

VIABILITAS *CLOSTRIDIUM* SPP. SETELAH KONSERVASI EKSITU DALAM JANGKA WAKTU LAMA PADA SUHU KAMAR

(*Clostridium* Spp. Viability after Ex Situ Conservation in
Long Storage at Room Temperature)

SITI CHOTIAH dan LILY NATALIA

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

ABSTRACT

A wide variety of techniques are used for the preservation of microbes and it may be difficult to choose the most suitable for a particular microbes. The preservation method used should minimize loss of viability during processing and storage so that after preservation, cultures will survive for long periods. *Clostridium* spp. viability after ex situ conservation by freeze-drying technique with Robertson's cooked meat medium as preservation medium in long storage period at room temperature have been evaluated for achieving the suitable and efficient monitoring in the microbial germ plasma preservation. A total of 376 dried culture samples of 115 *Clostridium* spp. collection consist of 27 species prepared in vacuum glass ampoules, stored for more than 10 years at room temperature have been evaluated for their viability. Each sample was grown on specific medium and identified for the bacterial species and type. The results showed that 9 of 115 collections, representing 7 different species failed to grow during 12 to 19 years storage. That 7 species were able to grow during 21 to 30 years ex situ conservation by freeze-drying technique with *mist. desiccans* preservation medium. It is suggested that *mist. desiccans* preservation medium was better be used in *freeze-drying* technique to conserve *Clostridium* spp. germ plasma.

Key Words: Viability, *Clostridium* spp., Ex Situ Conservation

ABSTRAK

Berbagai macam teknik telah digunakan untuk preservasi mikroba dan terkadang sulit menentukan teknik yang sesuai dan tepat untuk mikroba tertentu. Metode preservasi yang digunakan harus meminimalkan kehilangan viabilitas selama proses dan penyimpanan, sehingga setelah preservasi kultur akan hidup untuk waktu yang lama. Viabilitas *Clostridium* spp. setelah konservasi eks situ dengan metode *freeze-drying* menggunakan medium *Robertson's cooked meat* dalam jangka waktu lama pada suhu kamar telah dievaluasi untuk mendapatkan cara pemantauan yang tepat dan efisien dalam pelestarian plasma nutfah. Sebanyak 376 sampel kultur kering di dalam kemasan ampul gelas dalam kondisi vakum berasal dari 115 koleksi *Clostridium* spp. yang terdiri dari 27 macam spesies yang disimpan lebih dari 10 tahun pada suhu kamar, telah diuji viabilitasnya. Masing-masing sampel ditumbuhkan dalam medium khusus untuk kemudian diidentifikasi spesies dan tipenya. Hasil menunjukkan bahwa 9 dari 115 koleksi berasal dari 7 spesies yang berbeda sudah tidak memiliki kemampuan tumbuh setelah dikonservasi selama 12 sampai dengan 19 tahun. Tujuh spesies tersebut dalam konservasi eks situ menggunakan metode *freeze drying* dengan medium preservan *mist. desiccans* masih bisa tumbuh setelah penyimpanan selama 21 sampai dengan 30 tahun. Semakin lama *Clostridium* spp. tahan hidup dalam konservasi eks situ akan semakin efisien didalam pengelolaannya. Disarankan medium preservan *mist. desiccans* lebih baik digunakan dalam metode *freezedrying* plasma nutfah *Clostridium* spp.

Kata Kunci: Viabilitas, *Clostridium* spp., Konservasi Eksitu

PENDAHULUAN

Dalam menghadapi era globalisasi mikroba sangat penting karena akan mempunyai

peluang besar dalam pembangunan ekonomi di Indonesia dimasa mendatang. Hal ini akan lebih penting lagi bila dihubungkan dengan perkembangan bioteknologi, karena mikroba

melalui rekombinasi DNA, fusi sel dan teknik bioproses terbukti memegang peranan besar dalam dunia industri, pertanian, kesehatan dan lingkungan. Mikroba tidak hanya dipergunakan untuk proses konvensional seperti *brewing* dan *baking*, fermentasi tradisional (tempe, kecap, oncom, tauco), produksi asam organik (asam cuka, asam laktat), asam amino (glutamat) dan produksi obat-obatan (antibiotik, vaksin) tetapi juga dipergunakan sebagai sumber genetik untuk berbagai keperluan khususnya dalam merakit jasad hidup transgenik.

Penggunaan mikroba yang semakin meningkat harus diimbangi dengan pelestariannya. Pelestarian mikroba dilakukan dengan mengkonservasi secara eksitu yang kini banyak dilakukan di suatu koleksi biakan mikroba. Koleksi biakan mikroba memegang peranan penting dalam perkembangan mikrobiologi, ia harus mampu memberikan jaminan bahwa seluruh koleksinya tersimpan dengan baik dan aman sehingga dapat dimanfaatkan baik untuk keperluan sekarang maupun generasi yang akan datang. Balai Besar Penelitian Veteriner satu-satunya institusi penelitian bidang veteriner milik pemerintah yang memiliki koleksi berbagai jenis mikroba baik yang bersifat infeksius maupun non infeksius, dikelola oleh suatu unit koleksi yang disebut *Balitvet Culture Collection* (BCC). Koleksi tersebut dapat dimanfaatkan sebagai kandidat untuk produksi vaksin, probiotik, perangkat diagnostik penyakit ternak, acuan di laboratorium pengujian, penelitian lebih lanjut untuk pengembangan IPTEK dan lainnya.

Clostridium adalah genus dari mikroba bakteri Gram positif batang, termasuk dalam Phylum: Firmicutes, Class: Clostridia, Order: Clostridiales dan Family: Clostridiaceae. Bakteri tersebut bersifat obligat anaerob mampu menghasilkan endospora (RYAN, 2004). Mikroba *Clostridium* merupakan salah satu koleksi yang ada di BCC. Koleksi *Clostridium* tersebut sebanyak 117 koleksi dari 27 macam spesies. Koleksi yang berasal dari berbagai hewan di Indonesia sebanyak 80 koleksi dari 6 macam spesies yaitu *C. bifermentan*, *C. botulinum*, *C. defficile*, *C. novyi* tipe A dan C, *C. perfringens* tipe A, C dan D, dan *C. subterminale* (CHOTIAH *et al.*, 2005), sedangkan selebihnya berasal dari koleksi lain di luar negeri. Beberapa spesies yang bersifat patogen penting dan dapat menimbulkan penyakit pada manusia adalah *C.*

botulinum, *C. defficile*, *C. perfringens* dan *C. tetani* (WELLS, 1996). Koleksi tersebut disimpan pada suhu 5°C dalam keadaan bubuk kering setelah mengalami proses *freeze-drying* (kering beku) dengan medium preservan *Robertson's Cooked Meat Medium*.

Memelihara viabilitas (*viability*) atau daya hidup mikroba yang dikonservasi secara eksitu pada suatu koleksi biakan merupakan bagian penting didalam sistem pelestariannya. Suatu koleksi biakan mikroba harus memberikan jaminan bahwa koleksinya sudah tersedia dalam keadaan murni, viabilitas baik dan perubahan karakter seminimal mungkin apabila suatu saat koleksinya diperlukan. Oleh karena itu kontrol kualitas (viabilitas, kemurnian dan reidentifikasi) dari koleksi harus selalu dipantau secara rutin sesuai dengan karakter dari masing-masing koleksi itu sendiri, kemampuan fasilitas, penguasaan teknologi dan ketersediaan tenaga yang terampil dan tekun. Berbagai metode yang ada dalam konservasi mikroba akan tetapi setiap koleksi kultur menentukan sendiri cara mana yang paling tepat sehubungan dengan fasilitas yang ada dan dana yang tersedia (SNELL, 1991)

Tulisan ini bertujuan untuk mengevaluasi viabilitas plasma nutfah mikroba C dalam konservasi eksitu jangka lama di suatu koleksi kultur.

MATERI DAN METODA

Biakan mikroba

Sebanyak 376 sampel kultur di dalam kemasan ampul gelas dalam kondisi hampa udara yang berasal dari 115 koleksi *Clostridium* yang terdiri dari 27 macam spesies telah digunakan sebagai bahan penelitian. Biakan-biakan mikroba tersebut merupakan koleksi pada *Balitvet Culture Collection* (BCC) yang telah didisimpan pada suhu kamar tanpa pendingin, dengan masa penyimpanan bervariasi mulai dari 12 tahun sampai dengan 30 tahun. Proses *freeze drying* telah dilakukan di BCC 12 sampai dengan 19 tahun yang lalu. Tujuh koleksi *Clostridium* (nomor koleksi sama dengan koleksi diatas) dari 7 macam spesies telah dilakukan proses *freeze drying* 21 tahun sampai 30 tahun yang lalu di NCIB (*National Collection of Industrial Bacteria*, Torry Research Station, Aberden, Inggris).

Tabel 1. Keterangan biakan-biakan koleksi yang dipergunakan sebagai bahan penelitian

Spesies koleksi	Asal koleksi		Tempat proses <i>freeze-drying</i>	
	Indonesia	luar negeri	BCC	CC lain
<i>C. acetobutyricum</i>		√	√	
<i>C. beijerinckii</i>		√	√	
<i>C. bifermentans</i>	√	√	√	
<i>C. botulinum</i> tipe A, B, D, E, F dan G		√	√	√
<i>C. butyricum</i>		√	√	
<i>C. cadaveris</i>		√	√	
<i>C. carnis</i>		√	√	√
<i>C. chouvoei</i>		√	√	
<i>C. difficile</i>	√		√	
<i>C. fallax</i>		√	√	√
<i>C. ghoni</i>		√	√	
<i>C. histolyticum</i>		√	√	
<i>C. haemolyticum</i>		√	√	
<i>C. limosum</i>		√	√	√
<i>C. novyi</i> tipe A, B, C dan E	√	√	√	
<i>C. paraputrificum</i>		√	√	√
<i>C. paraperfringens</i>		√	√	
<i>C. perfingens</i> tipe A, B, C, D dan E	√	√	√	√
<i>C. plagarum</i>		√	√	
<i>C. ramosum</i>		√	√	
<i>C. rubrum</i>		√	√	
<i>C. septicum</i>	√	√	√	√
<i>C. sordeli</i>		√	√	
<i>C. sporogenes</i>		√	√	
<i>C. subterminale</i>	√	√	√	
<i>C. tetani</i>	√	√	√	√

CC = culture collection

Uji viabilitas

Masing-masing sampel ampul dicatat nomor koleksi dan tanggal proses *freeze-drying* /nomor batch yang ada pada ampul, lalu periksa kondisi fisik ampul dan dibersihkan bagian luarnya dengan alkohol 70%. Ampul dibuka, dilakukan secara aseptik mungkin dan hati-hati karena isi ampul hampa udara (dilakukan di dalam ruang biohazard). Bagian ampul yang terbuka didekatkan pada nyala api bunsen, kemudian media cair atau medium cair

selektif untuk masing-masing spesies Clostridium kira-kira 0,3 – 0,5 ml segera dimasukkan ke dalam ampul. Aduk dengan baik dan usahakan tidak terbentuk gelembung udara dalam ampul. Suspensi bakteri tersebut dikultur pada media *Clostridium novyi plating medium* (NPLM) atau lempeng agar darah dan *Robertson's Cooked Meat Medium* (RCM), koloni yang dicurigai diambil dan ditumbuhkan pada NPLM dan diinkubasi 37°C, 24 jam.

Reidentifikasi

Koloni biakan yang tumbuh murni, dilakukan pengamatan secara makroskopik terhadap bentuk koloni dan secara mikroskopik terhadap pewarnaan gram dan morfologi kumannya. Identifikasi sampai spesies dengan menggunakan uji biokimia (BARROW dan FELTHAM, 2003; CARTER, 1973; BATTY dan WALKER, 1965). Sedangkan penentuan tipe pada *Clostridium perfringens* menggunakan hewan percobaan mencit (LEVETT, 1991). Uji konfirmasi dalam penentuan tipe juga dilakukan dengan *Fluorescent antibody technique* (FAT) dan uji *plate hemolysin* untuk mendeteksi gamma dan beta *hemolysin* dari *Cl. novyi* tipe A, tipe B dan tipe D (MURRELL, 1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas isolat lokal *Clostridium spp.* koleksi BCC. setelah konservasi jangka lama pada suhu kamar tanpa pendingin dengan metode *freeze-drying* yang dilakukan di BCC dipaparkan di dalam Tabel 2. Setelah konservasi selama 17 tahun semua (100%) sampel koleksi *C. bifermentan*, *C. novyi* tipe A, *C. perfringens* tipe A, C dan D masih memiliki viabilitas, sebaliknya semua (100%) sampel koleksi *C. septicum* dan *C. tetani* 100% sudah tidak memiliki viabilitas lagi. Pada konservasi 19 tahun viabilitas *C. perfringens* tipe C menurun menjadi 81,9%.

Tabel 2. Viabilitas isolat lokal *Clostridium spp.* koleksi BCC setelah konservasi jangka panjang pada suhu kamar tanpa pendingin dengan metode *freeze drying* di BCC

Nama mikroba	Jumlah		% viabilitas pada penyimpanan tahun ke:					
	koleksi	ampul	13	14	15	16	17	19
<i>C. bifermentan</i>	1	2					100	
<i>C. difficile</i>	1	2		100				
<i>C. novyi</i> tipe A	1	2			100			
	15	60			100			
	3	12				100		
tipe C	1	4					100	
	1	2				100		
<i>C. perfringens</i> tipe A	4	10					100	
	1	3			100			
	1	3		100				
tipe C	3	10	100					
	6	22						81,9
	9	24					100	
	6	28				100		
tipe D	10	28			100			
	2	6		100				
	1	2	100					
tipe D	1	3				100		
	1	3					100	
<i>C. septicum</i>	1	3					0	
<i>C. subterminal</i>	2	3			100			
	2	4				100		
<i>C. tetani</i>	1	2					0	

Viabilitas *Clostridium spp.* koleksi BCC asal luar negeri setelah dikonservasi jangka lama pada suhu kamar tanpa pendingin dengan metode *freeze-drying* yang dilakukan di BCC dipaparkan di dalam Tabel 3. Setelah konservasi selama 12 tahun semua (100%)

Tabel 3. Viabilitas *Clostridium spp.* koleksi BCC asal luar negeri setelah konservasi jangka panjang pada suhu kamar tanpa pendingin dengan metode *freeze-drying* di BCC

Nama mikroba	Jumlah		% viabilitas pada penyimpanan tahun ke:						
	koleksi	ampul	12	13	14	15	16	17	19
<i>C. acetobutyricum</i>	1	2	100						
<i>C. beijerinckii</i>	1	2		100					
<i>C. bifermentans</i>	1	4		100					
<i>C. botulinum</i> tipe A	1	3			100				
	1	3						100	
tipe B	1	4						100	
tipe D	1	7					100		
tipe E	1	3						100	
tipe F	1	3						100	
<i>C. butyricum</i>	1	3					100		
<i>C. cadaveris</i>	1	4	100						
<i>C. carnis</i>	1	3	0						
<i>C. chouvoui</i>	1	3				100			
<i>C. fallax</i>	1	7		0					
<i>C. ghoni</i>	1	3		100					
<i>C. haemolyticum</i>	1	4	100						
<i>C. histolyticum</i>	1	3	100						
<i>C. limosum</i>	1	3		0					
<i>C. novyi</i> tipe A	1	5					100		
tipe B	1	4					100		
tipe D	1	1		100					
<i>C. paraperfringens</i>	1	2		100					
<i>C. parapatrificum</i>	1	3		0					
<i>C. perfringens</i> tp. A	1	3							66,7
tp. B	1	3							33,3
tp. C	2	6							66,7
tp. D	1	2					100		
		4						100	
tp. E	1	3							0
<i>C. plagarum</i>	1	2	100						
<i>C. ramosum</i>	1	4	75						
<i>C. rubrum</i>	1	3		100					
<i>C. septicum</i>	1	3						0	
<i>C. sordeli</i>	1	3		100					
<i>C. sporogenes</i>	1	2				100			
	1	2							100
<i>C. subterminal</i>	2	3				100			
	2	4					100		
<i>C. tertium</i>	1	4		100					
<i>C. tetani</i>	1	2							0

sampel koleksi *C. Acetobutyricum*, *C. cadaveris*, *C. haemolyticum*, *C. histolyticum* dan *C. plagarum* masih memiliki viabilitas, sedangkan *C. ramusum* hanya 75% dan *C. carnis* sudah 0%.

Setelah konservasi selama 13 tahun semua (100%) sampel koleksi *C. beijerinckii*, *C. bifermentans*, *C. ghoni*, *C. novyi* tipe D, *C. paraperfringens*, *C. rubrum*, *C. sordeli* dan *C. tertium* masih memiliki viabilitas, sebaliknya *C. fallax*, *C. limosum* dan *C. parapatrificum* sudah tidak memiliki viabilitas. Semua (100%) sampel *C. chouvoei* setelah konservasi selama 15 tahun masih memiliki viabilitas. Semua (100%) sampel *C. botulinum* tipe D, *C. butyricum*, *C. novyi* tipe A dan B, dan *C. subterminale* masih memiliki viabilitas setelah dikonservasi selama 16 tahun. Setelah konservasi selama 17 tahun semua (100%) sampel *C. botulinum* tipe A, B, E dan F, dan *C. perfringens* tipe D masih memiliki viabilitas setelah dikonservasi selama 17 tahun, sebaliknya *C. septicum* 100% sudah tidak memiliki viabilitas. Setelah konservasi selama 19 tahun 100% sampel *C. sporogenes* masih memiliki viabilitas, sedangkan *C. perfringens* tipe A, B dan C, C viabilitasnya sudah menurun menjadi 66,7%, 33,3% dan 66,7%, bahkan *C. perfringens* tipe E dan *C. tetani* 100% sudah tidak memiliki viabilitas.

Pemantauan viabilitas koleksi yang dikonservasi jangka waktu yang lama dengan menggunakan metode *freeze drying* idealnya dilakukan secara rutin mulai dari sebelum dan sesudah proses *freeze drying* satu tahun setelah penyimpanan dan dilanjutkan setiap 5 tahun

(RUDGE, 1991). Pada pengamatan ini terdapat 9 dari 115 koleksi berasal dari 8 spesies yang berbeda, viabilitasnya sudah 0% setelah konservasi jangka waktu 12 sampai 19 tahun. Ketersediaan/kemampuan sarana dan prasarana yang ada di suatu koleksi kultur itu sendiri sangat menentukan sistim pengelolaan koleksi. Hasil dari evaluasi ini bisa dipakai sebagai bahan pertimbangan untuk menentukan waktu untuk memantau viabilitas dari masing-masing koleksi Clostridium di BCC.

Sebagai pembandingan telah diperiksa 7 sampel dari 7 koleksi Clostridium berasal dari 7 macam spesies koleksi dari luar negeri setelah dikonservasi jangka lama pada suhu kamar tanpa pendingin di BCC dengan metode *freeze-drying* yang dilakukan di koleksi kultur di luar negeri (NCIB) hasilnya dipaparkan didalam Tabel 4. Koleksi *C. carnis* dengan metode *freeze drying* di BCC setelah dikonservasi selama 12 tahun sudah tidak memiliki viabilitas (Tabel 3), tetapi metode *freeze drying* di NCIB setelah dikonservasi selama 30 tahun masih memiliki viabilitas. Demikian pula *C. fallax*, *C. limosum* dan *C. parapatrificum* setelah dikonservasi selama 13 tahun dengan metode *freeze drying* di BCC sudah tidak memiliki viabilitas (Tabel 3), tetapi dengan metode *freeze drying* di NCIB setelah dikonservasi selama masing-masing berturut-turut 21, 30 dan 30 tahun masih memiliki viabilitas. *C. perfringens* tipe E dan *C. tetani* setelah dikonservasi selama 19 tahun dengan metode *freeze drying* di BCC sudah tidak memiliki viabilitas (Tabel 3), tetapi dengan metode *freeze drying* di NCIB yang

Tabel 4. Viabilitas *Clostridium spp* koleksi BCC asal luar negeri setelah konservasi jangka panjang pada suhu kamar tanpa pendingin dengan metode *freeze-drying* di NCIB

Nama mikroba	Jumlah		Viabilitas pada penyimpanan tahun ke:		
	koleki	ampul	21	25	30
<i>C. carnis</i>	1	1			tumbuh
<i>C. fallax</i>	1	1	Tumbuh		
<i>C. limosum</i>	1	1			tumbuh
<i>C. parapatrificum</i>	1	1			tumbuh
<i>C. perfringens</i> tipe E	1	1			tumbuh
<i>C. septicum</i>	1	1		tumbuh	
<i>C. tetani</i>	1	1			tumbuh

NCIB: National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, Aberden, Inggris

menggunakan medium preservan *mist. desiccans*, setelah dikonservasi selama 30 tahun masih memiliki viabilitas. *C. septicum* setelah dikonservasi selama 17 tahun dengan metode *freeze drying* di BCC sudah tidak memiliki viabilitas (Tabel 3), tetapi dengan metode *freeze drying* di NCIB setelah dikonservasi selama 25 tahun masih memiliki viabilitas.

Banyak faktor yang menyebabkan perbedaan viabilitas pada konservasi *Clostridium* dengan metode *freeze drying*, diantaranya medium suspensi yang digunakan dan suhu penyimpanan koleksi. Seperti yang dilakukan di BCC medium preservan yang di pakai adalah RCM berbeda dengan yang digunakan di NCIB. Menurut STAAB dan ELLI (1987) pemeliharaan mikroorganisme anaerob dengan 12% sukrosa dalam medium *chopped meat carbohydrate* tahan hidup lebih lama dan viabilitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan medium *double strength skim milk*. Sebagian besar spesies dari koleksi *Clostridium* yang ada di *National Collection of Type Cultures*, Inggris masih memiliki viabilitas setelah dikonservasi selama 35 tahun dengan metode *Freeze drying*, walaupun pertumbuhannya sudah tidak dapat dihitung secara logaritma (RUDGE, 1991). Sedangkan menurut pendapat IMPEY dan PHILLIPS (1991) bakteri anaerob yang disimpan pada suhu 2 sampai 10°C dalam keadaan gelap setelah proses *freeze drying* masih memiliki viabilitas tinggi sampai 10 tahun, walaupun setelah 22 tahun biakan masih tetap hidup.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa konservasi eks situ plasma nutfah *Clostridium spp.* lebih dari 10 tahun menggunakan metode *freeze drying* dengan medium *Robertson's cooked meat* dan penyimpanan pada suhu kamar memiliki viabilitas yang bervariasi dari masing-masing spesies. Sembilan dari 115 koleksi yang berasal dari 7 spesies *Clostridium* sudah tidak memiliki kemampuan tumbuh setelah dikonservasi selama 12 sampai dengan 19 tahun. Tujuh dari 9 koleksi tersebut dalam konservasi eks situ menggunakan metode

freeze drying dengan medium preservan *mist. desiccans* masih bisa tumbuh setelah penyimpanan selama 21 sampai dengan 30 tahun. Semakin lama *Clostridium spp.* tahan hidup dalam konservasi eks situ akan semakin efisien didalam pengelolaannya. Disarankan konservasi eks situ *Clostridium spp.* dengan metode *freezedrying* menggunakan medium preservan *mist. desiccans*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Safarudin teknisi Bakteriologi BBalitvet yang telah membantu dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BARROW, G.I. and R.K.A. FELTHAM. 2003. Cowan and Steel'S Manual for Identification of Medical Bacteria. 3rd Ed. Cambridge University Press. pp. 83 – 86.
- BATTY, I. and P.D. WALKER. 1965. Colonial morfology and fluorescent labelled antibody stains in the identifikation of species of The Genus *Clostridia*. *J. Applied Bacteriol.* 28: 112.
- CARTER, G.R. 1973. Diagnostic Procedure In Veterinary Microbiology. 2nd Ed. Charles C. Thomas Publish, Springfield, Illinois, USA. pp. 125 – 137.
- CHOTIAH, S. 2005. Daftar Koleksi Biakan Mikroba Balitvet Culture Collection. Edisi Tahun 2005. pp. 15 – 26.
- IMPEY, C.S. and B.A. PHILLIPS. 1991. Maintenance of anaerobic bacteria. *In: Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. Second Edition.* Academic Press. Harcourt Brace Javanovich Publishers. London San Diego, New York Boston. Sydney Tokyo Toronto. pp. 72 – 80.
- LEVETT, P.N. 1991. Anaerobic Microbiology, A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press.
- MURRELL, W.G. 1989. *Clostridium Perfringens*. *In: Foodborne Microorganisms Of Public Health Significance.* 4th Ed. BUCKLE, K.A. (Ed.). AIFST Food Microbiology Group.

- RUDGE, H.R. 1991. Maintenance of bacteria by freeze-drying. *In: Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. Second Edition. Academic Press. Harcourt Brace Javanovich Publishers. London San Diego, New York Boston. Sydney Tokyo Toronto.* pp. 31 – 44.
- RYAN, K.J. 2004. Ray GG Editor. Sherris Medical Microbiology. 4th Ed. Mc Graw Hill.
- SLUIS, V.D.W. 2000. Necrotic Enteritis (1) Clostridial Enteritis- A Syndrome Emerging Worldwide. *World Poult.* 16(5): 56 – 57.
- SNELL, J.J.S. 1991. General Introduction to Maintenance Methode. *In: Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. Second Edition. Academic Press. Harcourt Brace Javanovich Publishers. London San Diego, New York Boston. Sydney Tokyo Toronto.* pp. 22 – 30.
- STAAB, J.A. and J.K. ELI. 1987. Viability of Lyophilized Anaerobes in Two Media. *Cryobiology.* 24(2): 174 – 178.
- WELLS, C.L. and T.D. WILLKIN. 1996. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. *In: Baron`S Medical Mycrobiology. 4th Ed. BARON, S. et al. (Eds.). Univ. of Texas Medical Branch.*

DISKUSI

Pertanyaan:

1. *Clostridium* apa menguntungkan atau merugikan?
2. Pada kesimpulan vabilitas bervariasi pada media preservasi, faktor-faktor lain yang mempengaruhi?

Jawaban:

1. Menguntungkan dan ada yang merugikan.
2. Faktor yang mempengaruhi diantaranya suhu.