah penyimpanan dan selisih dari kedua nilai tersebut digunakan untuk menentukan pertumbuhan mikroba.

Tabel 3. Hasil pengukuran absorbansi *Saccharomyces cerevisiae* dengan penambahan krioprotektan dan penyimpanan yang berbeda

	Penyimpanan	Tanpa penyimpanan	Konsentrasi Krioprotektan				Control/Tanpa Krioprotektan
			Gliserol 5%	Gliserol 10 %	DMSO 5%	DMSO 10%	
suhu ruang	1 bulan	1,986	1,299	1,487	1,588	1,254	1,220
	2 bulan		1,287	1,476	1,532	1,203	1,197
	3 bulan		1,210	1,320	1,328	1,160	1,152
Suhu 4 °C	1 bulan		1,465	1,612	1,653	1,459	1,315
	2 bulan		1,362	1,556	1,638	1,332	1,303
	3 bulan		1,333	1,507	1,530	1,228	1,182
Suhu -80 °C	1 bulan		1,612	1,901	1,957	1,602	1,555
	2 bulan		1,557	1,882	1,913	1,529	1,507
	3 bulan		1,348	1,530	1,582	1,330	1,204



Gambar 3. Data hasil uji kekeruhan kultur *Saccharomyces cerevisiae* dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Tabel dan gambar 3 adalah data hasil uji kekeruhan kultur *Saccharomyces cerevisiae* dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Dari data tersebut dijelaskan bahwa kultur koloni *Saccharomyces cerevisiae* sebelum dilakukan penyimpanan mempunyai nilai absorbansi yang besar yaitu 1,986 dengan jumlah koloni $1,22 \times 10^8$ cfu/ml. Nilai absorbansi berikutnya setelah dilakukan penyimpanan 1 bulan dengan penambahan agensia krioprotektan DMSO 5 % mempunyai nilai absorbansi 1,957, setelah dilakukan penyimpanan 2 bulan nilai absorbansi menjadi 1,913 dan setelah dilakukan penyimpanan 3 bulan nilai absorbansi menjadi 1,582. Nilai absorbansi tersebut berkorelasi dengan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* yang tumbuh. Semakin keruh media uji maka makin banyak jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang tumbuh. Cahaya yang dipancarkan pada spektrofotometer akan mengenai sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga sebagian cahaya akan diserap dan sebagian diteruskan.

4. Kesimpulan

Agensia krioprotektan yang menghasilkan persentase penurunan viabilitas paling stabil dengan metode freezing adalah krioprotektan DMSO 5 % dengan persentase penurunan

viabilitas sebesar 3,28 % untuk penyimpanan selama 1 bulan, persentase penurunan viabilitas sebesar 4,10 % untuk penyimpanan selama 2 bulan dan persentase penurunan viabilitas sebesar 16,39 % untuk penyimpanan selama 3 bulan. Kemudian diikuti agent krioprotektan gliserol 10 % dengan persentase penurunan viabilitas sebesar 5,74 % untuk penyimpanan selama 1 bulan, persentase penurunan viabilitas sebesar 7,38 % untuk penyimpanan selama 2 bulan dan persentase penurunan viabilitas sebesar 18,20 % untuk penyimpanan selama 3 bulan.

Penggunaan agensia krioprotektan DMSO 5 % dan gliserol 10 % dapat direkomendasikan untuk di gunakan sebagai referensi simpan beku (*freezing*) sel *Saccharomyces cerevisiae* di Laboratorium Biosain dan merupakan metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif untuk dilakukan.

5. Ucapan Terima Kasih

Mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Politeknik Negeri Jember atas diberikannya kesempatan pendanaan kepada peneliti melalui dana DIPA Politeknik Negeri Jember SP DIPA-

Daftar Pustaka

- [1] 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).
- [2] Fardiaz, & Srikandi. (1992). Mikrobiologi pangan 1 / Srikandi Fardiaz. In Koleksi Buku UPT Perpustakaan Universitas Negeri Malang (Vol. 0, Issue 0). Gramedia, Pustaka Utama.
- [3] Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229.
- [4] Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., S. D. (1980). Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta. UGM Press. Yogyakarta.
- [5] Lay, B. W. (1994). Analisis Mikroba di Laboratorium. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- [6] Machmud, M. (2001). Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*, 4(1), 24–32.
- [7] 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.
- [8] 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>
- [9] 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).