

ISOLASI, SKRINING, DAN PENGAWETAN KULTUR MIKROBA INDUSTRI

Dr. Tita Rialita, S.Si., M.Si.

Koleksi kultur murni

Culture collection	Supplier
National Collection of Type Cultures (NCTC)	PHLS Central Public Health Laboratory, UK
National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIB, NCMB)	NCIB, NCMB, UK
National Collection of Yeast Cultures (NCYC)	AFRC Institute of Food Research, Norwich Laboratory, UK
Collection of International Mycological Institute (IMI)	Culture Collection and Industrial Service Division, UK
American Type Culture Collection (ATCC)	ATCC, USA
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	DSMZ, Germany
Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)	CBS, Netherlands
Czechoslovak Collection of Microorganisms (CCM)	Masaryk University, Czech Republic
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)	Institut Pasteur, France
Japan Collection of Microorganisms (JCM)	Riken, Japan
Culture Collection of the Institute for Fermentation (IFO)	Institute for Fermentation, Japan

Isolasi, Pengayaan dan Skrining Mikroorganisme

Isolasi

- Memperoleh kultur murni mikroba atau campuran → isolat
- Kriteria penting pemilihan mikroba industri :
 - Karakteristik nutrisi dari mikroorganisme
 - Suhu optimum mikroorganisme
 - Stabilitas mikroba dan kemudahan untuk manipulasi genetik
 - Produktivitas mikroba
 - Kemudahan untuk memperoleh produk dari kultur

Metode Isolasi Kultur Murni

- *Streak plate method*
- *Pour plate method*
- *Spread plate method*
- *Micromanipulator method*
- *Roll tube method*

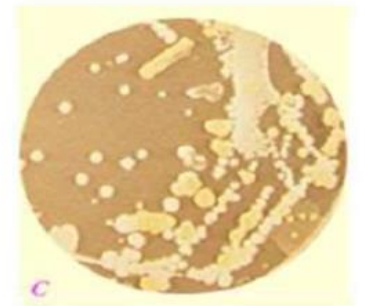
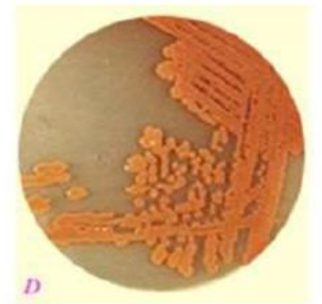
Pure vs mixed culture

❖ Pure: originate from 1
bacteria strain

❖ All colonies look the same

❖ Mixed: originate from
many bacteria strains

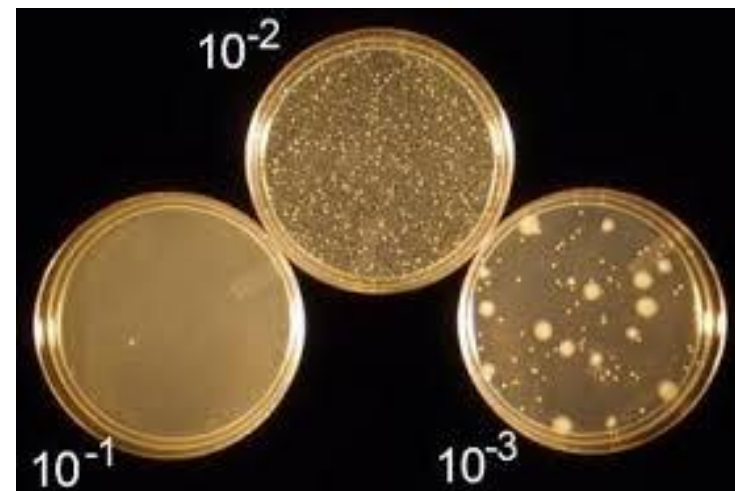
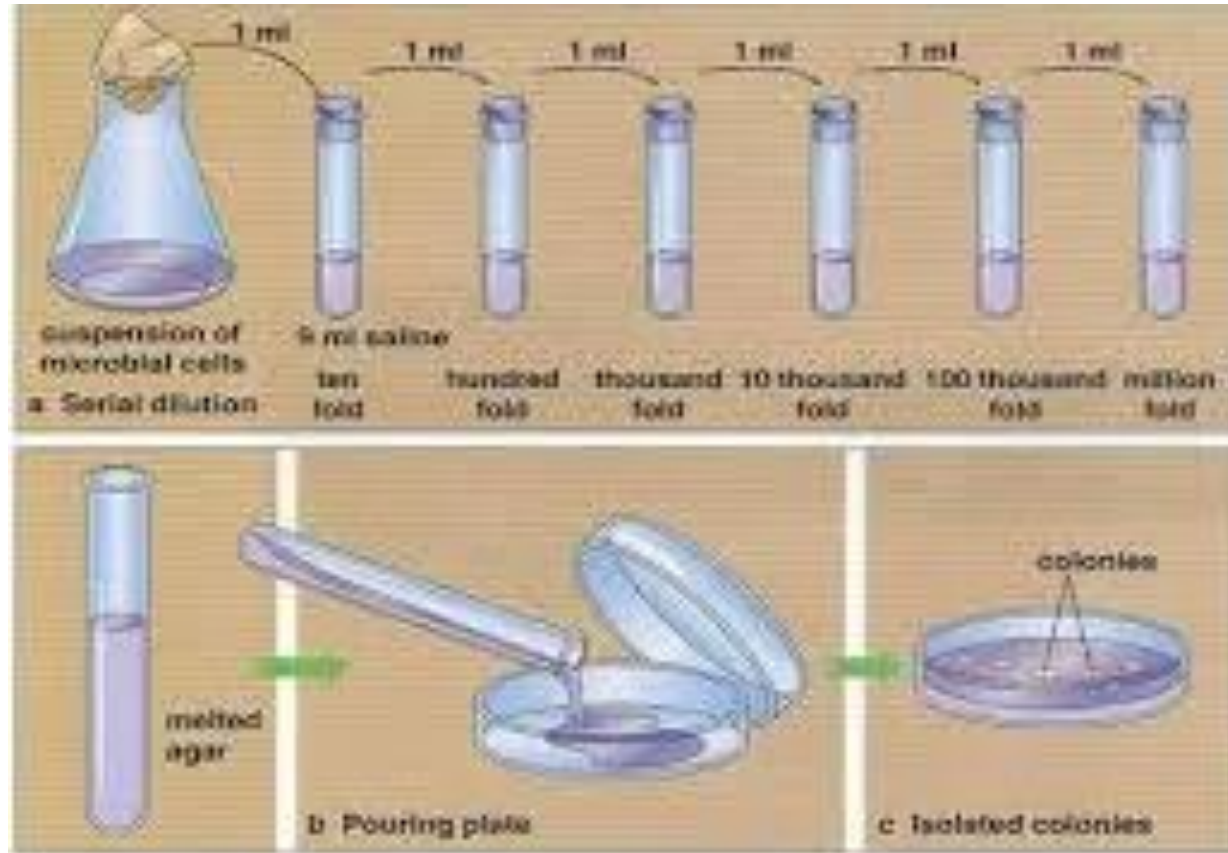
❖ Colonies have different
size/shape



Streak Plate Method



Pour Plate Method



Spread plate technique

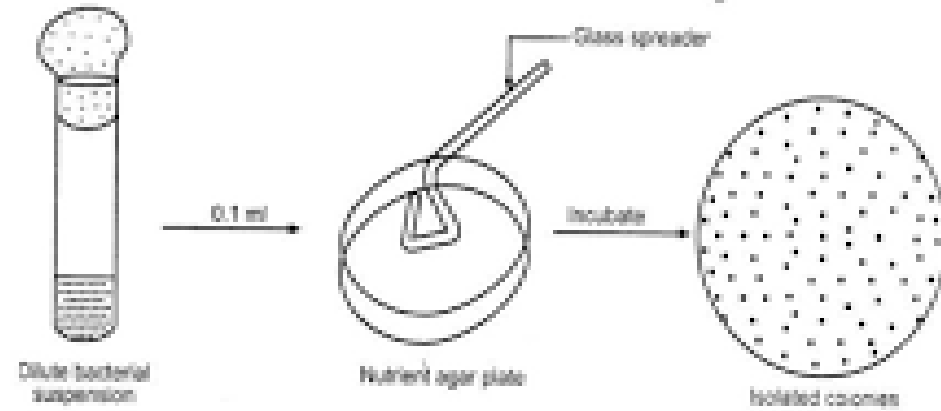


Fig. 4.3 | Spread plate technique

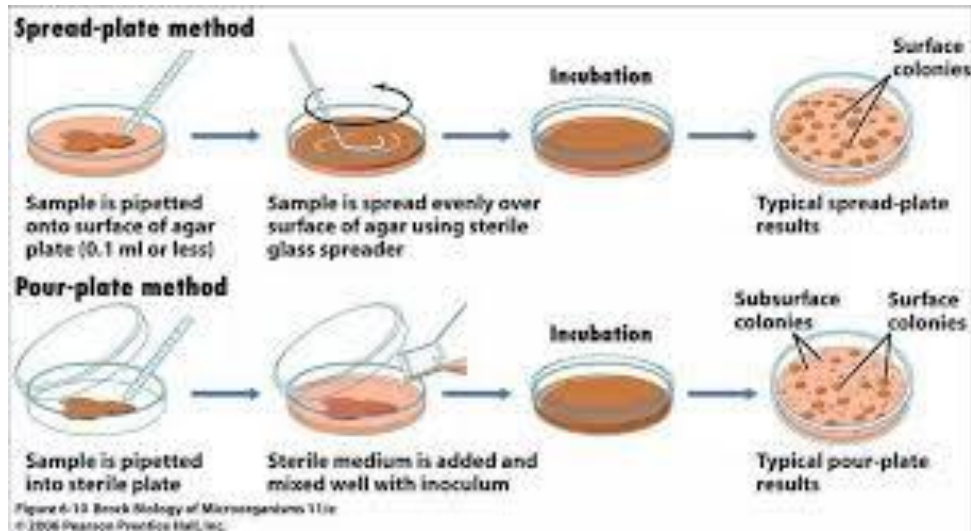
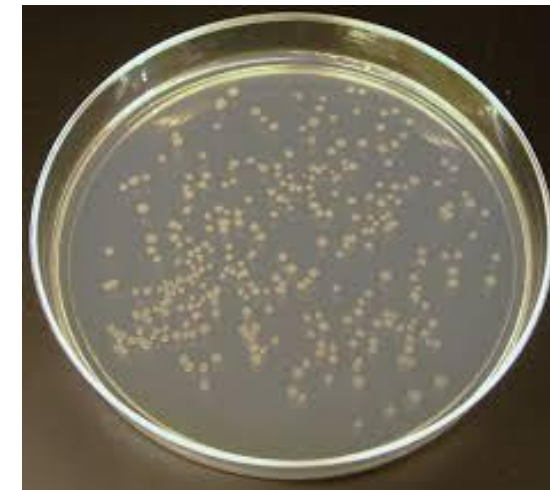
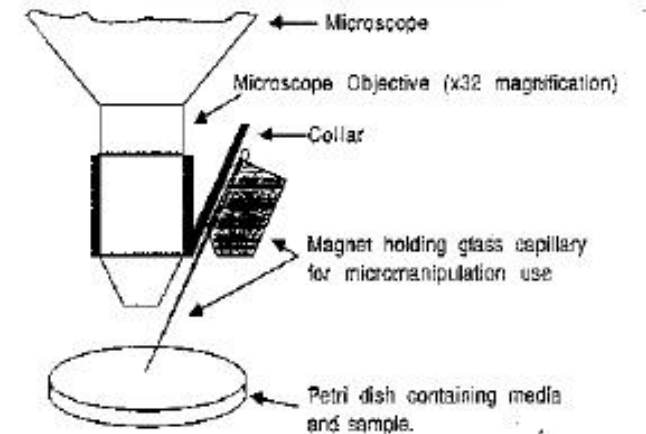
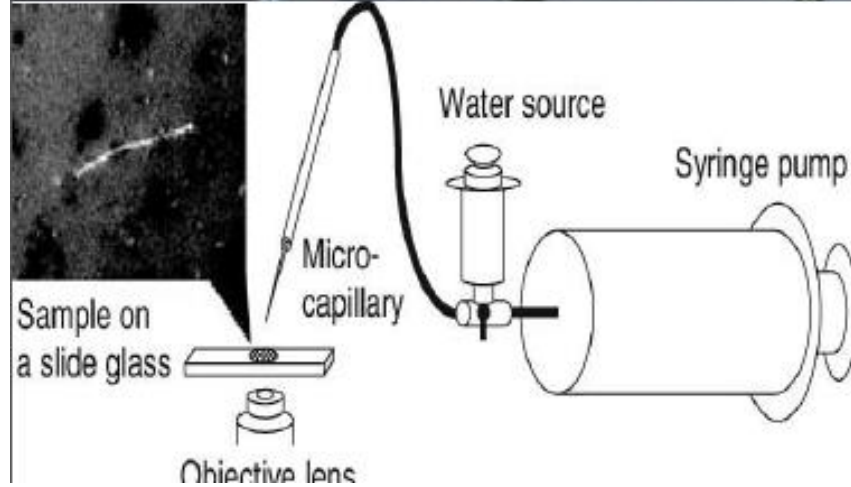
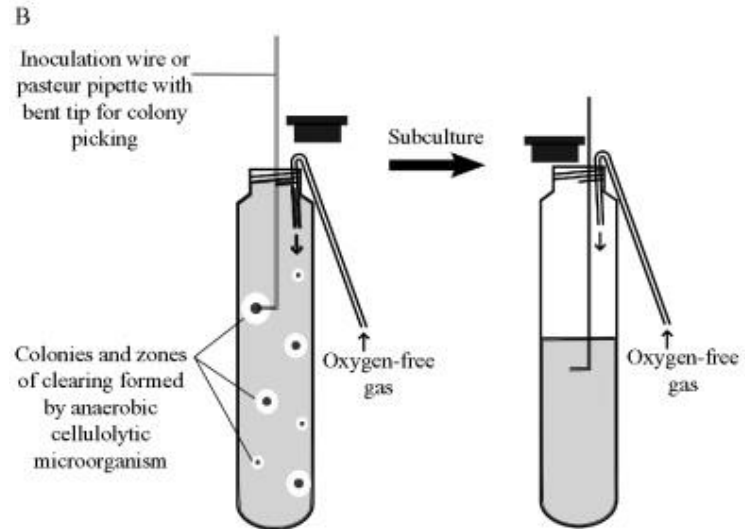
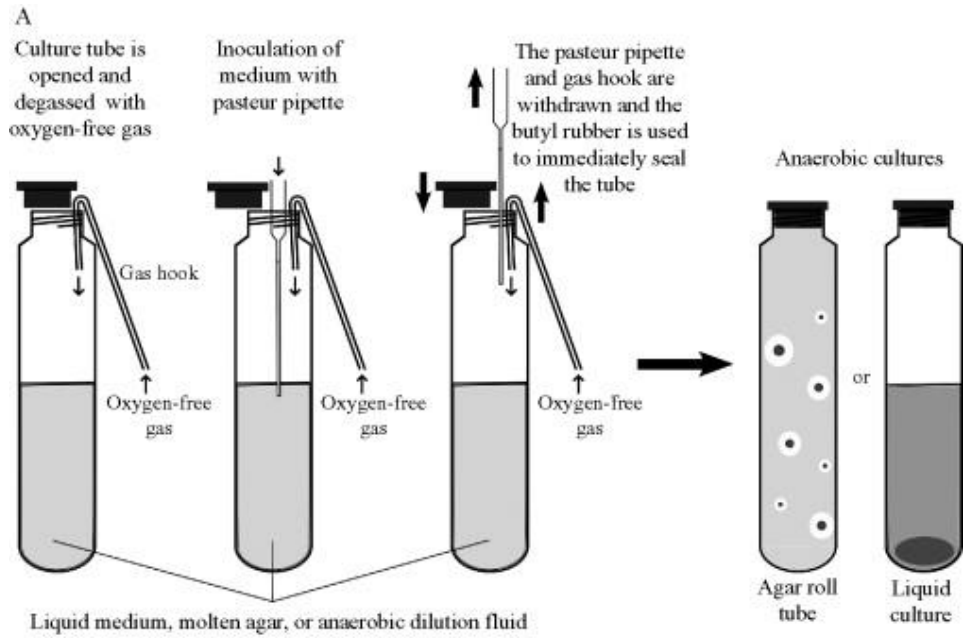


Figure 4-13 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2008 Pearson Prentice Hall, Inc.

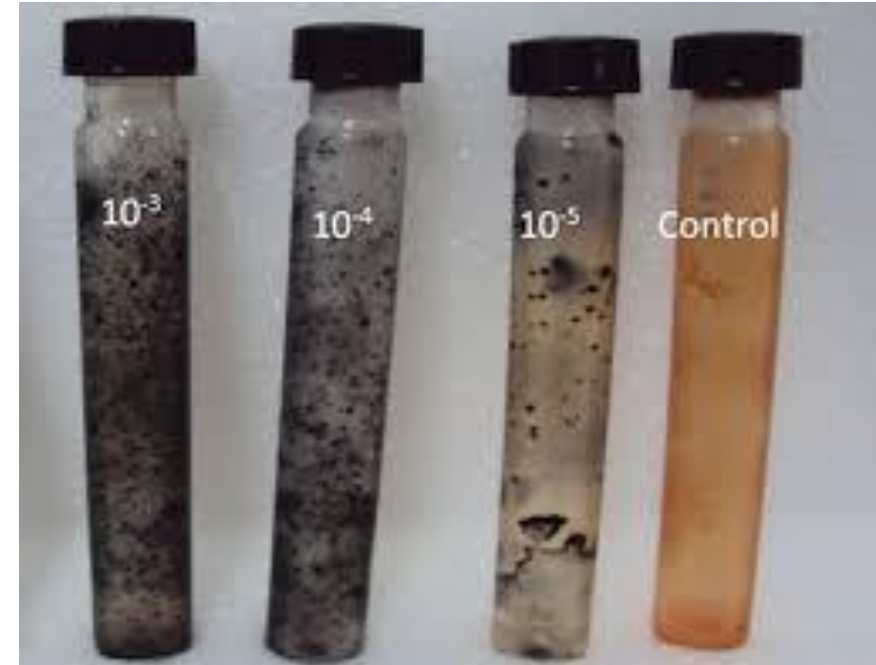


Micromanipulator Method





Roll Tube Method



Metode dalam isolasi mikroorganisme

- Metode kualitatif (Pengamatan, Mikroskopi)
- Metode kuantitatif (Kecepatan pertumbuhan, kapasitas sporulasi)
- Metode Biokimiawi (kromatografi, uji enzimatis, analisis protein)
- Metode molekular (PCR, Sekuensing)

Metode Kualitatif

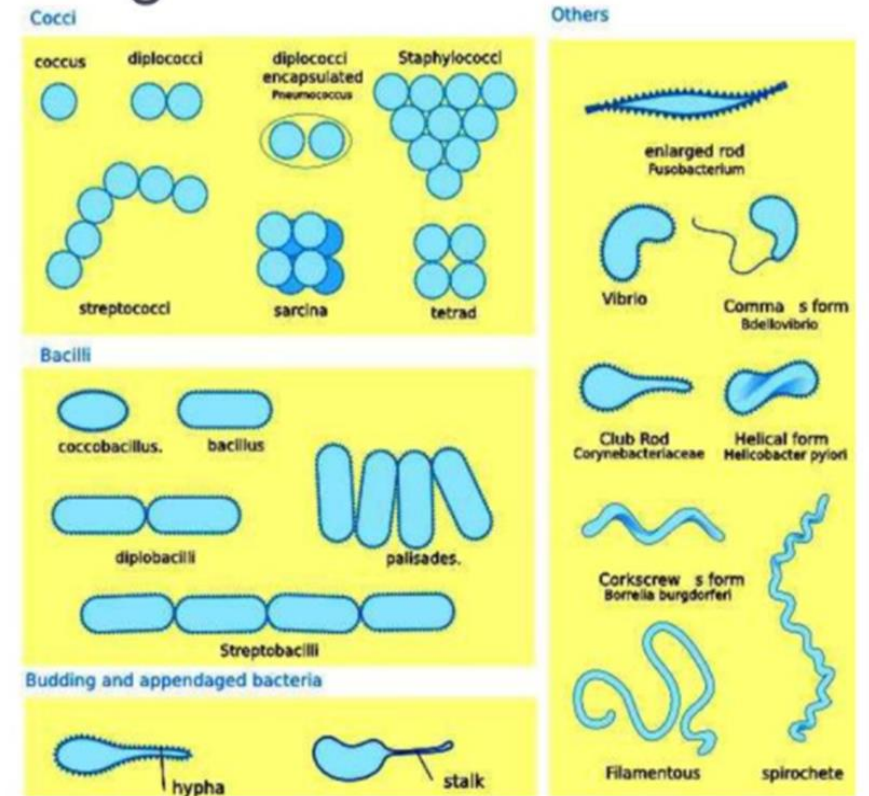
1. Morfologi dan anatomi kultur

- Studi anatomi (bentuk dan ukuran spora, kloroplas, organisasi intraselular)
- Morfologi kultur (pigmentasi, radius koloni, pembentukan hifa dan agregasi, penampakan total)
- Sporulasi (kelimpahan, jenis)
- Pergerakan (nematoda dan organisme yang berflagela)

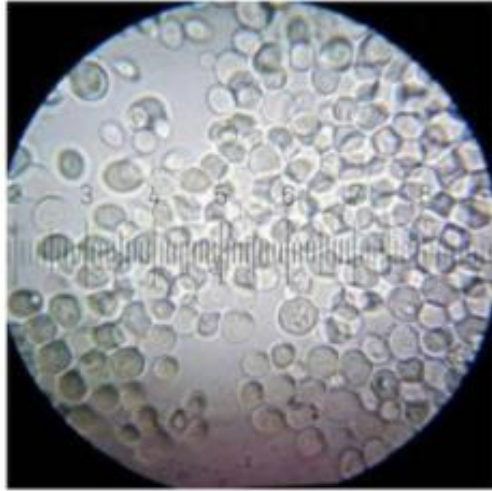
2. Mikroskopi

- Analisis morfologi, anatomi, dan organisasi intraselular
- Deteksi senyawa biokimia dan struktur makro dengan teknik staining (pewarnaan)
- Identifikasi menggunakan oligonukleotida dari organisme dengan pewarna spesifik
- Penentuan viabilitas

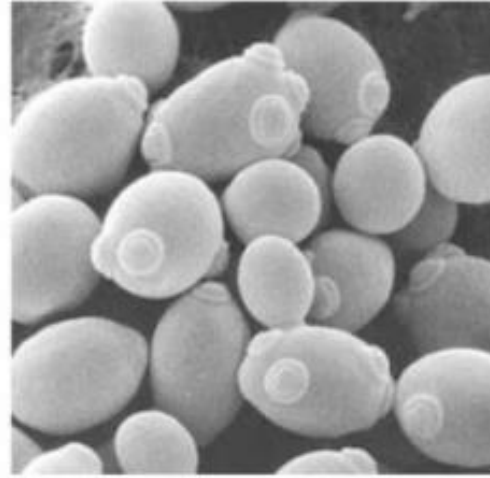
Morfologi Bakteri



Metode-metode mikroskopi



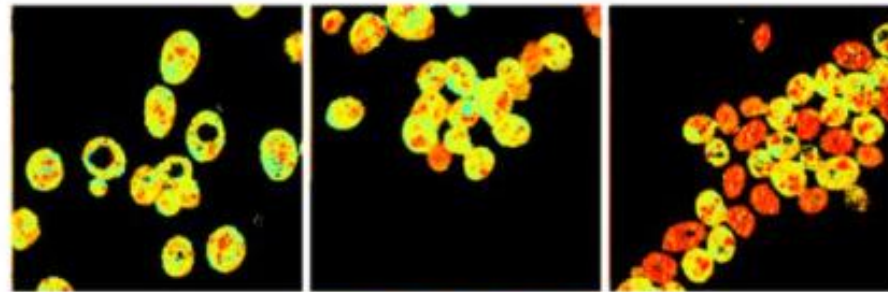
Mikroskop
cahaya



SEM



TEM



Fluorescence Microscopy

Metode Kuantitatif

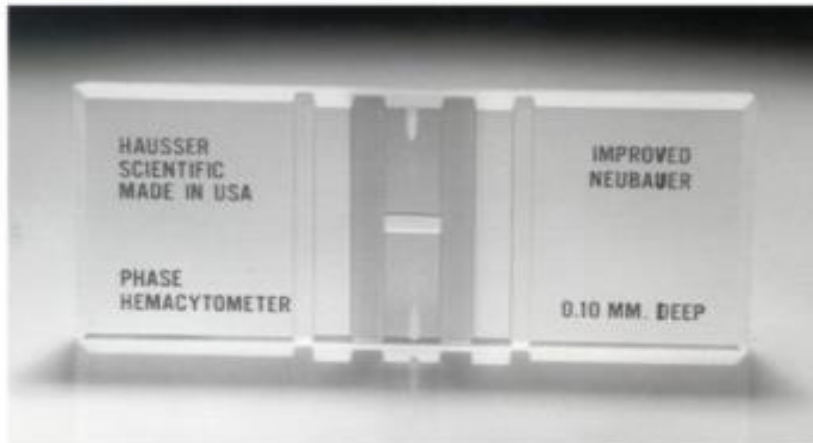
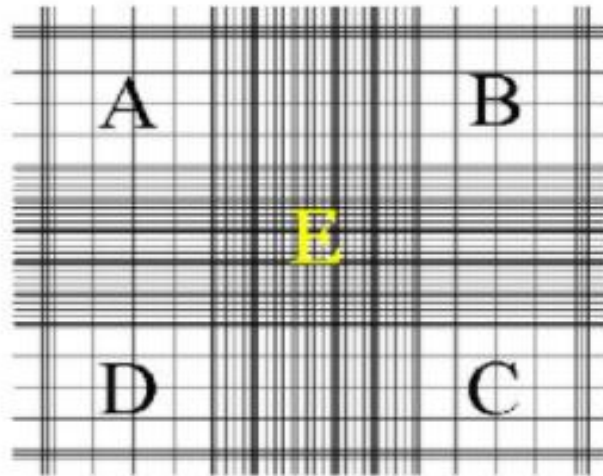
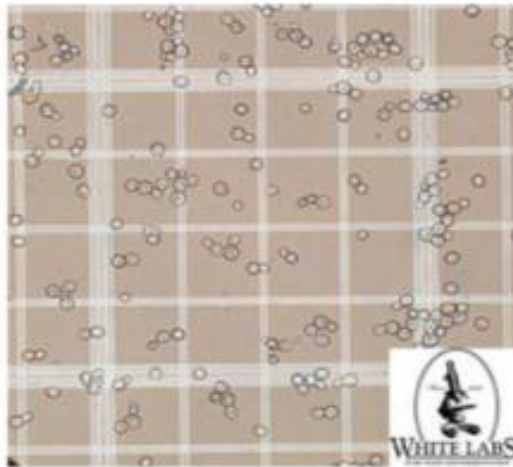
1. Laju Pertumbuhan (bakteri, jamur, alga)
2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
3. Laju fotosintesis (alga dan bakteri fotosintetik)
4. Laju respirasi
5. Produksi enzim / penggunaan substrat

Laju Pertumbuhan

Laju pertumbuhan mikroorganisme (bakteri, ragi, jamur, alga) dapat ditentukan dengan cara:

- Penghitungan jumlah sel (mis.: hemasitometer)
- Kerapatan Optis pada 600 nm
- CFU
- Berat kering sel

Penghitungan jumlah sel dengan hemasitometer

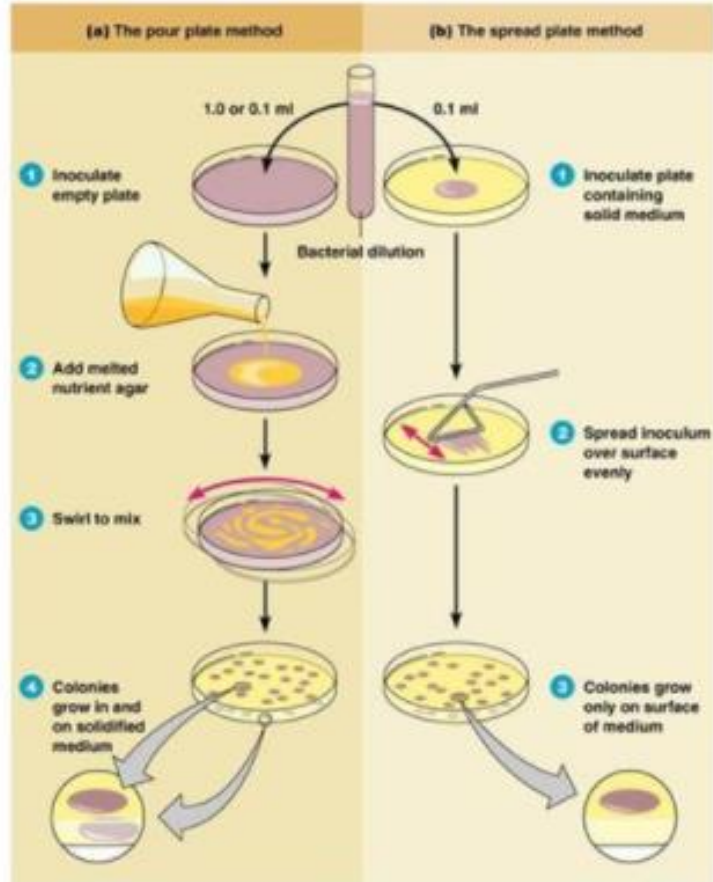


Untuk sel yang dihitung di kotak A, B, C, D:
Kerapatan sel / mL = jumlah sel yang
dihitung $\times 10^4 \times fp$

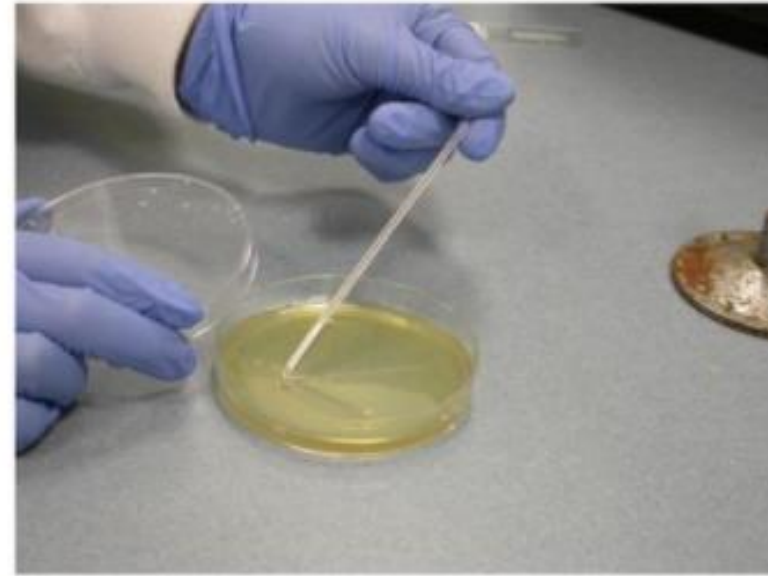
Untuk sel yang dihitung di kotak kecil di
kotak E:

Kerapatan sel / mL = jumlah sel yang
dihitung $\times 2,5 \times 10^5 \times fp$

CFU

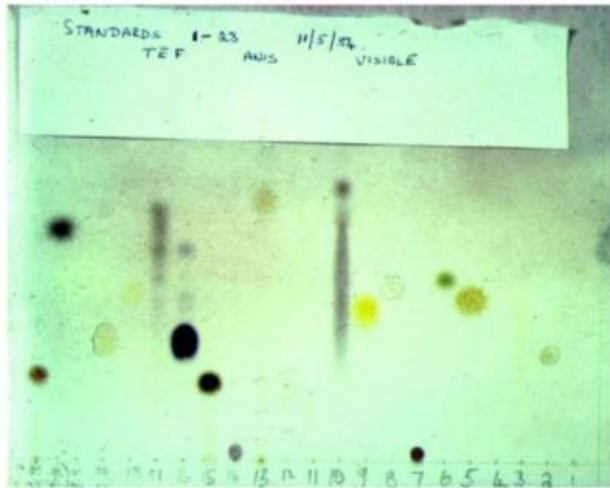


Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



Kromatografi lapis tipis

Untuk menentukan jumlah metabolit (bakteri, jamur, ragi) atau senyawa lain (misal: klorofil pada alga)



Produksi enzim / Penggunaan Substrat

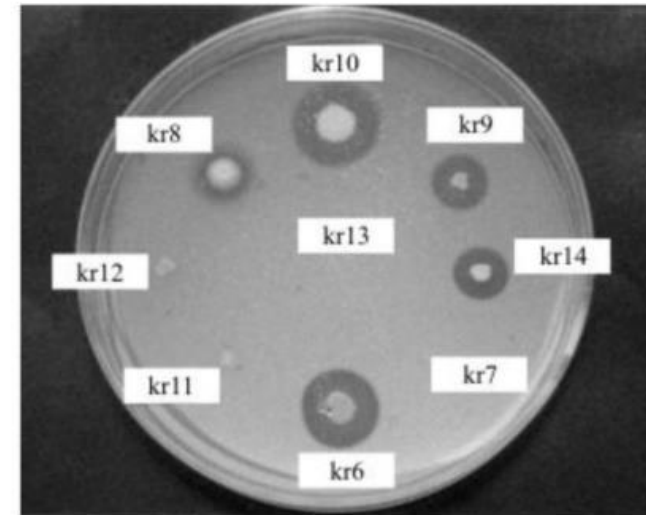


Figure 1. Production of clearing zones in milk agar plates by keratinolytic bacteria. Microorganisms were inoculated by stick and plates were incubated at 30°C for 24 h.

Enrichment/Pengayaan

- Menumbuhkan di media *enrichment*/pengaya
- Pengayaan kultur pada sistem batch atau kontinyu bertujuan untuk mendapatkan kecepatan pertumbuhan maksimum yang diinginkan
- Dilakukan pada kultur broth di labu kocok, atau media padat (misalnya untuk isolasi mikroba penghasil enzim)
- Pertumbuhan inokulum campuran akan menyebabkan modifikasi media → mengubah kekuatan seleksi media → dilakukan beberapa kali sub-kultur pada media baru

Skrining

- Skrining/penapisan adalah pemilahan mikroba dari sekelompok populasi
- Bertujuan untuk mendapatkan mikroba tertentu : produksi enzim spesifik, senyawa inhibitor, dll.
- Skrining untuk sifat yang diinginkan : stabilitas, non-toksik

Tujuan Skrining mikroorganisme

Skrining mikroorganisme dilakukan untuk:

Mendeteksi produk baru (metabolit, vitamin, enzim) serta potensi kegunaan ekonomis lainnya seperti:

- Kontrol biologis
- Biodegradasi
- Bioremediasi
- Proses Kimiawi (biotransformasi, bioakumulasi)
- Pangan dan pemrosesan pangan
- Pengembangan uji

Skrining mikroorganisme yang diinginkan

Metode Pengayaan	Jenis isolat
Nilai pH yang ekstrim (pH 4-2)	Asidofilik
Suhu yang rendah (4-15°C)	Psikotrof
Suhu tinggi (42-100°C)	Termofilik
Konsentrasi NaCl yang tinggi	Halofilik
Atmosfir N ₂	Anaerobik
Kitin sebagai substrat pertumbuhan	<i>Lysobacter</i>
Kulit batang pohon, akar	Myxobacteria
Butiran pollen	Actinoplanes

Sistem uji untuk skrining metabolit

Produk yang diinginkan	Sistem uji
antibiotik	Plat agar dengan mikroorganisme uji. Terbentuknya zona bening digunakan sebagai indikator.
Resistensi terhadap antibiotik β -laktamase	Plat agar yang telah ditambah β -laktamase.
Protease	Plat agar dengan kasein, pemilihan koloni yang menghasilkan zona bening.
Amilase	Plat agar dengan pati, pemilihan koloni setelah pewarnaan dengan iodin.
Lipase	Plat agar dengan emulsi minyak, pemilihan koloni setelah pengendapan asam lemak bebas dengan ion Ca^{2+} .
Fosfatase	Plat agar dengan fenolftalein-difosfat dan indikator pH. Seleksi berdasarkan perubahan warna
NAD	Plat agar dengan mikroorganisme auksotrof terhadap NAD.

Pengawetan Mikroorganisme

Tujuan :

- Mempertahankan isolat kultur murni pada waktu yang lama
- Menghindari kontaminasi
- Mencegah perubahan genetik (mutasi)

Metode :

- Transfer kultur ke media baru secara periodik
- Penyimpanan pada tanah steril
- Penyimpanan pada suhu rendah
- Pengawetan dengan *overlaying* kultur dengan minyak mineral
- *Freeze drying/lyophilization*

Pengawetan mikroorganisme

- Penyimpanan pada suhu rendah
 - Penyimpanan pada slope agar kultur ditumbuhkan pada slop agar dan dapat disimpan pada lemari pendingin (4°C) atau freezer (-20°C), dan disub kultur setiap 6 bulan sekali
 - Penyimpanan pada nitrogen cair aktivitas mikroorganisme sangat minim pada suhu sangat rendah (-150 sampai -196°C), yang dapat dicapai dengan penyimpanan pada nitrogen cair. Pada penyimpanannya, mikroorganisme disuspensikan dalam agen krioprotektif (mis.: gliserol 10%)



- Penyimpanan dalam bentuk dehidrasi
 - Kultur kering

Tanah yang lembab dan steril diinokulasi dengan kultur dan diinkubasi selama beberapa hari agar mikroorganismenya tumbuh, kemudian dikeringkan pada suhu kamar. Tanah kering disimpan pada suhu ruang atau 4°C. MO dapat bertahan sampai 20 th dengan viabilitas 50%.
 - Liofilisasi

liofilisasi atau pengeringan beku dilakukan dengan membekukan kultur dan dikeringkan pada keadaan vakum, sehingga mengakibatkan sublimasi air dari sel. Pada proses pengeringan, harus ditambahkan pelindung seperti susu, serum, atau natrium glutamat,



Aspergillus niger



Aspergillus melles



Aspergillus ustus



Aspergillus terreus



Pengawetan Kultur Dengan Overlaying Minyak Mineral/Parafin

- In this method sterile liquid paraffin is poured over the slant culture of microbes and stored upright at room temperature.
- Where as cultures can also be maintained by covering agar slants by sterile mineral oil which is stored at room temperature or preferably at 0-5°C.
- It limit the oxygen access that reduces the microorganism's metabolism and growth, as well as to cell drying during preservation.
- The preservation period for bacteria from the genera *Azotobacter* and *Mycobacterium* is from 7-10 years, for *Bacillus* it is 8-12 years.

Adv:

- *Simple*
- *Mainly used anaerobic microorganism*
- *Cost effective method*
- *Can preserve 10-15 years*

