



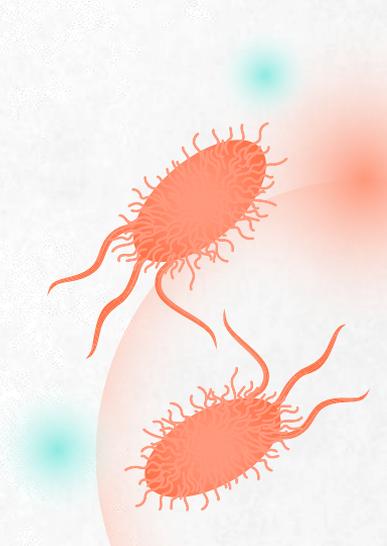
# Isolasi & Identifikasi Bakteri

apt. Catharina Apriyani W.H., M.Farm

**STIKES NOTOKUSUMO  
PROGRAM STUDI FARMASI  
2024**



01



# Pendahuluan

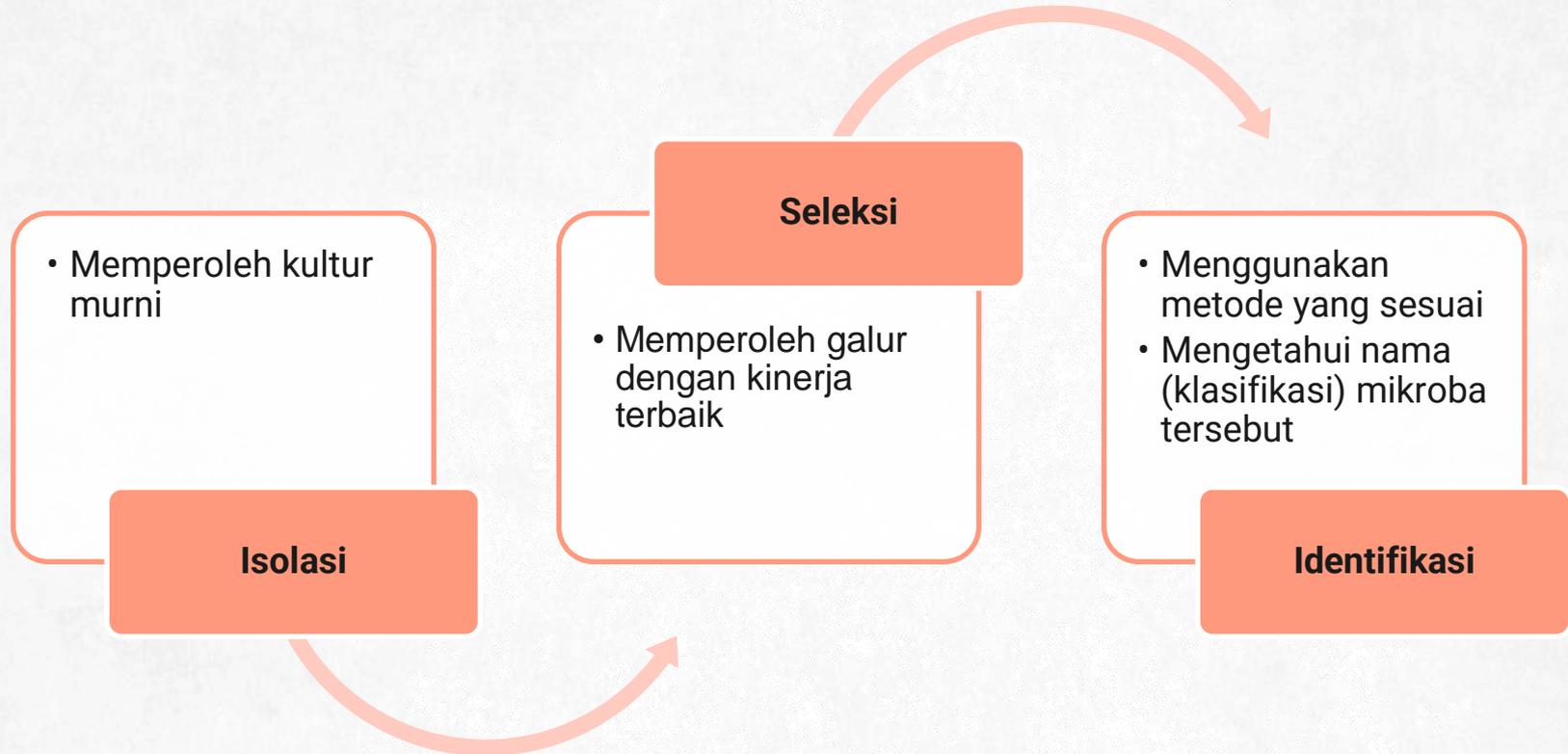
# Sumber Mikroba

- Sumber alami: tanah, air, udara, tanaman/hewan, limbah, dll
- Lembaga koleksi kultur



- Sel darah merah pada cawan berisi agar digunakan untuk mendiagnosis infeksi.
- Pada cawan sebelah kiri positif terinfeksi oleh *Staphylococcus* (bakteri berkoloni) dan cawan kanan positif terinfeksi oleh *Streptococcus* (berderet sambung-menyambung).

# Tahapan Identifikasi Mikroba





1

Sample &  
transport



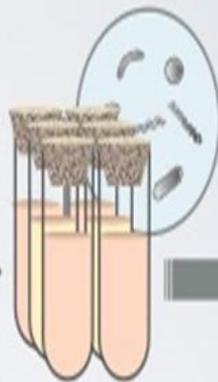
2

disperse, dilute & plate  
Onto selective or non  
selective media



3

pick individual  
colonies & grow  
pure cultures



4

characterize by  
morphology & bio-  
chemical tests



GenusX  
species 1  
species 2  
species 3

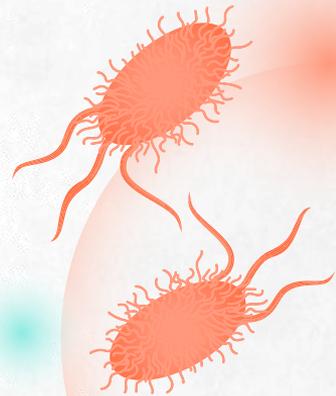
5

classify



02

# Teknik Isolasi Bakteri



# Inokulasi

- Kegiatan pemindahan mikroorganisme (bakteri/jamur) dari tempat atau sumber asalnya ke medium baru yang telah dibuat dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi dan aseptis
- Biakan mikroorganisme murni yang didapatkan dari inokulasi dimanfaatkan untuk:
  - Pembelajaran
  - Kepentingan industri, pertanian, dan kesehatan.
- Inokulasi yang baik ditentukan oleh tingkat sterilitas ruangan, alat, dan tenaga pelaksana baik kebersihan maupun teknik inokulasinya.

# 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)
- Sampel biasanya segera dipakai atau disimpan pada suhu dingin (kulkas)

# Teknik Isolasi Kultur Murni

- Penggoresan (*Streak-plate*) & Penyebaran (*Spread-plate*)
- Penuangan (*Pour-plate*)
- Kultur yang Diperkaya (*Enrichment Culture*)
- Pengenceran Berseri (*Serial-dilution*)
- Isolasi Sel Tunggal

# Teknik Isolasi Kultur Murni



# ***Pour Plate Method***

- **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

1 Bacterial sample mixed with warm agar (45–50 °C)



2 Sample poured onto sterile plate



3 Sample swirled to mix, allowed to solidify



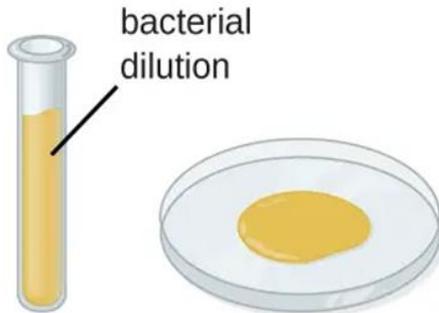
4 Plate incubated until bacterial colonies grow



# ***Spread Plate Method***

- Teknik ini merupakan prosedur rutin untuk isolasi bakteri & menggunakan peralatan yang sederhana

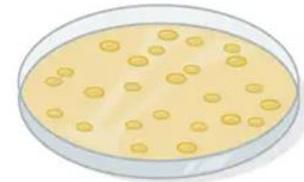
1 Sample (0.1 mL) poured onto solid medium



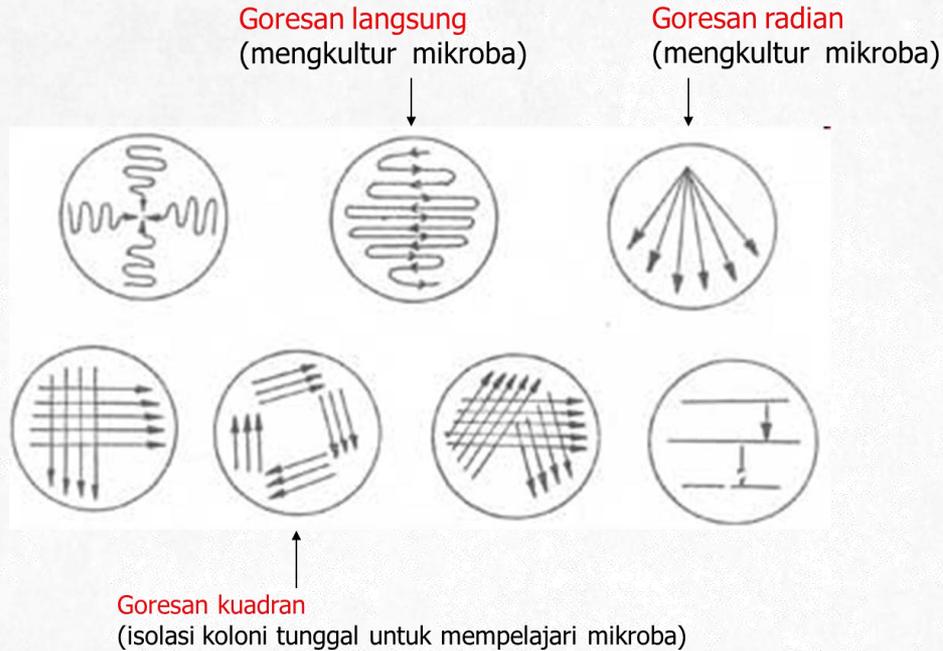
2 Spread sample evenly over the surface



3 Plate incubated until bacterial colonies grow on the surface of the medium



# Cara Penggoresan Kultur (*Streak-plate*)

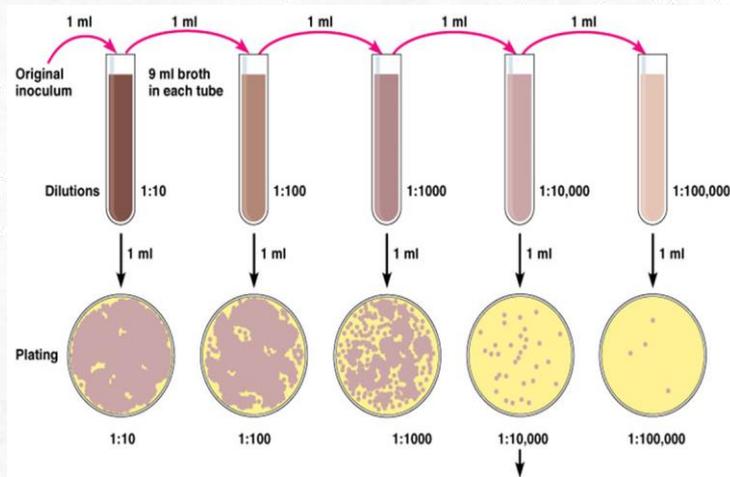


# Kultur Diperkaya (*Enrichment Culture*)

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

# Teknik Pengenceran Berseri (Serial-dilution)

- Teknik yang 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



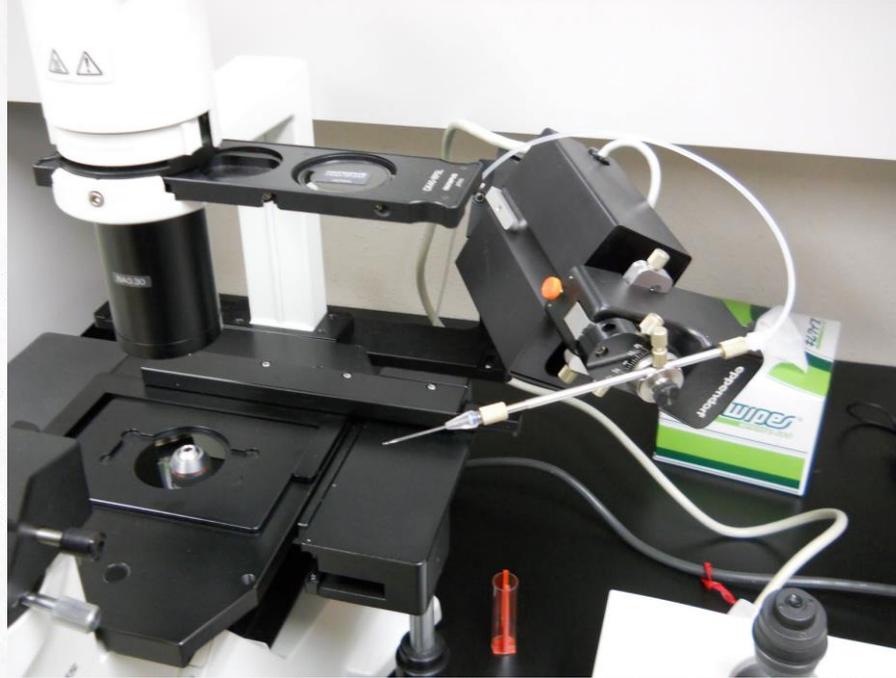
Calculation: Number of colonies on plate  $\times$  reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml  
(For example, if 32 colonies are on a plate of  $1/10,000$  dilution, then the count is  $32 \times 10,000 = 320,000$ /ml in sample.)

# 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

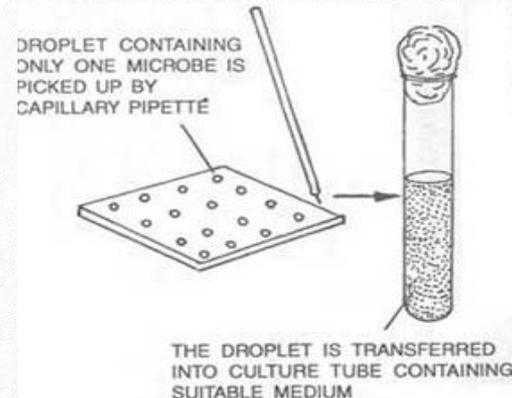
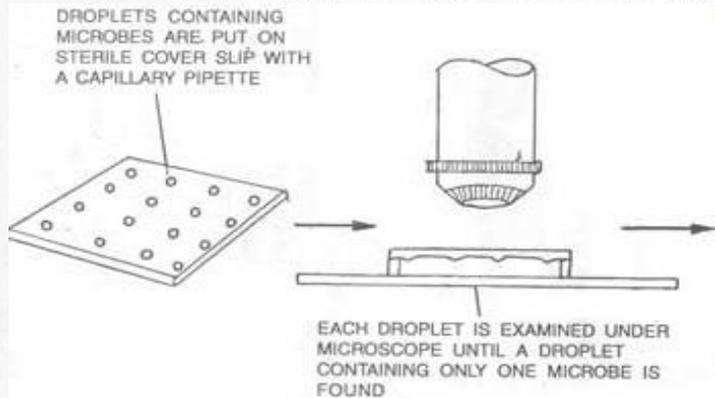
# Micromanipulator



# Teknik Isolasi Sel Tunggal

## b. Metode Kapiler

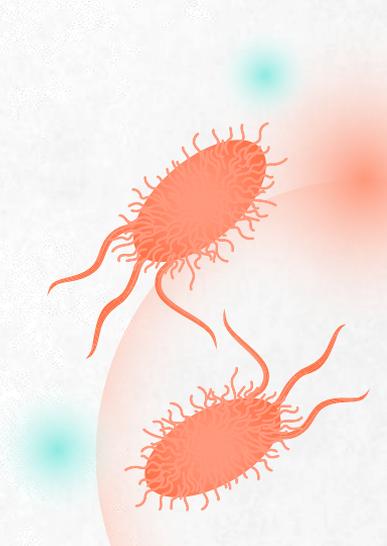
- Beberapa tetes media yang mengandung mikroba, ditempatkan pada penutup gelas obyek steril menggunakan pipet kapiler steril.
- Dengan menggunakan mikroskop, cari tetesan yang mengandung hanya 1 mikroba. Tetesan tersebut dipindahkan dengan pipet kapiler steril ke media segar → mikroba tunggal yang berada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



Microscopic organisms, specifically pink, rod-shaped bacteria with flagella, are depicted in the top-left corner of the slide. The background features soft, out-of-focus light blue and pink circular bokeh effects.

03

# **Pembuktian Kemurnian Kultur**

Microscopic organisms, specifically orange, rod-shaped bacteria with flagella, are depicted in the bottom-right corner of the slide. The background features soft, out-of-focus light blue and pink circular bokeh effects.

# Pembuktian Kemurnian Kultur

Setelah diasumsikan berhasil mengisolasi kultur murni → perlu dilakukan pengujian dengan kriteria sebagai berikut :

- Mikroba tampak mirip secara mikroskopis dan menunjukkan hasil pewarnaan yang sama
- Pada saat ditanam pada agar cawan, semua koloni menunjukkan kesamaan
- Hasil penggoresan dll seragam
- 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 :
  - Mutasi
  - Rekombinasi

# Identifikasi

Metode untuk identifikasi mikroba adalah dengan menggunakan ciri/karakteristik:

- **Morfologis**

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

- **Nutrisional**

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

- **Kultural**

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

# Identifikasi

- **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

- **Susunan Kimiawi**

Penentuan susunan kimiawi berbagai komponen sel (dinding sel, nukleus, membran, dll)

- **Susunan Antigen (Serologi)**

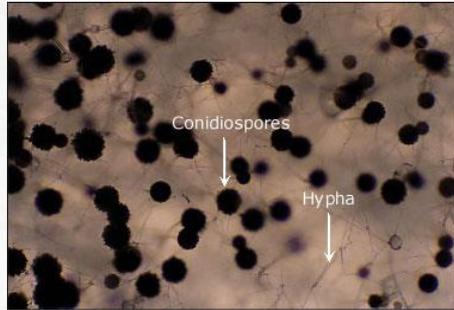
Penelaahan sifat antigen – antibodi yang khas

\*Antigen : substansi (sel mikroba) yang menstimulasi produksi antibodi saat diinjeksikan ke hewan

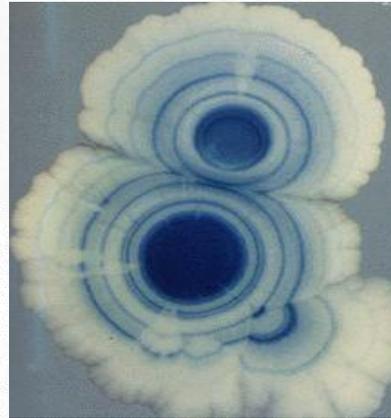
# Identifikasi

- **Patogenik**  
Penentuan potensi suatu mikroba untuk menimbulkan penyakit
- **Genetik**  
Kajian berdasarkan untaian DNA mikroba menggunakan DNA Probe

# Karakteristik Morfologis



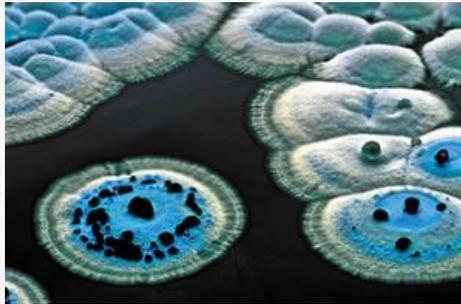
*Aspergillus*



*E. coli*

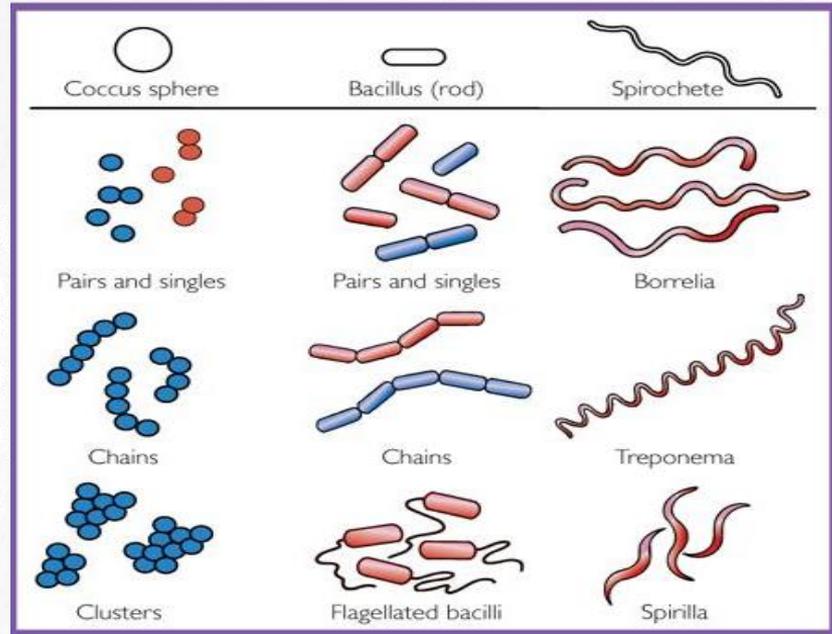


*Penicillium*

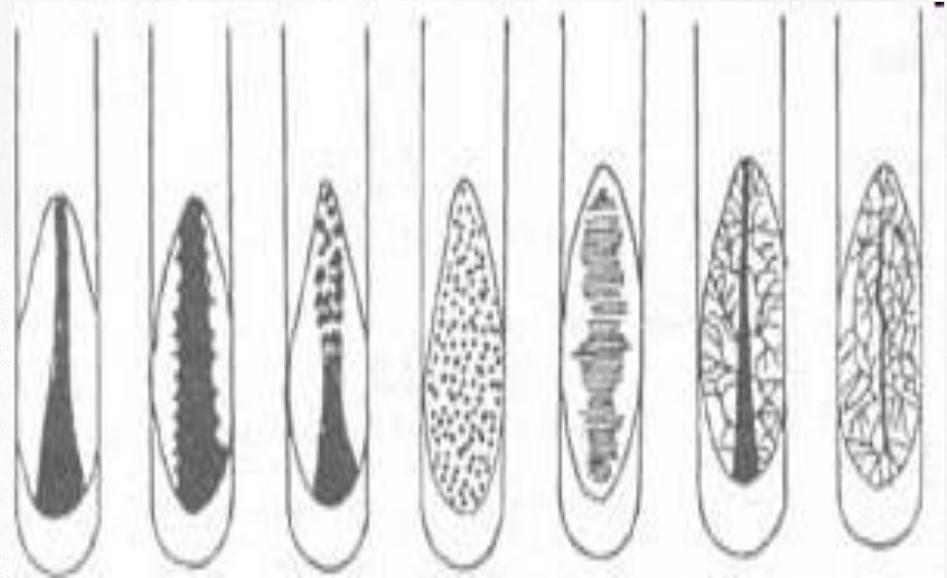
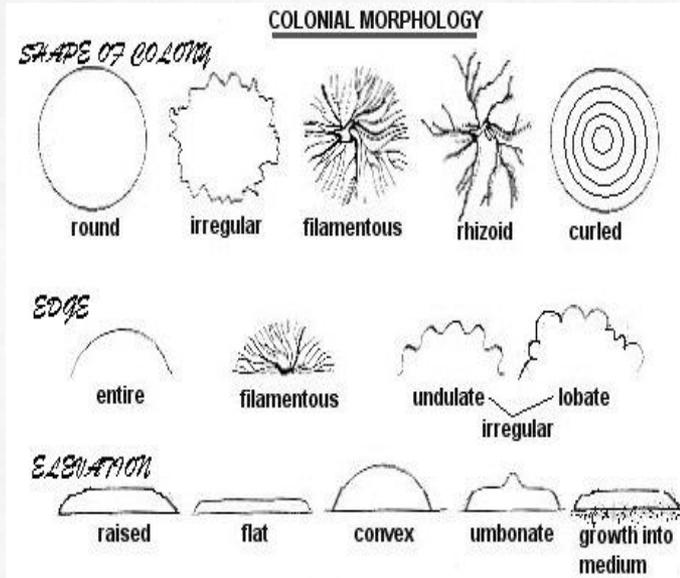


*Streptomyces*

# Bentuk dan Susunan Sel



# Karakteristik Kultural



Kultur pada Agar Miring

# **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 Pemeliharaan dan Pengawetan Kultur Murni

## 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

# Cara Pemeliharaan dan Pengawetan Kultur Murni

## Pelapisan Kultur dengan 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

# Cara Pemeliharaan dan Pengawetan Kultur Murni

## Liofilisasi → Pengeringan Beku (*freeze drying*)

- Sel mikroba dikering-bekukan & aktivitas metabolisme stop (dorman) → efektif untuk bakteri (dapat tetap hidup & tidak berubah selama bertahun-tahun)
- 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 ( $-780^{\circ}\text{C}$ ) → beku
  - Ampul dihubungkan dengan kondensator & pompa vakum → kering (sublimasi)
  - Ampul ditutup dengan melelehkan ampul kaca tersebut dalam keadaan vakum → penyimpanan pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$
- Keuntungan : Cocok untuk penyimpanan jangka panjang (tahunan) & kemungkinan perubahan kecil & Wadah penyimpanan kecil

# Cara Pemeliharaan dan Pengawetan Kultur Murni

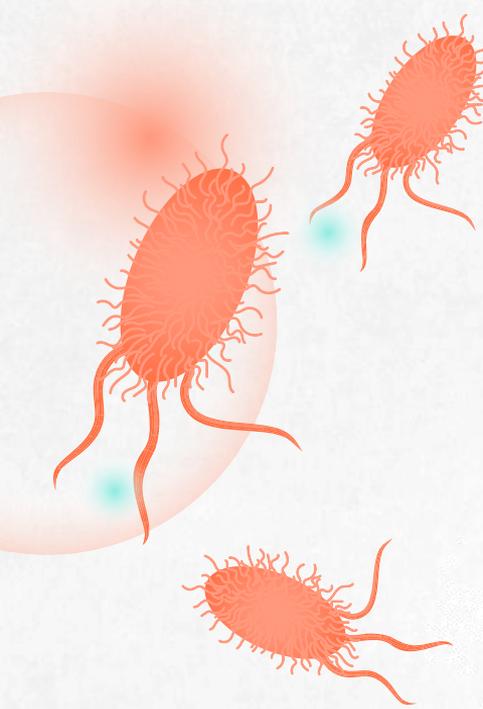
## Penyimpanan pada Suhu Rendah (Cryopreservation)

- Menggunakan nitrogen cair (sekitar  $-156^{\circ}\text{C}$  sampai  $-196^{\circ}\text{C}$ )
- 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

# Cara Pemeliharaan dan Pengawetan Kultur Murni

## 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



# Thanks!

**Do you have any questions?**

**CREDITS:** This presentation template was created by **Slidesgo**, and includes icons by **Flaticon**, and infographics & images by **Freepik**

Please keep this slide for attribution

