

POKOK BAHASAN :

1. Pengenceran Suspensi Bakteri dari Sumber Isolat/Lingkungan
2. Teknik Isolasi Bakteri (*Solid and Liquid Medium*)

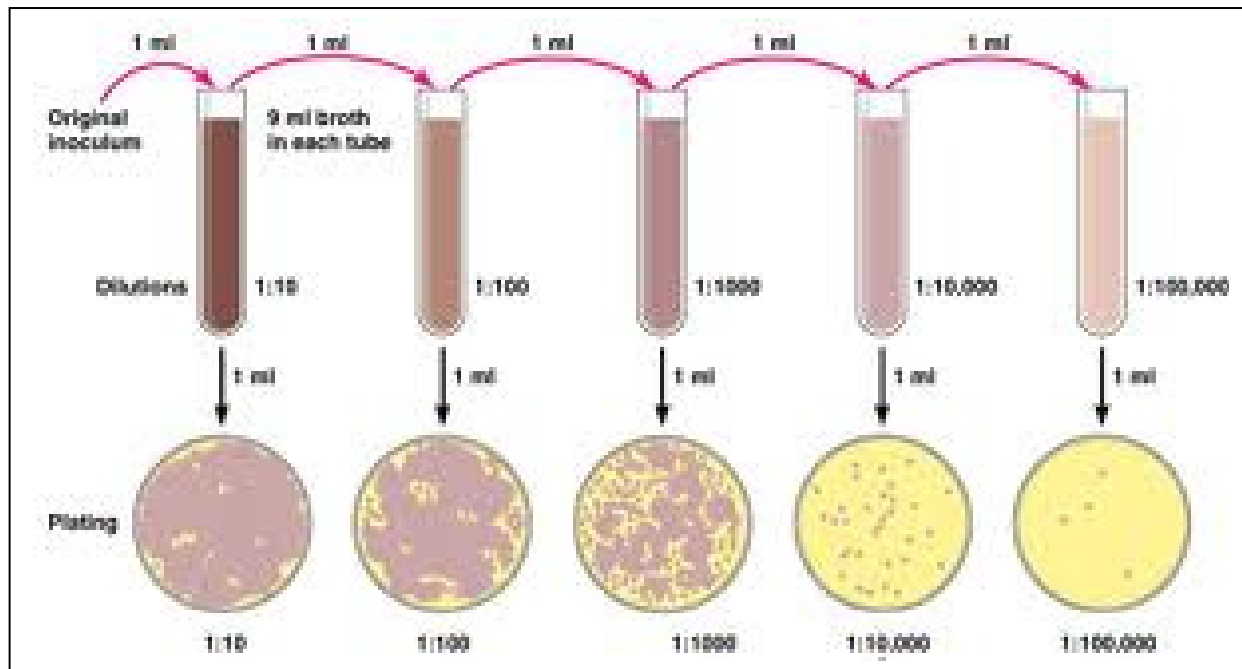
TUJUAN PRAKTIKUM :

1. Memahami persiapan dan pelaksanaan pengenceran suspensi bakteri sebelum melakukan kegiatan isolasi bakteri;
2. Mengetahui dan memahami teknik-teknik Isolasi Bakteri(*Solid and Liquid Medium*).

TINJAUAN PUSTAKA :**1. TEKNIK PENGENCERAN SUSPENSİ BAKTERI**

Pengenceran suspensi bakteri dari sampel/ sumber isolat dari lingkungan dilakukan sebagai upaya untuk mendapatkan kuantitas bakteri dalam jumlah yang dapat terhitung. Seperti yang telah diketahui bahwa dalam sampel lingkungan komunitas bakteri berada dalam kuantitas yang sangat melimpah. Selain mendapatkan kuantitas yang dapat terhitung, pengenceran suspensi bakteri dari sampel/ sumber isolat dari alam juga diperlukan dalam rangka memudahkan dalam pengamatan koloni, terutama dalam kegiatan bertahap pemurnian isolat (sub-kultur). Koloni yang tumbuh terpisah dalam kuantitas yang dapat dihitng memudahkan peneliti untuk memilih koloni yang akan dipisahkan (disub-kultur).

Pengenceran suspensi bakteri dari sampel/ sumber isolat dari lingkungan pada umumnya dilakukan dengan teknik pengenceran berseri (*series of dilution*).



Sumber : faculty.irsc.edu

Gambar : Teknik Pengerjaan Pengenceran Suspensi Bakteri

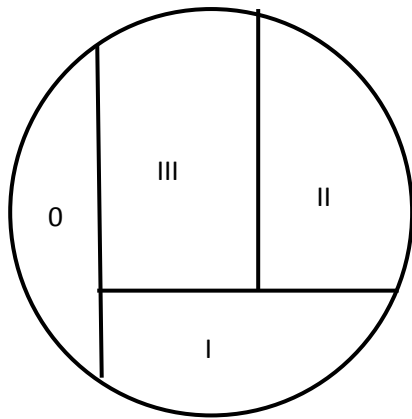
2. TEKNIK ISOLASI BAKTERI

Dalam kegiatan mikrobiologi pembuatan isolat dilakukan dengan cara mengambil sampel mikrobiologi dari lingkungan yang ingin diteliti. Dari sampel tersebut kemudian dibiakkan dengan menggunakan media universal atau media selektif, tergantung tujuan yang ingin dicapai. Jika menggunakan media universal akan diperoleh biakan mikroba campuran. Untuk proses identifikasi maupun isolasi jenis tertentu saja, dilakukan proses pembuatan isolat tunggal dari isolat campuran tersebut. Isolat tunggal atau biakan murni merupakan biakan yang asalnya dari pembelahan satu sel tunggal.

Ada beberapa metode untuk memperoleh biakan murni dari isolat campuran. Dua di antaranya yang sering digunakan adalah teknik cawan gores dan teknik cawan tuang. Prinsip dari kedua teknik tersebut sama, yaitu mengencerkan biakan campuran hingga setiap individu spesies dapat dipisahkan, sehingga setiap koloni yang terbentuk merupakan hasil dari pembelahan satu sel.

a. Metode Cawan Gores Kuadran (*Strike Plate*)

Metode ini praktis, hemat biaya dan waktu, hanya membutuhkan keterampilan. Hasil penggoresan diharapkan tampak seperti gambar di bawah ini.

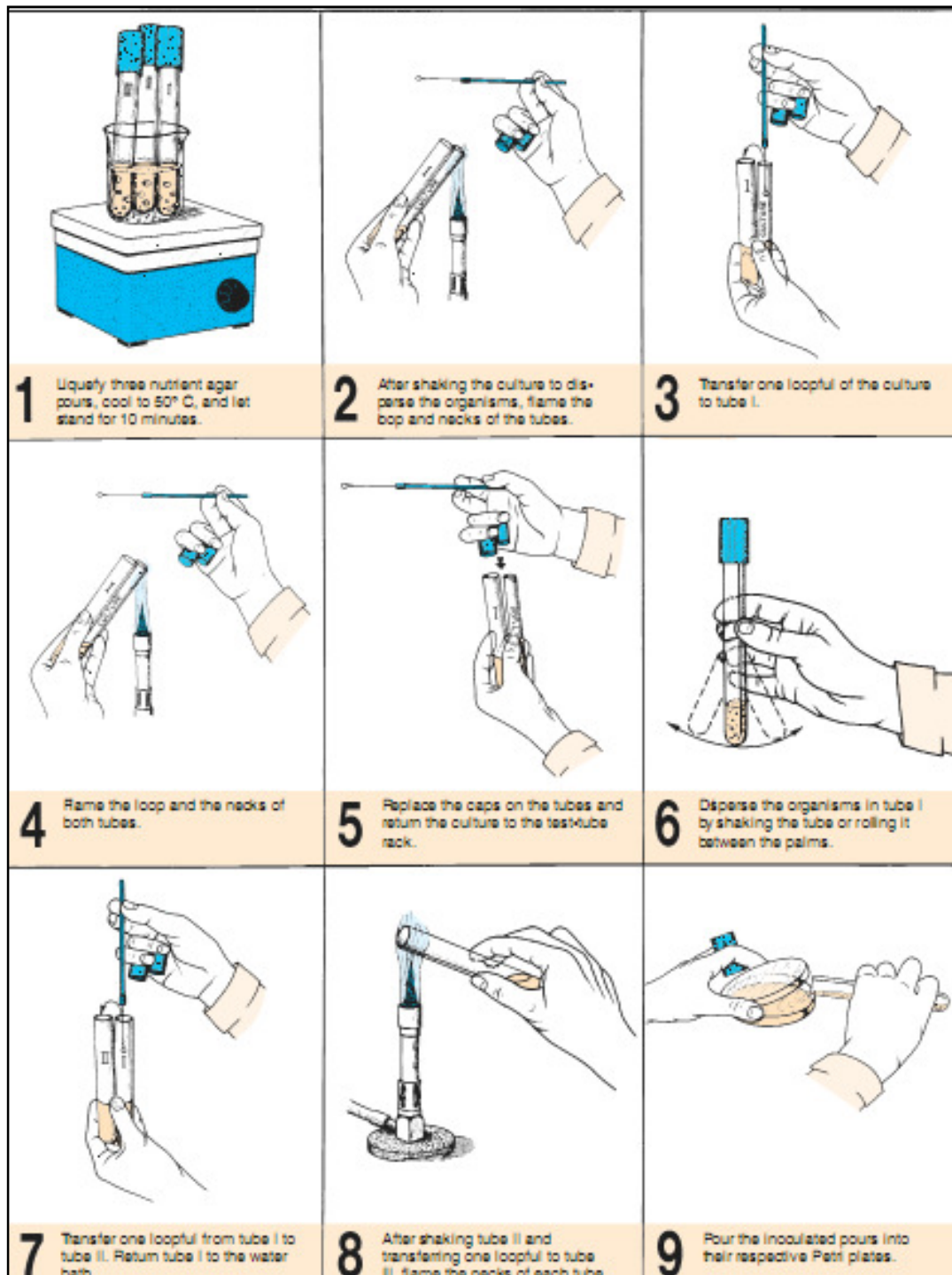


Gambar : Pembagian Kuadran dalam Teknik *Strike Plate*

Kesalahan-kesalahan yang umum dilakukan dalam metode ini antara lain : (1) tidak memanfaatkan permukaan medium untuk digores sehingga pengenceran kurang optimal, (2) penggunaan inokulum yang terlalu banyak sehingga menyulitkan pemisahan sel waktu digores.

b. Metode Cawan Tuang (*Pour Plate*)

Metode cawan tuang merupakan teknik lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan koloni murni mikroorganisme. Kelemahan metode ini adalah membutuhkan waktu dan bahan yang lama dan banyak, akan tetapi tidak memerlukan keterampilan tinggi. Biakan campuran diencerkan dengan menggunakan medium agar yang telah dicairkan dan didinginkan. Pengenceran dilakukan dalam beberapa tahap hingga diperoleh koloni tunggal.



Gambar : Pengerjaan Isolasi Bakteri dengan Teknik *Pour Plate*

PROSEDUR PELAKSANAAN PRAKTIKUM :

1. TEKNIK PENGECERAN SUSPENSI BAKTERI

Alat :

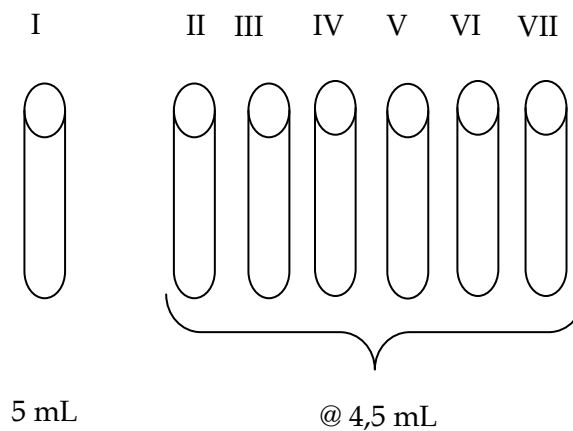
- Mortar Keramik dan Penumbuk
- Tabung Reaksi
- Rak Tabung Reaksi
- Pipet Volumetrik
- Vortex
- Busen
- Autoclave

Bahan :

- Sumber Isolat/ Sampel Lingkungan
- NaCl Fisiologis/ Air Laut
- Spiritus
- Kapas
- Kasa
- Tissue
- Plastik Tahan Panas
- Karet Gelang
- Kertas Label

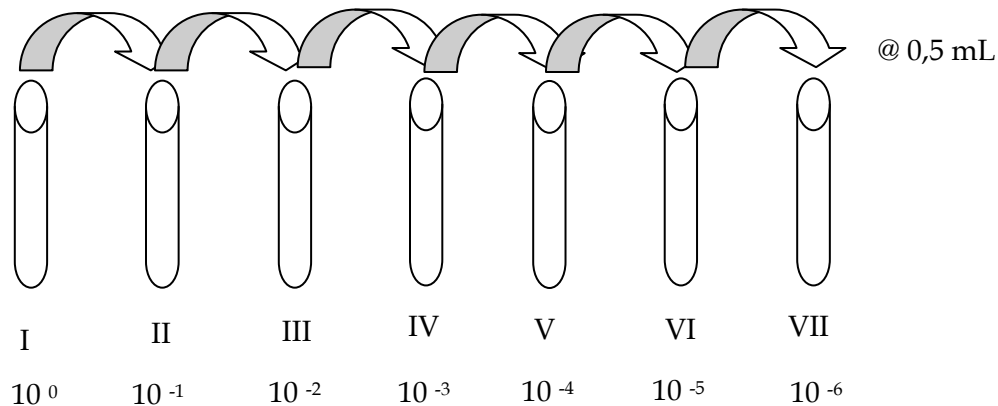
Prosedur :

1. Masukkan NaCl Fisiologis/Air Laut ke dalam masing-masing tabung reaksi dengan ketentuan sebagai berikut : satu tabung pertama diisi dengan 5 mL NaCl Fisiologis/Air Laut dan enam tabung berikutnya masing-masing diisi dengan 4,5 mL NaCl Fisiologis/Air Laut;



2. Sterilisasi Seri Tabung pengenceran di atas beserta Mortar Keramik dan Penumbuknya serta Pipet Volumetrik ke dalam Autoclave;
3. Gerus sumber isolat/ sampel lingkungan dengan bantuan NaCl Fisiologis/ Air laut steril di atas Mortar Keramik steril,
4. Timbang 1 (satu) gram sampel (di atas aluminium foil), kemudian masukkan ke dalam tabung I, vortex sebentar agar suspensi homogen;

- Ambil sebanyak 0,5 mL suspensi dari tabung I dengan menggunakan Pipet Volumetrik steril, kemudian masukkan ke dalam tabung II, vortex sebentar agar suspensi homogen;
- Lakukan langkah No. 5 untuk tabung III, IV, V, VI, dan VII.



2. ISOLASI BAKTERI (*Solid and Liquid Medium*)

Alat :

- Cawan Petri Steril
- Erlenmeyer steril
- Jarum Ose
- Pipet Volumetrik
- L-Glass
- Bunsen
- *Vortex*
- Inkubator
- *Shaking Incubator*
- *Autoclave*

Bahan :

- Medium Nutrient Agar (NA) [+ Bahan tambahan] Steril
- Medium Nutrient Broth (NB) [+ Bahan tambahan] Steril
- Seri Pengenceran 10^{-6}
- Tissue
- Plastik Wrap

Prosedur :

A. *L-Glass Spread (Solid Medium)*

- Tuangkan Medium Nutrient Agar (NA) yang telah mencair (dipanaskan/ dicairkan terlebih dahulu di atas Hot Plate) sebanyak 20 mL ke dalam Cawan Petri steril, ratakan;
- Diamkan dan biarkan memadat di dekat bunsen;
- Tuangkan sebanyak 100 μ L suspensi dari Tabung Pengenceran ke VII ke atas Plate Agar yang sudah padat, Ratakan dengan L-Glass di dekat Bunsen;

4. Seal Cawan Petri dengan Plastik Wrap;
5. Inkubasi dengan posisi terbalik di dalam incubator (10/25/60 °C) selama 24 – 48 jam;
6. Amati dan Hitung Koloni yang tumbuh.

B. Ose-wire Strike (Solid Medium)

1. Buatlah Peta Kuadran di Balik Cawan Petri dengan menggunakan Spidol Marker;
2. Tuangkan Medium Nutrient Agar (NA) yang telah mencair (dipanaskan/ dicairkan terlebih dahulu di atas Hot Plate) sebanyak 20 mL ke dalam Cawan Petri steril, ratakan;
3. Diamkan dan biarkan memadat di dekat bunsen;
4. Dengan Jarum Ose, ambil 1 loop suspense dari Tabung Pengenceran ke VII, goreskan ke atas Agar Plate di daerah sektor 0;
5. Pijarkan Jarum Ose dan biarkan dingin. Goreskan Jarum Ose pada sektor 0 disusul gerakan ke tepi luar sektor 1 lalu kembali ke sektor 0. Lakukan bolak-balik sebanyak 3 kali. Kemudian selesaikan penggoresan di sektor I tanpa menyentuh sektor 0 kembali hingga seluruh permukaan sektor I penuh goresan yang tidak bertumpang tindih.
6. Putar cawan petri hingga sektor I berada di sebelah kiri anda. Ulangi kegiatan 5 untuk sektor II dan III. (jangan lupa untuk memijarkan kembali Jarum ose setiap akan berpindah sektor).
7. Seal Cawan Petri dengan Plastik Wrap;
8. Inkubasi dengan posisi terbalik di dalam incubator (10/25/60 °C) selama 24 – 48 jam;
9. Amati Koloni yang tumbuh pada jalur goresan di masing-masing sektor.

C. Kultur Cair (Liquid Medium)

1. Ambil sebanyak 1 mL suspense bakteri dari Tabung Pengenceran ke VII dengan menggunakan Pipet Volumetrik steril, tuangkan ke dalam 100 mL medium NB (Cair);
2. Goyangkan secara perlahan agar suspense bercampur;
3. Inkubasi pada incubator (10/25/60 °C) dengan shaking 150 rpm selama 24 – 48 jam;
4. Amati kekeruhan medium (sebagai indicator tumbuhnya bakteri) dan hitung densitasnya dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm.

PARAMATER YANG DIAMATI :

1. Teknik Isolasi Bakteri : *L-Glass Spread (Solid Medium)*

No	Sumber Isolat	Inkubasi		Jumlah Koloni Terhitung (cfu)
		Suhu (°C)	Lama Waktu	

2. Teknik Isolasi Bakteri : *Ose-wire Strike (Solid Medium)*

No	Sumber Isolat	Inkubasi		Jumlah Koloni Terhitung (cfu) per sektor			
		Suhu (°C)	Lama Waktu	0	I	II	III

3. Kultur Cair (*Liquid Medium*)

No	Sumber Isolat	Inkubasi			Absorbansi pada λ 600	Densitas
		Suhu (°C)	Lama Waktu	Agitasi (rpm)		