

Preservasi bakteri *Corynebacterium striatum* menggunakan silika gel

Preservation of *Corynebacterium striatum* bacteria using silica gel

FITRIANA

Puslitbang Sumber Daya dan Pelayanan Kesehatan, Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI.
Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta Pusat 10560, Jakarta. ✉email: fitri.litbang@gmail.com.

Manuskrip diterima: 27 September 2018. Revisi disetujui: 15 Desember 2018.

Abstrak. Fitriana. 2019. *Preservasi bakteri Corynebacterium striatum menggunakan silika gel. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 5: 134-138.* *Corynebacterium striatum* merupakan bakteri flora normal pada kulit yang tidak bersifat fastidious. Umumnya semua Coryne relatif tahan terhadap kekeringan dan perubahan suhu. Medium transport yang umumnya digunakan pada bakteri Coryne adalah medium semisolid Amies. Pada kondisi dimana medium transport tidak ditemukan maka silika gel dapat menjadi alternatif, selain menjadi preservasi bakteri, karena mudah didapat dan ekonomis. Penelitian ini bertujuan untuk melihat viabilitas bakteri yang menggunakan silika gel untuk preservasi. Bakteri yang diuji dimasukkan kedalam kantong aluminium foil yang sebelumnya telah diisi silika gel dengan menggunakan swab. Aluminium foil ditutup rapat dan disimpan pada suhu -20°C. viabilitas bakteri di evaluasi pada hari pertama, kedua, ke-4, ke-8, ke-16, ke-32, dan ke-64. Hasil penelitian terlihat viabilitas bakteri masih terdapat pada hari ke 32. Kesimpulannya adalah silika gel masih dapat digunakan sebagai preservasi dan medium transport pada penyimpanan suhu -20°C sampai hari ke-32.

Kata kunci: *Corynebacterium striatum*, medium transport, preservasi, silika gel

Abstract. Fitriana. 2019. *Preservation of Corynebacterium striatum bacteria using silica gel. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 5: 134-138.* *Corynebacterium striatum* is a normal flora bacteria on the skin that is not fastidious. Generally, all Coryne are relatively resistant to drought and temperature changes. The transport medium commonly used in Corynebacteria is the Amies semisolid medium. In conditions where the transport medium is not found, silica gel can be an alternative, besides being a preservation of bacteria, because it is easy to obtain and economical. This study aims to see the viability of bacteria using silica gel for preservation. The bacteria tested included into aluminum foil bags previously filled with silica gel with using swab. Aluminum foil is tightly closed and stored at -20°C. Bacteria viability was evaluated on the first, second, fourth, 8th, 16th, 32th, and 64th days. The results showed that bacterial viability was still present on the 32nd day. The conclusion is that silica gel still be used as a preservation dan transport medium at storage temperature of -20°C until the 32nd day.

Keywords: *Corynebacterium striatum*, transport medium, preservation, silica gel

PENDAHULUAN

Corynebacterium striatum merupakan bakteri dari genus corynebacterium yang menjadi patogen oportunistik, bersifat non toksigenik, dan sebagai biota normal kulit manusia. bakteri ini tidak bersifat *fastidious*, relatif tahan terhadap kekeringan dan perubahan temperatur. Setelah pengambilan spesimen biasanya bakteri akan dimasukkan ke dalam medium transport sebelum di bawa ke laboratorium untuk pemeriksaan. Antisipasi jika inokulasi baru dilakukan dalam waktu lebih dari 24 jam, maka dapat digunakan silika gel. Bungkus silika gel lebih baik disimpan pada suhu 4°C dari pada suhu ruangan (Kim-Farley 1987; Mattos-Guaraldi et al. 2003; Roush et al. 2012; Murray et al. 2013; Burkovski 2014).

Jenis medium transport yang digunakan dan waktu yang diperlukan dari saat pengambilan sampai pemeriksaan laboratorium akan sangat menentukan dalam *recovery* bakteri (Versalovic et al. 2011; Jones et al. 2015). Penggunaan silika gel sebagai suatu metode penyimpanan

alternatif dan transportasi isolat pernah dilakukan oleh Sunarno dan Sariadji (2017) dengan tujuan penelitian menggambarkan perbedaan pengaruh suhu (2-8°C atau suhu ruang), teknik silika gel yang digunakan (tanpa bungkus atau dengan bungkus) dan jenis tempat penyimpanan (tabung plastik atau aluminium foil) terhadap viabilitas

Penyimpanan pada suhu 2-8°C viabilitas bakteri lebih baik dibandingkan suhu ruang. Teknik silika tanpa bungkus berpengaruh terhadap viabilitas bakteri yang lebih baik, serta penyimpanan dengan menggunakan aluminium foil didapatkan viabilitas bakteri masih ditemukan pada hari ke 64. Untuk perbandingan penggunaan silika gel dengan medium transpor Amies pada suhu 2-8°C viabilitas silika gel lebih baik, koloni masih dapat tumbuh pada hari ke 64, sedangkan pada kondisi suhu ruang viabilitas silika gel juga lebih baik yaitu pada hari ke 16 (Sunarno dan Sariadji 2017).

Dari hasil penelitian tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa silika gel berpotensi untuk dikembangkan sebagai

media transportasi sampel klinis pemeriksaan difteri (Sunarno dan Sariadji). Untuk penelitian ini tujuannya adalah mendapatkan informasi bagaimana bila genus *Corynebacterium* di simpan pada suhu -20°C dengan menggunakan kantong aluminium dan silika gel terbuka dari beberapa literatur didapatkan bahwa semakin rendah suhu maka resiko berkurangnya viabilitas semakin kecil. Penggunaan silika ini bila memang mempunyai hasil yang baik dapat menjadi preservasi dan medium transport bakteri terutama genus *Corynebacterium*, karena selain mudah didapatkan, harganya juga lebih ekonomis.

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian adalah eksperimen laboratorium dengan menggunakan strain referensi *Corynebacterium striatum*. Terlebih dahulu bakteri strain referensi ditumbuhkan pada *blood agar* (BA), setelah tumbuh kemudian dibuat suspensi dengan konsentrasi 3 McFarland (9×10^8 CFU/mL). Suspensi bakteri tersebut dibagi kedalam 14 tabung, dan dibuat 7 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 2 tabung.

Empat bungkus silika gel yang akan dimasukkan ke dalam satu kantong aluminium foil terlebih dahulu disobek, kemudian isinya dimasukkan ke dalam kantong aluminium foil yang sudah dilipat menyerupai kantong. Perlakuan yang sama dilakukan pada ke 11 kantong yang lain, dan kemudian 14 kantong tersebut dibuat 7 kelompok dengan masing-masing kelompok 2 kantong (Sunarno dan Sariadji).



Gambar 1. Lipatan kantong aluminium foil (Sunarno dan Sariadji)

Spesimen diambil dengan menggunakan swab dacron yang dimasukkan ke dalam tabung suspensi McFarland, satu swab untuk 1 tabung dan 1 kantong aluminium foil. Swab dacron tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong aluminium foil dan batang swab dibiarkan (tidak dipatahkan), kemudian tutup atas aluminium sampai rapat dengan menggunakan selotip.

Simpan 7 kelompok aluminium foil tersebut pada suhu -20°C , kemudian lakukan evaluasi viabilitas bakteri pada : hari pertama (24 jam), hari kedua (48 jam), hari ke-4, hari ke-8, hari ke-16, hari ke-32, hari ke-64. Kelompok pertama diambil di hari pertama untuk dinilai viabilitasnya, dan seterusnya sampai hari ke-64.

1 kelompok yang terdiri dari 2 bungkus aluminium pertama dan kedua, pada hari yang telah ditentukan di kultur masing-masing pada medium BA. Sebelumnya swab isolat tersimpan tersebut dikeluarkan dari aluminium foil untuk proses rehidrasi dengan NaCl fisiologis 0,85%. Setelah proses kultur, kedua medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan koloni bakteri pada medium.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri yang dikultur pada medium BA mempunyai gambaran koloni berwarna putih mengkilat. Hasil pertumbuhan koloni pada medium BA setelah inkubasi, yang berasal dari isolat bakteri yang disimpan pada suhu -20°C dengan lama hari yang berbeda-beda dapat dilihat pada Tabel 1. Dari tabel terlihat bahwa viabilitas bakteri masih ditemukan pada lama hari penyimpanan ke 32 di suhu -20°C .

Pembahasan

Preservasi merupakan suatu usaha untuk menyimpan mikroorganisme agar tetap viabel. Secara umum tujuan utama preservasi adalah mereduksi atau mengurangi laju metabolisme mikroorganisme sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitasnya (daya hidup), dan memelihara biakan sebaik mungkin agar pemulihan (*recovery*) dan kemampuan bertahan hidup (*survival*) tetap tinggi dengan perubahan yang seminimal mungkin. Semakin rendah suhu penyimpanan (dalam *freezer* suhu -20°C dan -70°C) maka semakin kecil peluang kehilangan viabilitasnya (Machmud 2001; Christy 2012; Najmiyati dan Akhadi 2012; Wang et al. 2014).

Tabel 1. Pertumbuhan koloni dengan metode penyimpanan pada suhu -20°C

<i>C.striatum</i>	Lama penyimpanan (Hari=H)						
	1 H	2 H	4 H	8 H	16 H	32 H	64 H
Pertumbuhan koloni	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-

Keterangan : +1 = Pertumbuhan koloni 1-5, +2 = Pertumbuhan koloni 6-10, +3 = Pertumbuhan koloni 11-20, +4 = Pertumbuhan koloni >20

Viabilitas merupakan kemampuan suatu isolat untuk tumbuh kembali, dengan kata lain memperpanjang umur mikroorganisme dengan viabilitas yang tetap terpelihara. Dari hasil penelitian bahwa penyimpanan pada suhu -20°C memberikan hasil *recovery* lebih baik. Karena penyimpanan dengan suhu demikian memperlambat laju reaksi biokimia yang dapat merugikan mikroorganisme selama disimpan. Secara umum penyimpanan pada suhu di bawah titik beku air (0°C) akan mengakibatkan terbentuknya es di luar dan di dalam sel, hal ini dapat membuat rusaknya dinding sel mikroba dan keluarnya cairan intra sel akibat peningkatan konsentrasi garam dalam larutan (Najmiyati dan Akhadi 2012; Mutlu 2015a).

Untuk mencegah itu maka penting diberikan senyawa yang bersifat antibeku (*cryoprotectant*) seperti gliserol, yang bekerja menurunkan titik beku suspensi sehingga pembentukan kristal es di dalam sel mikroba dapat diminalisir. Gliserol juga bekerja melindungi jaringan intraseluler dengan cara menembus membran sel dan memodifikasi pembentukan kristal es melalui pencegahan peningkatan konsentrasi elektrolit di dalam sel tersebut. Selain itu, gliserol juga mencegah pengumpulan molekul H_2O dan kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (Najmiyati dan Akhadi 2012).

Gliserol merupakan senyawa anti beku yang umum digunakan untuk tujuan penyimpanan stok sel seperti mikroba. Senyawa ini memiliki kelebihan antara lain mudah diperoleh dan harganya cukup murah. Namun gliserol juga mempunyai efek merugikan yaitu dapat bersifat toksik bagi sel mikroba. Untuk menekan efek merugikan dari gliserol terhadap sel, pada umumnya pemakaian gliserol sebagai agen krioprotektan kurang dari 10%. Namun dari hasil suatu penelitian didapatkan bahwa penggunaan gliserol hingga 50% masih memberikan tingkat viabilitas sel mikroba yang baik (Najmiyati dan Akhadi 2012; Mutlu 2015b; Perullini et al. 2015).

Corynebacterium striatum merupakan patogen oportunistik dari genus *corynebacterium*, salah satu spesies dari genus ini dapat sebabkan penyakit difteri. *Corynebacterium striatum* bersifat non toksigenik dan merupakan bagian dari biota normal kulit manusia. Dinding sel *Corynebacterium* mengandung *meso - diaminopimelic acid* (m - DAP) dan *short - chain mycolic acid* dengan 22 sampai 36 atom karbon. *Palmitic, oleic* dan *stearic acid* merupakan asam lemak sel yang utama pada semua *Corynebacterium*. Semua taxa yang relevan secara medik dalam genus *Corynebacterium* bersifat katalase positif dan nonmotil. Dan mempunyai spesies yang bersifat fermentasi dan nonfermentasi. Pada pewarnaan gram didapatkan batang gram positif, tersusun berpasangan, berbentuk seperti palu dengan pembesaran pada salah satu atau kedua ujungnya (Isenberg 2007; Guifoile 2009; Murray et al. 2013; Fitriana dan Novriani 2014; Burkovski 2014).

Sebagian besar bakteri coryne tidak memerlukan penanganan khusus saat pengambilan spesimen. Setelah spesimen diambil maka dapat dimasukkan ke dalam medium transport sebelum akhirnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan (Isenberg 2007; Murray et al. 2013).

Umumnya media transport yang digunakan adalah medium *Amies*, medium ini berguna untuk menjamin kelangsungan hidup bakteri selama belum dilakukan pemeriksaan laboratorium. Bakteri coryne tidak bersifat *fastidious*, relatif tahan terhadap kekeringan dan perubahan temperatur. Antisipasi jika inokulasi baru dapat dilakukan dalam waktu lebih dari 24 jam, maka dapat digunakan silika gel. Hal ini bisa terjadi pada daerah endemis yang memiliki keterbatasan dalam sarana prasarana, karena silika gel relatif lebih murah dan mudah didapatkan (Isenberg 2007; Murray et al. 2013).

Silika gel mempunyai kemampuan menyerap air dalam jumlah besar, dan mempertahankan kelembaban, dengan evaporasi panas laten yang tinggi; hingga 40% dari massa keringnya (Versalovic 2011; Najmiyati dan Akhadi 2012). Silika gel dihasilkan dari *silicic acid*. Selama proses produksi, permukaan silika gel yang terdiri dari *soloxane groups* berubah bentuk menjadi *hydroxyl groups*, sebagian tidak terikat/ bebas yang disebut *free hydroxyl groups* sedangkan sebagian terpolarisasi dan ada yang membentuk ikatan dengan hydrogen sehingga molekul air teradsorpsi pada permukaan silika gel. Hal tersebut menyebabkan silika gel tidak boleh dipanaskan sampai suhu di atas 120°C , dan secara umum masih dapat diregenerasi pada suhu di bawah 90°C (Bonyadi 2014; Ghilen et al. 2017; Sunarno dan Sariadji 2017).

Suatu penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa silika gel dapat digunakan untuk penyimpanan jangka pendek isolat *S. pneumoniae* dan beberapa spesies relevan secara klinis lainnya, tapi inokulasi maksimal dan kondisi penyimpanan belum jelas diketahui. Dari hasil penelitian didapatkan pada suhu kamar dapat bertahan selama 14 hari, sedangkan pada suhu 4°C dapat bertahan selama 28 hari. Silika gel sebagai metode transportasi kultur bakteri murni yang murah dan sederhana (Pell 2013).

Silica gel pertama kali digunakan selama Perang Dunia Pertama dalam masker gas tetapi aplikasi silika gel yang paling penting saat ini adalah sebagai *desiccant* (Bonyadi 2014). Penyerapan air oleh silika gel dipengaruhi beberapa faktor diantaranya tipe dari *silanol groups*, area permukaan, dan ukuran pori-pori. Bila silika gel ditempatkan pada tempat penyimpanan bakteri maka akan terjadi penyerapan air di lingkungan dan sel bakteri, hal ini sebagai salah satu teknik pengeringan (*drying*) (Sunarno dan Sariadji 2017).

Proses pengeringan pada bakteri dapat menyebabkan turunnya integritas membran dan keluarnya cairan sehingga terjadi dehidrasi yang dapat menginduksi kerusakan DNA, RNA, protein, membran sitoplasma dan dinding sel. Selain itu juga dapat meningkatkan konsentrasi asam dan komponen toksik pada sel, serta reaksi oksidasi, hal ini semua dapat menyebabkan proses oksidasi menjadi terhenti, juga dapat menyebabkan cedera dan kematian sel (Sunarno dan Sariadji 2017).

Dari hasil penelitian terlihat bahwa viabilitas pada hari pertama, kedua sampai hari ke 32 mempunyai jumlah koloni yang sama yaitu +1 dengan koloni sekitar 1 sampai dengan 5. Hal ini menimbulkan pertanyaan mengapa hasil yang didapat tidak sesuai dengan literatur yang mengatakan bahwa semakin rendah suhu maka resiko kehilangan

viabilitas semakin kecil. Bila tingkat kehilangan viabilitas kecil, seharusnya pertumbuhan jumlah koloni bisa lebih banyak. Selain itu dengan semakin rendahnya suhu maka proses metabolisme bakteri akan terhenti atau berkurang. Dengan berkurangnya hasil metabolisme bakteri maka toksik yang dihasilkan dari hasil metabolisme tersebut yang dilepas ke lingkungan sekitar bakteri juga tidak banyak. Toksik hasil metabolisme ini dapat merusak/ membunuh bakteri yang berada disekitarnya.

Kekurangan eksperimen laboratorium ini mungkin bisa terletak pada proses thawing yang kurang tepat. Kemungkinan lain yang mungkin menjadi penyebab adalah tidak diberikannya *cryoprotectant* (gliserol) dalam proses preservasi. Diketahui bahwa suhu yang rendah di bawah titik beku air (0°C) dapat menyebabkan terbentuknya es di dalam dan di luar sel, hal ini dapat merusak dinding sel bakteri dan juga menyebabkan keluarnya cairan intrasel yang terjadi akibat peningkatan konsentrasi garam dalam larutan.

Pemberian silika gel yang dimasukan dengan merobek bungkus silika mungkin juga dapat menjadi salah satu faktor penghambat. Diketahui silika gel bersifat menyerap air dalam jumlah besar untuk mempertahankan kelembaban udara, bila bungkus silika gel dilepas dan keberadaan silika berdekatan dengan bakteri dapat menyebabkan penyerapan cairan bakteri dalam jumlah besar sehingga terjadi proses dehidrasi/pengeringan bakteri. Proses ini dapat menyebabkan kerusakan inti sel dan dinding sel bakteri sehingga dapat memicu terjadinya kematian sel. Jadi kematian sel selain dari proses dehidrasi bakteri akibat dari silika gel juga dapat terjadi akibat suhu di bawah titik nol yang merusak dinding sel.

Kesalahan yang mungkin terjadi dalam eksperimen laboratorium ini seharusnya bakteri yang disimpan dalam kantong aluminium tidak menggunakan silika yang terbuka tapi mungkin sebaiknya tertutup. Selain itu penyimpanan pada suhu di bawah titik nol dalam hal ini -20°C sebaiknya menggunakan *cryoprotectant* untuk melindungi jaringan intraseluler dan meminimalkan terbentuknya es di dalam/ di luar sel akibat proses dari suhu di bawah titik nol. Penurunan suhu akan menyebabkan terjadinya perubahan konsentrasi larutan dan pH yang dapat mempengaruhi metabolisme bakteri.

Membran sel yang sebagian besar disusun oleh asam lemak tidak jenuh akan bersifat lebih elastis dan memiliki permeabilitas yang baik terhadap air. *Corynebacteria* sebagian besar diinding selnya disusun oleh asam lemak. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi ketahanan sel selama proses pembekuan salah satunya adalah permeabilitas membran sel, pemberian *cryoprotectant*, metode pembekuan dan penyimpanan, serta metode thawing (Nurani 2002).

Kesimpulan dan saran

Pemakaian silika gel sebagai preservasi dan medium transport bakteri masih dapat digunakan dengan viabilitas yang masih ditemukan samapai hari ke-32. Sebaiknya untuk preservasi ditambahkan *cryoprotectant* untuk melindungi sel dari kerusakan akibat pengaruh suhu di bawah titik nol, dan bungkus silika gel tidak dilepas. Untuk

itu diperlukan penelitian lebih lanjut sehingga silika gel dapat digunakan sebagai preservasi dan medium transport yang memberikan hasil lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Ade Nahdia Nandarini dan Sunarno atas bantuan dan masukannya dalam penelitian dan penulisan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonyadi N. 2014. Theoretical and Experimental Investigation on Characteristics of Adsorption Cooling Systems Using Advanced Porous Materials. [Thesis]. Middle East Technical University, Ankara.
- Burkovski A. 2014. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Genomics, Pathogenicity and Applications. Springer, New York.
- Christy AA. 2012. Effect of heat on the adsorption properties of silica gel. IACSIT Intl J Eng Technol 4 (4): 484-488.
- Fitriana, Novriani H. 2014. Penatalaksanaan Difteri. J Indon Med Assoc 64 (12): 541-545.
- Ghilen N, Messai S, Gabisi S, et al. 2017. Performance Simulation of Two-Bed Silica Gel-Water Adsorption Chillers. Global Journal of Researches in Engineering: J General Eng 17 (3):-.
- Guilfoile P. 2009. Deadly Diseases and Epidemics. Chelsea House, UK.
- Isenberg HD. 2007. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Vol 1. ASM Press, Washington DC.
- Jones SL, Madhusudhan KT, Agans K, Dearen K, Knight J, Brasel T, et al. 2015. Performance evaluation of two microbial transport media designed for preservation and transport of Chlamidiae, Mycoplasma and Ureaplasma. J Med Microbiol 64: 382-389.
- Kim-Farley RJ, Soewarso TI, Rejeki S, Soeharto, Karyadi A, Nurhayati S, et al. 1987. Silica gel as transport medium for *Corynebacterium diphtheriae* under tropical conditions (Indonesia). J Clin Microbiol. 25 (5): 964-965.
- Machmud M. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. Buletin AgroBio 4 (1): 24-32.
- Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV and Júnior RH. 2003. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – An Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 98 (8): 987-993.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2013. Medical Microbiology. 7th ed. Elsevier, Philadelphia.
- Mutlu BR, Hirschey K, Wackett LP, Aksan A. 2015a. Long-term preservation of silica gel-encapsulated bacterial biocatalysts by desiccation. J Sol-Gel Sci Technol 74 (3): 823-833.
- Mutlu BR, Yeom S, Wackett LP, Aksan A. 2015b. Modelling and optimization of bioremediation system utilizing silica gel encapsulated whole-cell biocatalyst. Chemical Eng J 259: 574-580.
- Najmiyati E, Akhadi DH. 2012. Viabilitas dan kinerja konsorsium mikroba pendegradasi hidrokarbon setelah penyimpanan dalam pendingin dan penyimpanan beku. Ecolab 6 (2): 61-104.
- Nurani D. 2002. Kajian Proses Pembekuan dan Daya Simpan Kultur Bakteri Laktat Asal Dadih untuk Produksi Kultur Starter. [Tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pell CL, Williams MJ, Dunne EM, Porter BD, Satzke C. 2013. Silica desiccant packets for storage and transport of *Streptococcus pneumoniae* and other clinical relevant species. PLOS ONE. 8 (8): e72353. DOI: 10.1371/journal.pone.0072353.
- Perullini M, Calcabrini M, Jobbagy M, Bilmes SA. 2015. Alginate/porous silica matrices for the encapsulation of living organisms: tunable properties for biosensors, modular bioreactors, and bioremediation devices. Mesoporous Biomater 2: 3-12.
- Roush SW, Beall B, Cassidy P, Gentsch J, Icenogle J, Mayer L, Oberste SM, Payne DC, Rota P, Schmid S, Shaw M, Tondella ML, Wasley A. 2012. Laboratory support for the surveillance of vaccine-preventable diseases. In: VPD Surveillance Manual, 5th. CDC Atlanta. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt23-natl-surv-vpd.html>. [27 Februari 2015].

- Sunarno, Sariadji K. 2017. Teknik Penyimpanan dan Prospek Transportasi Isolat *Corynebacterium diptheria* Menggunakan Silica Gel. Jurnal Biotek Medisiana Indonesia 6 (2): 143-151.
- Versalovic A, Carroll KC, Jorgensen JH, et al. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Volume 1. ASM Press, Washington, DC.
- Wang D, Zhang J, Yang Q, Li N, Sumathy K. 2014. Study of adsorption characteristic in silica gel-water adsorption refrigeration. Appl Energ 113: 734-741.