



www.esaunggul.ac.id

TEKNOLOGI FERMENTASI

IBP 611

By Seprianto S.Pi, M.Si



Pertemuan 5

Isolasi, Seleksi dan Pemeliharaan Mikroba

Tujuan Perkuliahan

- Mahasiswa mampu menjelaskan tahapan pekerjaan dalam teknologi fermentasi (Isolasi, seleksi, pemeliharaan penyimpanan mikroba)
- Mahasiswa mampu melkakukan teknik isolasi mikroba dengan baik
- Dapat menjelaskan cara-cara mendapatkan mikroba potensial yang akan digunakan dalam proses fermentasi
- Dapat menjelaskan cara-cara pemeliharaan kultur mikroba
- Serta Teknik penyimpanan mikroba dengan baik

Isolasi, Seleksi dan Pemeliharaan Mikroba



Kunci keberhasilan suatu fermentasi/ kultivasi

- Merupakan galur murni
- Sifat genetiknya stabil
- Mampu tumbuh dengan cepat setelah diinokulasi
- Mampu menghasilkan produk yang diinginkan dalam waktu yang pendek
- Tidak menghasilkan produk sampingan yang toksik
- Mampu melindungi diri /bertahan thd. pengaruh lingkungan /kontaminan (pH, suhu, inhibitor)
- Dapat disimpan dalam jangka waktu yang panjang
- Galur dapat dikembangkan kualitasnya (mutasi, rekayasa genetika), sehingga produksinya meningkat

Sumber Mikroba

- Sumber alami (tanah, air, tanaman/hewan, limbah dll) atau lembaga koleksi kultur (ATCC)
- Jumlah dan jenis mikroba sangat beragam
- Seleksi mikroba (Sifat morfologi & fisiologi seragam).
- Seleksi sehingga diperoleh galur dengan kinerja terbaik
- Identifikasi (Manual Book/ Molekuler 16S rRNA)
- Mikroba yang telah diperoleh harus disimpan dengan teknik penyimpanan waktu yang panjang.

TAHAPAN IDENTIFIKASI MIKROBA

ISOLASI

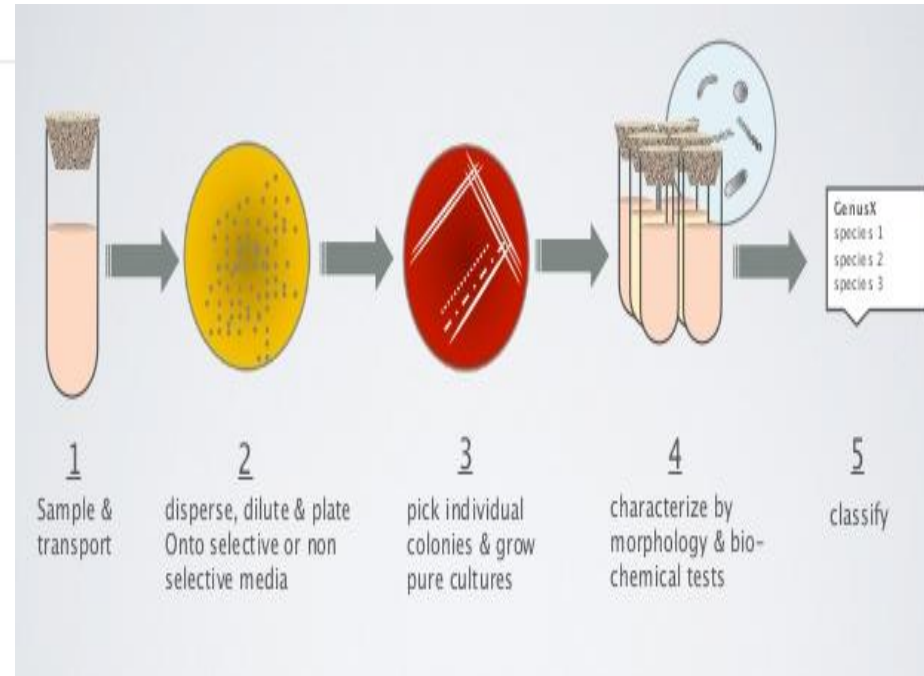
- Untuk memperoleh kultur murni

SELEKSI

- Untuk memperoleh galur dengan kinerja terbaik

IDENTIFIKASI

- Dengan menggunakan metode yang sesuai
- Untuk mengetahui nama (klasifikasi) mikroba tersebut



ISOLASI

- Isolasi kultur : kegiatan pemisahan suatu kultur mikroba dari campuran biakan mikroba di alam → sel individu terpisah
- Sebelum mengisolasi, harus diketahui :
 - mikroba apa yang akan diisolasi
 - habitat
- menentukan sampel apa yang akan diambil dari alam , lokasi dan media apa yang akan digunakan

METODE PENGAMBILAN SAMPEL

Sampel berupa padatan (tanah, serpihan batu, kayu, dll) :

- Diambil dengan menggunakan spatula atau pinset steril
- Penyimpanan menggunakan kantong plastik steril

Sampel berupa cairan atau semi cair (air, lumpur, dll) :

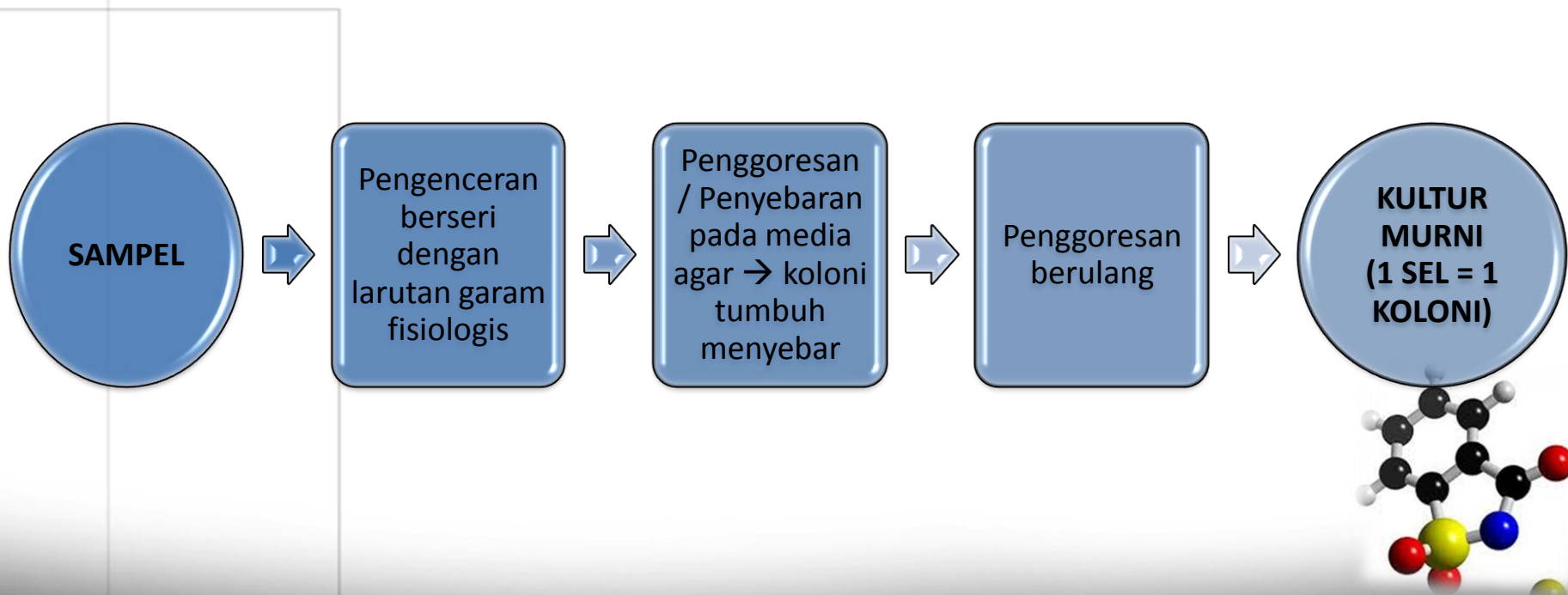
- Diambil menggunakan pipet steril
- Penyimpanan contoh menggunakan botol atau tabung polipropilen steril

Sampel segera dibawa ke laboratorium
(bila jarak jauh, gunakan es batu pada wadah penyimpanan)

TEKNIK ISOLASI KULTUR MURNI

1. Penggoresan (*Streak-plate*) & Penyebaran (*Spread-plate*)
2. Penuangan (*Pour-plate*)
3. Kultur yang diperkaya (*Enrichment Culture*)
4. Pengenceran Berseri (*Serial-dilution*)
5. Isolasi Sel Tunggal

1. Teknik Penggoresan (*Streak-plate*) & Penyebaran (*Spread-plate*)

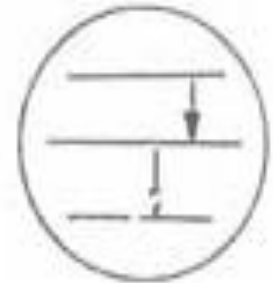
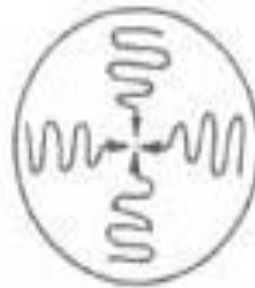


Cara Penggoresan Kultur

Goresan langsung
(untuk mengkultur mikroba)

Goresan radian (untuk
mengkultur mikroba)

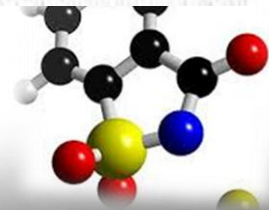
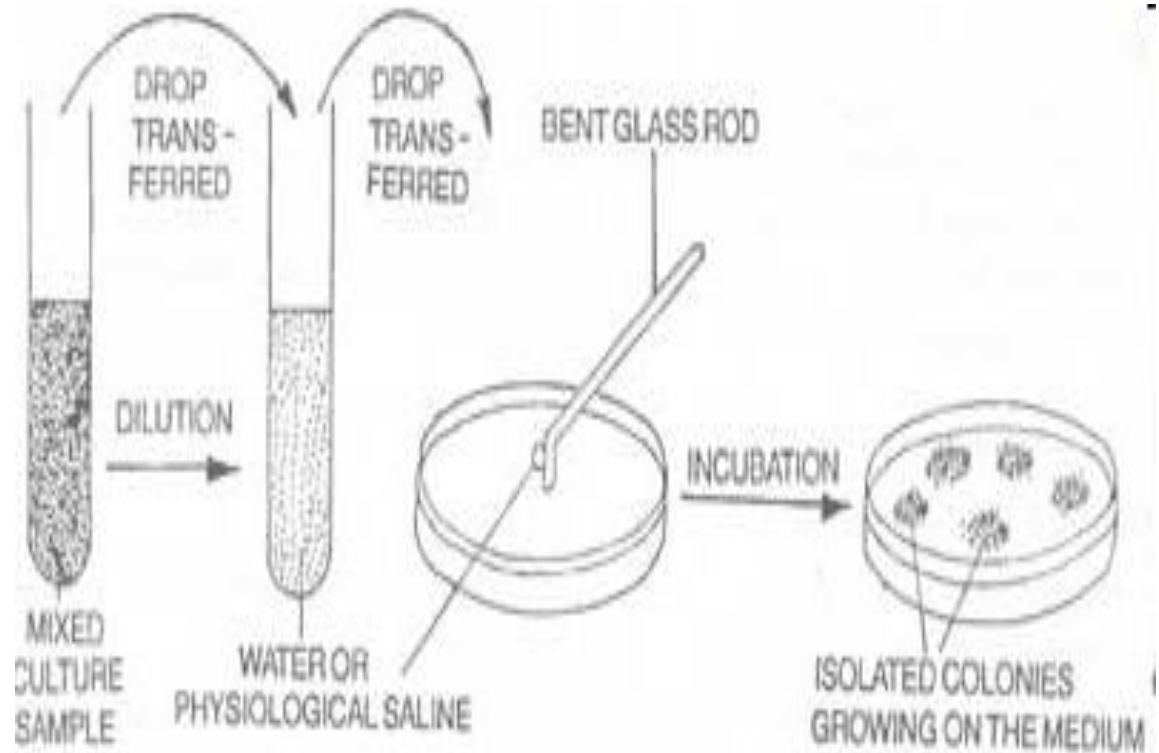
1. Goresan Langsung
2. Goresan Kuadran
3. Goresan Radian



Goresan kuadran (isolasi koloni tunggal untuk mempelajari mikroba)

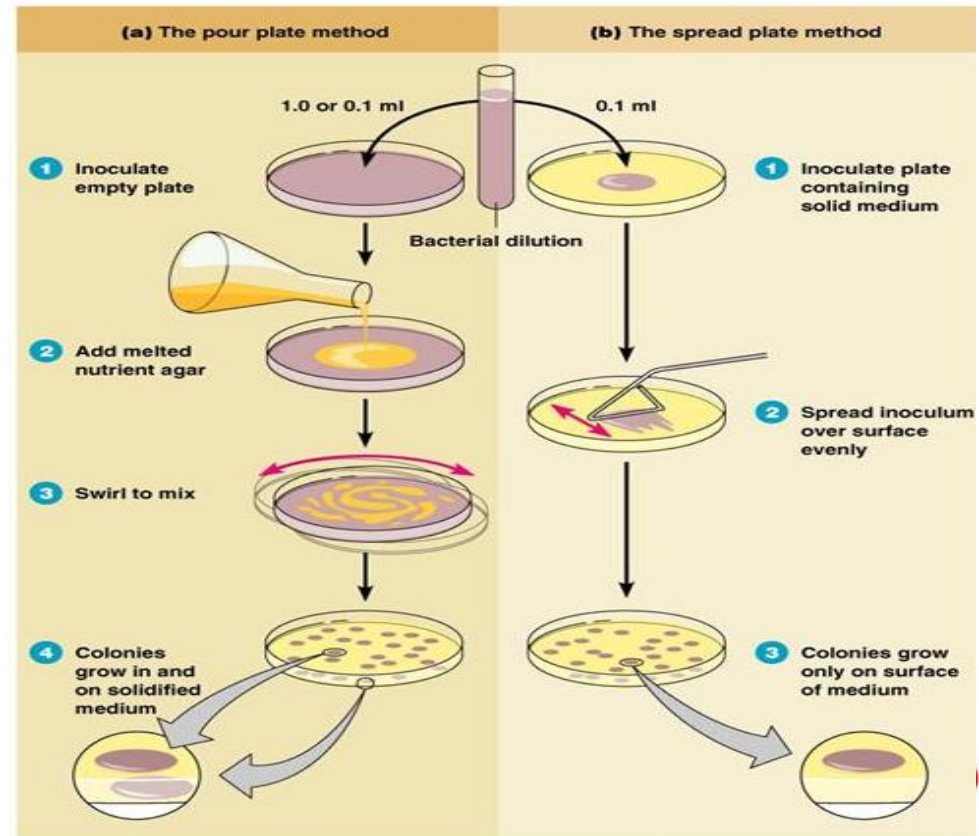
Teknik Penyebaran (*Spread-plate*)

- Teknik ini merupakan prosedur rutin untuk isolasi bakteri & menggunakan peralatan yang sederhana
- Kelemahan : hanya sejumlah kecil sampel yang dapat digunakan/disebarkan pada media
- Dua sel dapat bergabung membentuk satu koloni



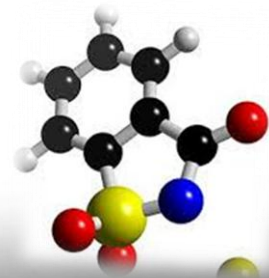
2. Teknik Penuangan (*Pour-plate*)

- Prinsip : pengenceran sampel dengan media agar cair dalam tabung reaksi, sehingga distribusi sampel merata → dituang ke cawan petri & dibiarkan mengeras pada suhu ruang, lalu diinokulasi



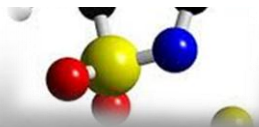
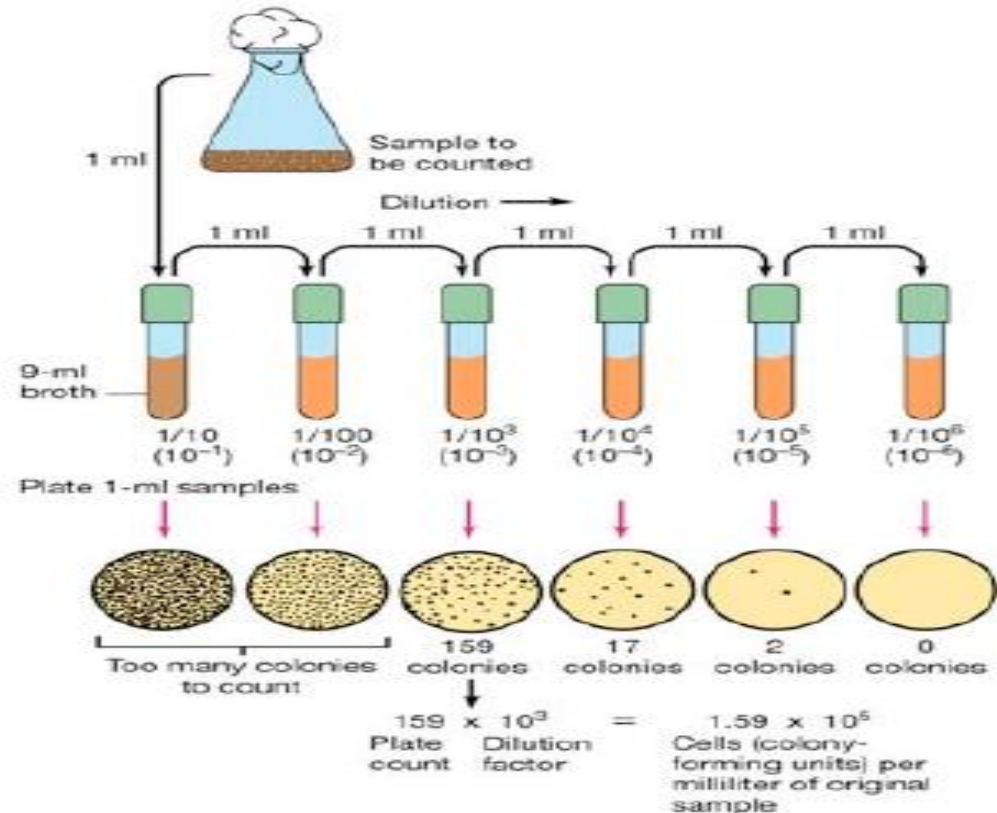
3. Kultur Diperkaya (*Enrichment Culture*)

- Untuk mengisolasi bakteri yang mempunyai sifat fisiologis yang khusus (jumlah kecil & tumbuh lambat)
- Prinsip : menggunakan komposisi media dan kondisi inkubasi tertentu, sehingga yang tumbuh hanya bakteri tertentu



4. Teknik Pengenceran Berseri (Serial-dilution)

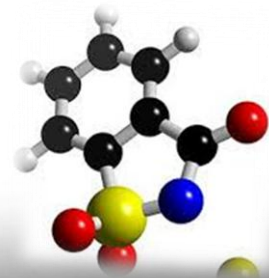
- Digunakan jika mikroba dlm kultur campuran terdapat dalam jumlah lebih besar dari pada mikroba lain.
Contoh : *S. lactis* dalam susu asam
- Dengan tingkat pengenceran tinggi, sampel hanya mengandung 1 galur mikroba
- Perlu dicek kemurnian kultur

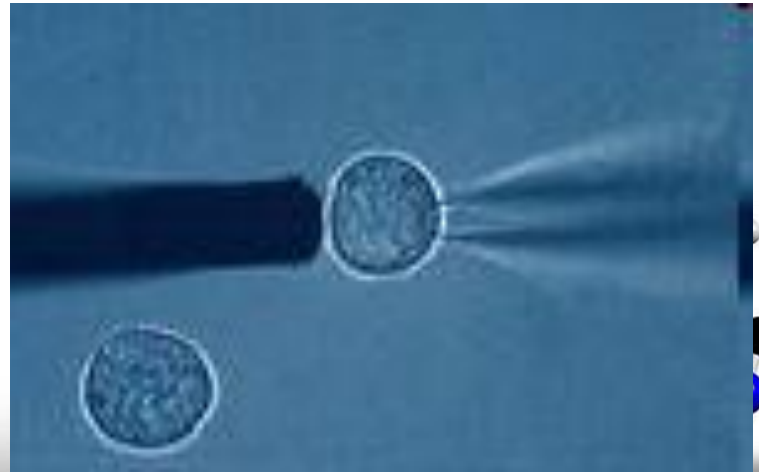
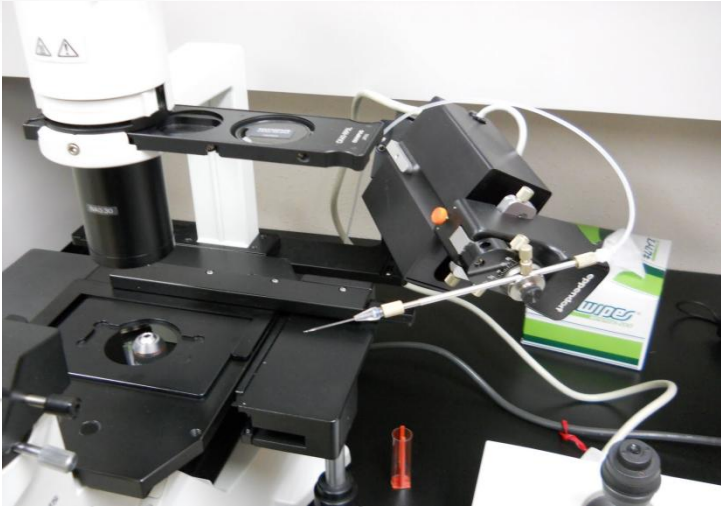


5. Teknik Isolasi Sel Tunggal

a. Metode Mikromanipulator

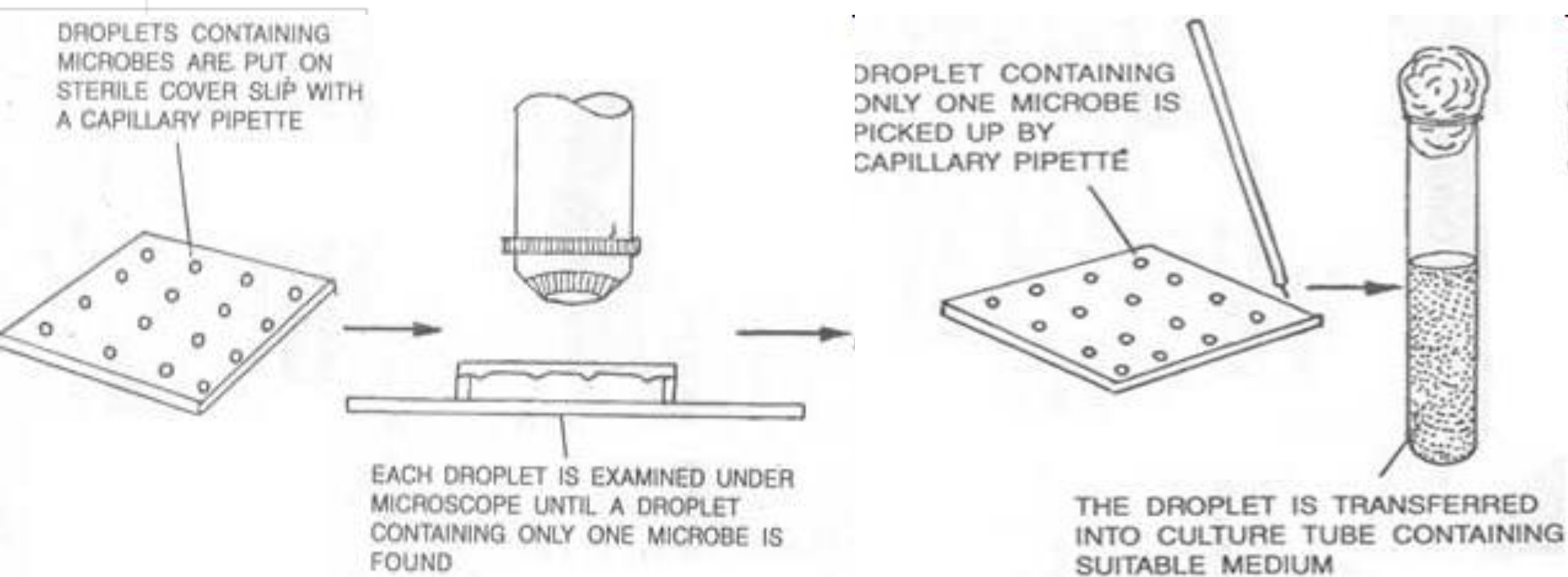
- Menggunakan alat mikromanipulator yang digabung dengan mikroskop untuk mengambil suatu sel mikroba tunggal dari sampel
- Dengan mikromanipulator, operator dapat mengontrol gerakan mikropipet (tabung kapiler) di bawah lensa obyek, sehingga dapat diambil sel tunggal & dipindahkan ke dalam tabung dan selanjutnya dipindahkan ke media yang sesuai
- Lebih cepat, namun kelemahannya :
 - alat mahal
 - operator harus terampil





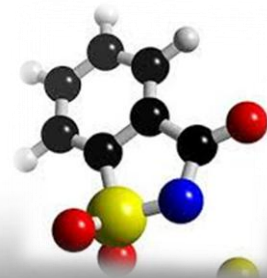
B. Metode Kapiler

- Beberapa tetes media yang mengandung mikroba, ditempatkan pada penutup gelas obyek steril menggunakan pipet kapiler steril.
- Dengan menggunakan mikroskop, cari tetesan yang mengandung hanya 1 mikroba. Tetesan tersebut dipindahkan dengan pipet kapiler steril ke media segar → mikroba tunggal yang berada pada tetesan mulai berbiak untuk menghasilkan kultur murni.



PEMBUKTIAN KEMURNIAN KULTUR

1. Mikroba tampak mirip secara mikroskopis dan menunjukkan hasil pewarnaan yang sama
2. Pada saat ditanam pada agar cawan, semua koloni menunjukkan kesamaan
3. Hasil penggoresan dll seragam
4. Beberapa koloni isolat mempunyai penampakan/karakteristik identik, contoh memfermentasi gula yang sama dll



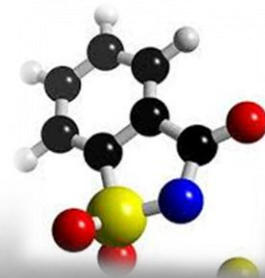
SELEKSI

Tujuan :

- mendapatkan galur dengan kinerja terbaik
- tidak menghasilkan produk sampingan yang tidak dikehendaki
- peningkatan kemampuan penggunaan sumber C dan N yang murah
→ penurunan biaya produksi
- perubahan morfologi sel menjadi bentuk yang
- lebih mudah dipisahkan dari produk

Pendekatan genetika untuk memperbaiki kualitas mikroba :

1. Mutasi
2. Rekombinasi



IDENTIFIKASI

Metode untuk identifikasi mikroba adalah dengan menggunakan ciri/karakteristik :

1. Morfologis

Pengamatan ukuran, bentuk dan susunan sel, adanya flagela, kapsul atau spora dengan bantuan mikroskop, baik dengan pewarnaan maupun tidak

2. Nutrisional

Penentuan senyawa kimia dan kondisi fisik khusus (suhu, cahaya, gas) yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba

3. Kultural

Penentuan tampilan pertumbuhan pada berbagai macam media, baik cair maupun padat (bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, warna, dll)



IDENTIFIKASI

4. Metabolik

Identifikasi & pengukuran perubahan kimiawi yang dilakukan mikroba → contoh kemampuan mikroba untuk mengubah karbohidrat menjadi asam organik; gula menjadi asam dan gas, dll)

Contoh : *E. coli* dapat memfermentasi laktosa, sedangkan *Salmonella typhi* tidak dapat memfermentasi laktosa

5. Susunan Kimiawi

Penentuan susunan kimiawi berbagai komponen sel

6. Susunan Antigen (Serologi)

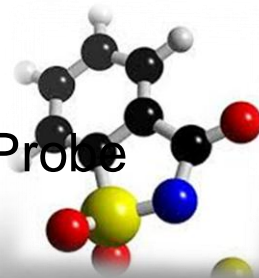
Penelaahan sifat antigen – antibodi yang khas

7. Patogenik

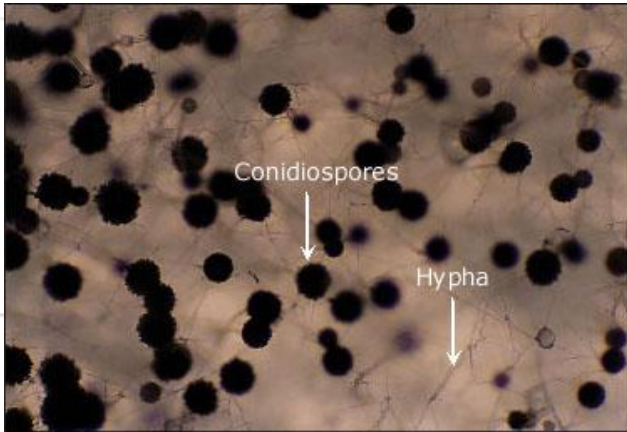
Penentuan potensi suatu mikroba untuk menimbulkan penyakit

8. Genetik

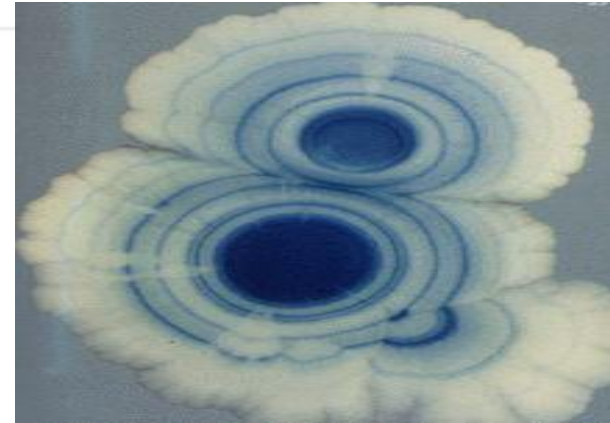
Kajian berdasarkan untaian DNA mikroba menggunakan DNA Probe



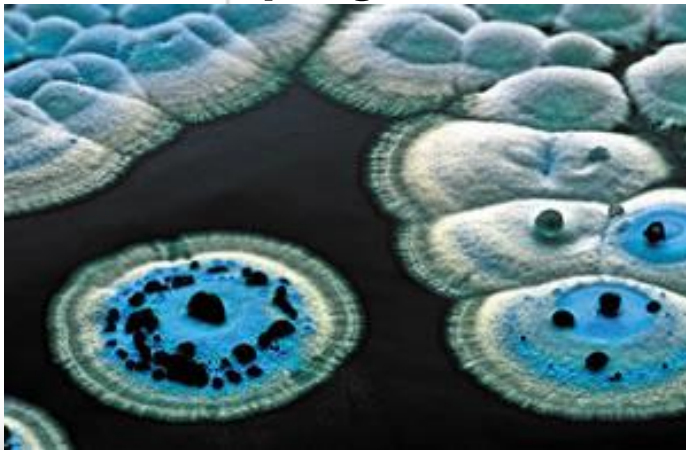
Karakteristik Morfologis Mikroba



Aspergillus



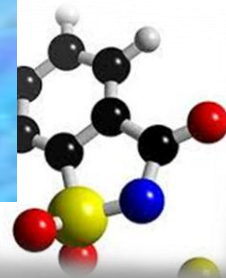
E. coli



Streptomyces



Penicillium



PEMELIHARAAN DAN PENGAWETAN KULTUR MURNI

Tujuan :

menjaga sampai periode tertentu mikroba tetap dalam kondisi hidup (*viable*), mencegah terjadinya perubahan genetik & tidak terkontaminasi
→ harus mampu melestarikan karakteristik spesies mikroba selama diawetkan

Cara :

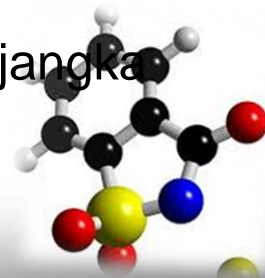
1. Pemindahan Secara Periodik

- Kultur mikroba secara periodik dipindahkan ke media baru/segar, contoh : media agar miring

- Komposisi media & suhu serta interval waktu pemindahan harus tepat dan disimpan pada suhu dingin (5°C)

→ murah & mudah, tapi tidak cocok untuk penyimpanan jangka panjang

→ bakteri 2-3 minggu, fungi 3-4 minggu



PEMELIHARAAN DAN PENGAWETAN KULTUR MURNI

2. Pelapisan Kultur dgn Minyak Mineral

- Permukaan agar miring atau media cair dilapisi dengan minyak

 - mineral steril (parafin) +/- 0,5 inci

- Keuntungan : dapat memindahkan sebagian mikroba di bawah permukaan

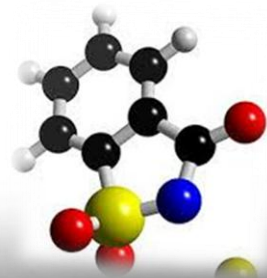
 - minyak mineral dg jarum Ose, lalu diinokulasi ke media segar dengan tetap

 - mempertahankan kultur awal

- Lapisan parafin menjadikan kondisi anaerob dan mencegah pengeringan

 - medium

mikroba dorman → pengawetan dapat beberapa tahun



PEMELIHARAAN DAN PENGAWETAN KULTUR MURNI

3. Liofilisasi → Pengeringan Beku (*freeze drying*)

- Sel mikroba dikering-bekukan & aktivitas metabolisme stop (dorman)

Cara :

- * media berisi senyawa pelindung/penstabil : susu, serum, natrium glutamat, dll
- * suspensi mikroba ($\pm 0,2$ ml) ditempatkan dalam ampul (vial) kaca
- * Perendaman dalam es kering + alkohol (-78°C) → beku
- * Ampul dihubungkan dengan kondensor & pompa vakum → kering (sublimasi)
- * Ampul ditutup dengan melelehkan ampul kaca tersebut dalam keadaan vakum → penyimpanan pada suhu 4°C
- Keuntungan : Cocok untuk penyimpanan jangka panjang (tahunan) & kemungkinan perubahan kecil & Wadah penyimpanan kecil



PEMELIHARAAN DAN PENGAWETAN KULTUR MURNI

4. Penyimpanan pada Suhu Sangat Rendah (Cryopreservation)

- Menggunakan nitrogen cair (sekitar -156 sampai -196°C)
- Sel dibekukan dengan diberi bahan pelindung beku (gliserol atau dimetil sulfoksida) → mencegah pembentukan kristal es & meningkatkan ketahanan hidup sel mikroba
- Contoh beku disimpan dalam lemari pendingin nitrogen cair
- Cocok untuk kapang
- Kelebihan :

hampir sama dgn liofilisasi & kultur yg tidak dapat diawetkan dengan liofilisasi, dapat dengan cara ini



PEMELIHARAAN DAN PENGAWETAN KULTUR MURNI

5. Penyimpanan pada Tanah Steril

- Diterapkan untuk penyimpanan spora bakteri, actinomycetes dan kapang
- Suspensi 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 g bubuk tanah steril (campuran pasir halus dan tanah liat 1:1)
- Dibiarkan pada suhu kamar selama 10 hari sampai kering → disimpan pada lemari es



PEMELIHARAAN DAN PENGAWETAN KULTUR MURNI

6. Penyimpanan dalam Akuades Steril

- Terutama yang berbentuk batang dan bereaksi Gram negatif seperti *Pseudomonas* dapat disimpan cukup lama dalam akuades steril pada suhu ruang atau suhu 10-15 °C.
- Berpeluang tumbuh dengan lambat, sehingga tidak dapat dijamin stabilitas genetiknya untuk jangka panjang
- Akuades steril disiapkan dalam botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml, 5-10 ml/botol atau dalam tabung ependorf

