

TEKNIK ISOLASI MIKROORGANISME

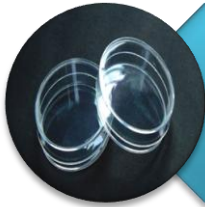
Oleh
Mochamad Nurcholis

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Brawijaya
2013**

OVERVIEW

- Prinsip Bekerja di Lab Mikrobiologi
- Media Mikroorganisme
- Sterilisasi Alat dan Bahan
- Penggunaan LAF, Mikropipet
- Seri Pengenceran & Teknik Isolasi

1. Prinsip Bekerja di Laboratorium Mikrobiologi



Aseptis alat dan meja kerja



Higiene Pekerja



Lakukan Kebiasaan Baik

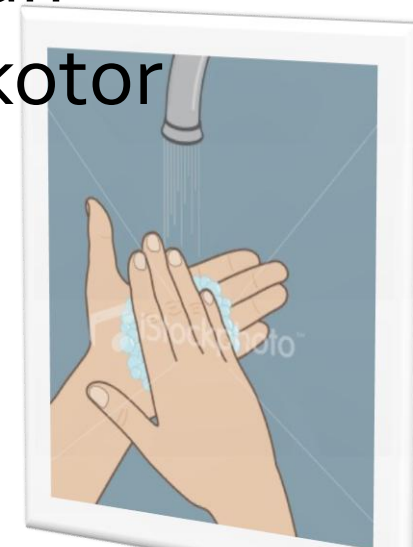


Hindari Kebiasaan buruk

1. Prinsip Bekerja di Laboratorium Mikrobiologi

Aseptis Alat dan Meja Kerja

- Sterilisasi glassware
- Destruksi alat kerja
- Dekontaminasi jarum syringe
- Aseptis meja, LAF dengan desinfektan
- Penyediaan wadah penampung alat kotor



1. Prinsip Bekerja di Laboratorium Mikrobiologi

Preparasi Alat :

- Petridish
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer

Teknik Aseptis :

- Meja
- Ose
- Petridish, tabung reaksi, erlenmeyer

1. Prinsip Bekerja di Laboratorium Mikrobiologi

Higiene Pekerja

- Membersihkan diri secara teratur
- Mengganti pakaian kerja teratur
- Cuci tangan dengan sabun & air mengalir
- Penggunaan jas laboratorium
- Dekontaminasi setelah bekerja



1. Prinsip Bekerja di Laboratorium Mikrobiologi

Lakukan Kebiasaan Baik

- Mengikat rambut
- Menutup kepala dengan cap
- Penggunaan masker
- Mencantumkan label kultur
- Pemakaian lap disposable
- Pemakaian sarung tangan



1. Prinsip Bekerja di Laboratorium Mikrobiologi

Hindari Kebiasaan Buruk

- Mengupil
- Menggaruk rambut kepala
- Makan dan minum di laboratorium
- Menggunakan kosmetik
- Memipet dengan mulut
- Penggunaan aerosol berlebihan



2. Media Mikroorganisme

Definisi

- Suatu bahan yang terdiri dari campuran nutrisi (karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral)

Peranan

- 1) menumbuhkan mikroba,
- 2) isolasi,
- 3) memperbanyak sel,
- 4) pengujian sifat-sifat fisiologi,
- 5) perhitungan jumlah mikroba

2. Media Mikroorganisme

Syarat Media Mikroorganisme

- Mengandung nutrisi yg mudah dimanfaatkan mikrobia
- Mempunyai tekanan osmosis dan pH sesuai dengan pertumbuhan mikrobia
- Harus steril
- Tidak mengandung zat penghambat pertumbuhan mikrobia

2. Media Mikroorganismen

Klasifikasi Media Berdasarkan Konsistensinya

Cair

- Bentuk cair
- Tanpa agar

Padat

- Bentuk padat
- Agar 1,5-2 % (b/v)

Semi solid

- Padat (T rendah)
- Cair (T tinggi)
- Agar 0,75% (b/v)

2. Media Mikroorganisme

Klasifikasi Media Berdasarkan Susunan Kimia

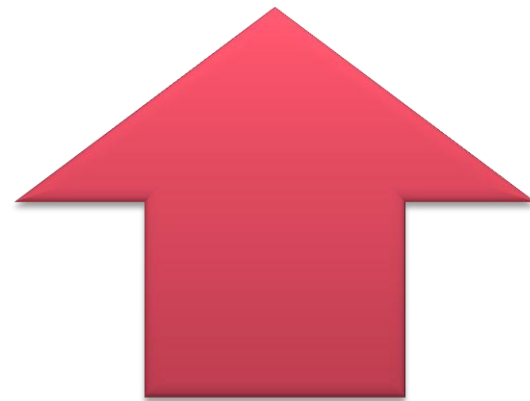
Anorganik

- Medium sintetik
- Bahan anorganik
- Komposisi kimia diketahui pasti

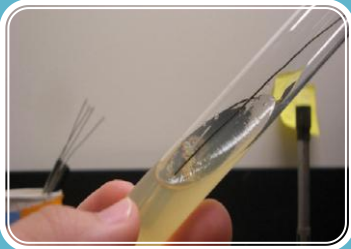


Organik

- Medium non sintetik
- Bahan organik
- Komposisi kimia bervariasi

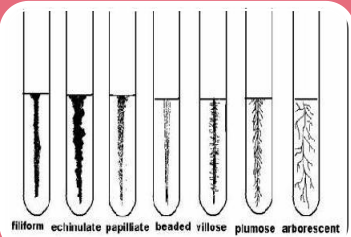


2. Media Mikroorganisme



Agar Miring

- 5-7 mL media steril
- Tabung reaksi berisi media steril dimiringkan



Agar Tegak

- 5-7 mL media steril
- Posisi tabung berisi media ditegakkan



Agar Cawan

- 10-20 mL media steril
- Pour plate atau Streak plate ?

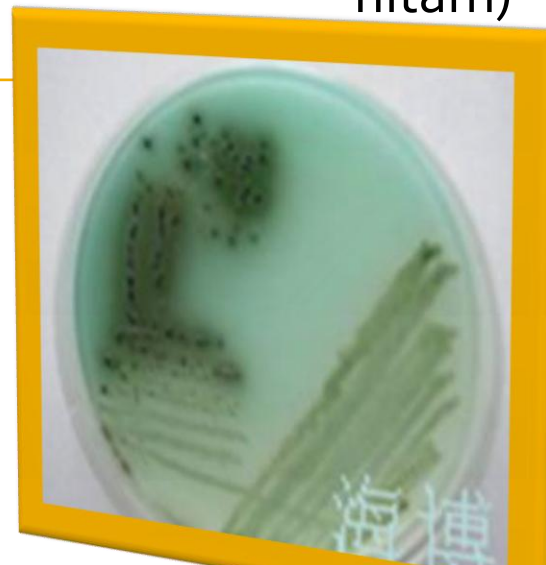
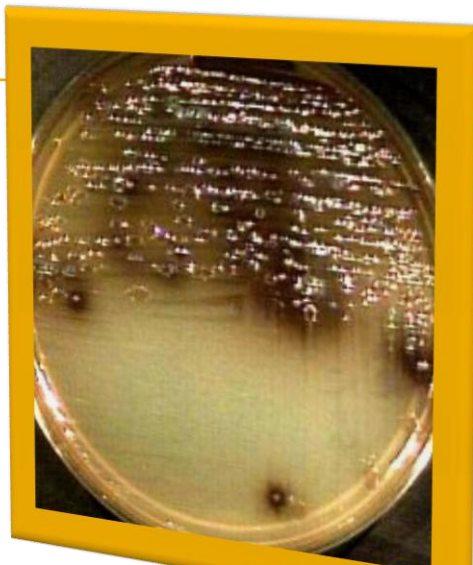
2. Media Mikroorganisme

Jenis Media vs Mikroorganisme

- Berdasarkan *m.o.* yang tumbuh
 - PCA : total m.o
 - NA/NB : bakteri
 - MRSA/MRSB : BAL
 - SSA/BSA : *Salmonella*
 - EMBA/VRBA : *E. coli*
 - PDA/PDB : kapang
 - PGYA/PGYB : khamir

Karakteristik Koloni *Salmonella* sp.

| Organisme | Media selektif | Inkubasi | Penampakan |
|------------|----------------|--------------|---|
| Salmonella | SS Agar | 35°C, jam | 18-24 Keruh atau bening, tidak berwarna (bagian tengahnya berwarna hitam) |



Karakteristik Koloni *Coliform*

| Organisme | Media selektif | Inkubasi | Penampakan |
|---------------------------|----------------|-----------------|---|
| Koliform koloni fekal | EMB agar | 32°C, 24-48 jam | berwarna gelap dengan sinar hijau metalik, diameter 0,5 – 1,5 mm |
| Koliform koloni non fekal | EMB Agar | 32°C, 24-48 jam | berwarna merah muda, diameter 1,0 – 3,0 mm dan tengahnya berwarna gelap seperti mata ikan |
| Escherichia coli | VRB Agar | 37°C, 24-48 jam | Berwarna merah gelap |

Karakteristik Koloni *Coliform*

EMB AGAR



VRB AGAR

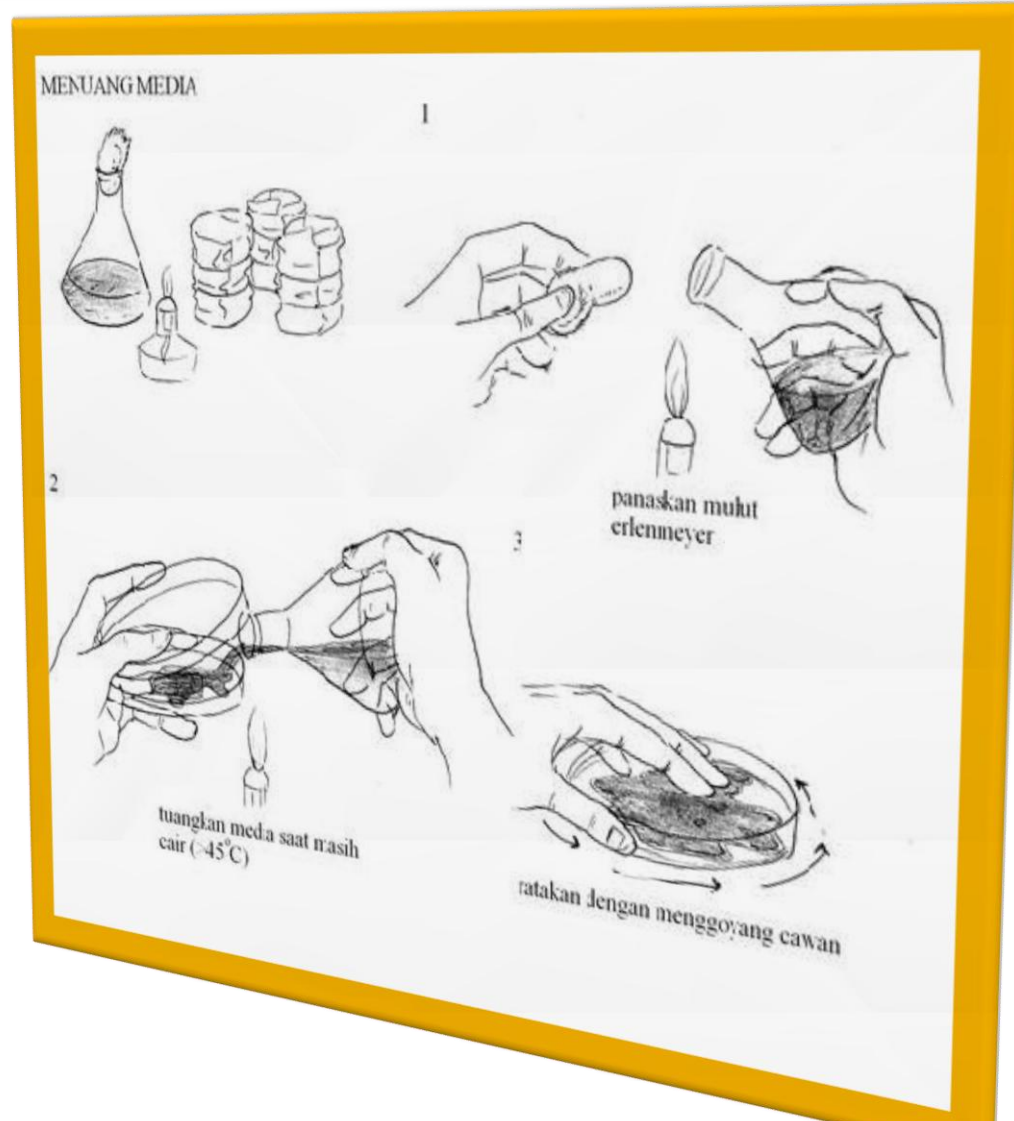


2. Media Mikroorganisme

Tahapan Pembuatan Media

- Menghitung Kebutuhan Media
- Menimbang
- Mencampur bahan-bahan
- Menentukan dan mengatur pH
- Sterilisasi

Cara Penuangan Media



3. STERILISASI ALAT & BAHAN

Definisi :

Proses membebaskan bahan dan alat dari agen kehidupan (mikroorganisme pembusuk dan patogen).

Prinsip Kerja :

Memusnahkan kontaminan mikroorganisme dari suatu bahan / alat dengan cara fisik, mekanik maupun kimia.

Jenis-jenis Metode Sterilisasi

- ***Mekanik***

ex : filtrasi

- ***Fisik***

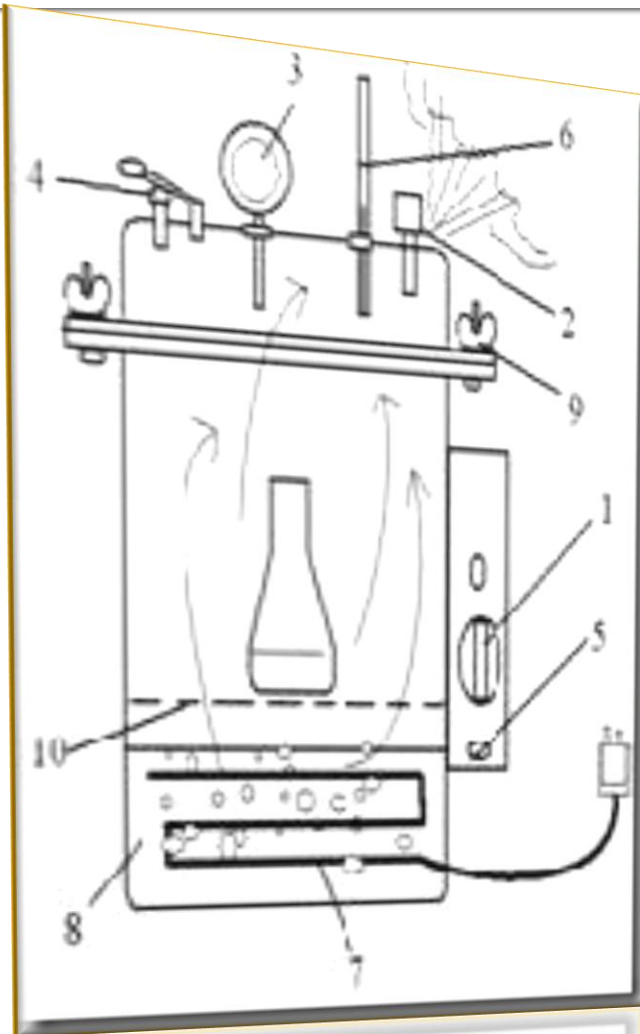
- Pemanasan : api langsung, panas kering, uap air panas, uap air bertekanan

- Penyinaran UV

- ***Kimia***

ex : penggunaan larutan desinfektan

STERILISASI (AUTOKLAF)



1. Tombol pengatur waktu mundur
2. Katup pengeluaran uap
3. Pengukur tekanan
4. Klep pengaman
5. Tombol ON/OFF
6. Termometer
7. Elemen pemanas/heater
8. Media pemanas/aquades
9. Skrup pengunci / pengaman
10. Sarangan/tapisan : batas penambahan aquades

Prosedur Penggunaan Autoklaf

- Cek kondisi air dalam autoklaf
- Tambahkan air destilasi sampai tanda batas
- Peralatan dan bahan dimasukkan.
- Jika mensterilisasi botol bertutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
- Tutup autoklaf (ketika air sudah mulai mendidih)
- Skrup pengaman dikencangkan.
- Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
- Nyalakan autoklaf (tekan tombol ON), suhu dan timer diatur (suhu 121°C selama 15')

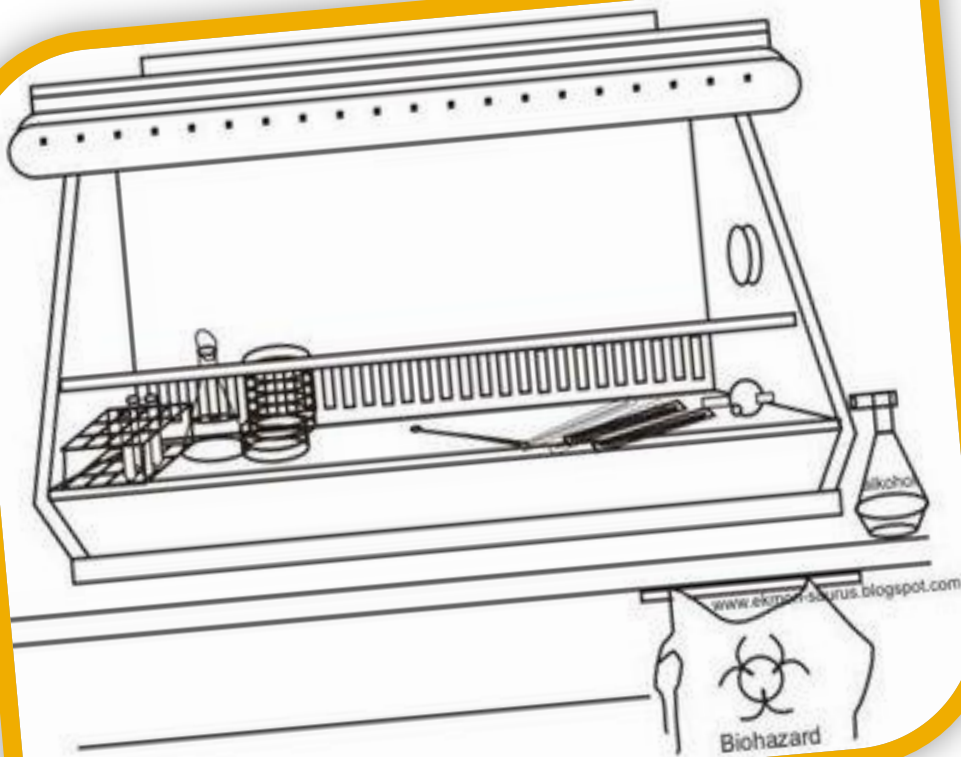
Prosedur Penggunaan Autoklaf

- Penghitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.
- Jika alarm berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun (= tekanan udara di lingkungan)
- Jarum pada pressure gauge menunjuk ke angka nol
- Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.

Hal-hal yang Harus diperhatikan

- Glassware → sterilisasi dengan autoklaf, oven kering
- Media dengan pH <6 dan pH > 8 **sebaiknya tidak disterilisasi dengan autoklaf**
- **Beberapa media atau bahan yang tidak disterilkan dengan autoklaf adalah :**
 - Bahan tidak tahan panas seperti serum, vitamin, antibiotik, enzim.
 - Pelarut organik seperti fenol
 - Buffer dengan kandungan detergen seperti SDS
 - Glukosa, karena berubah warna menjadi coklat

4. PENGGUNAAN LAMINAR AIR FLOW



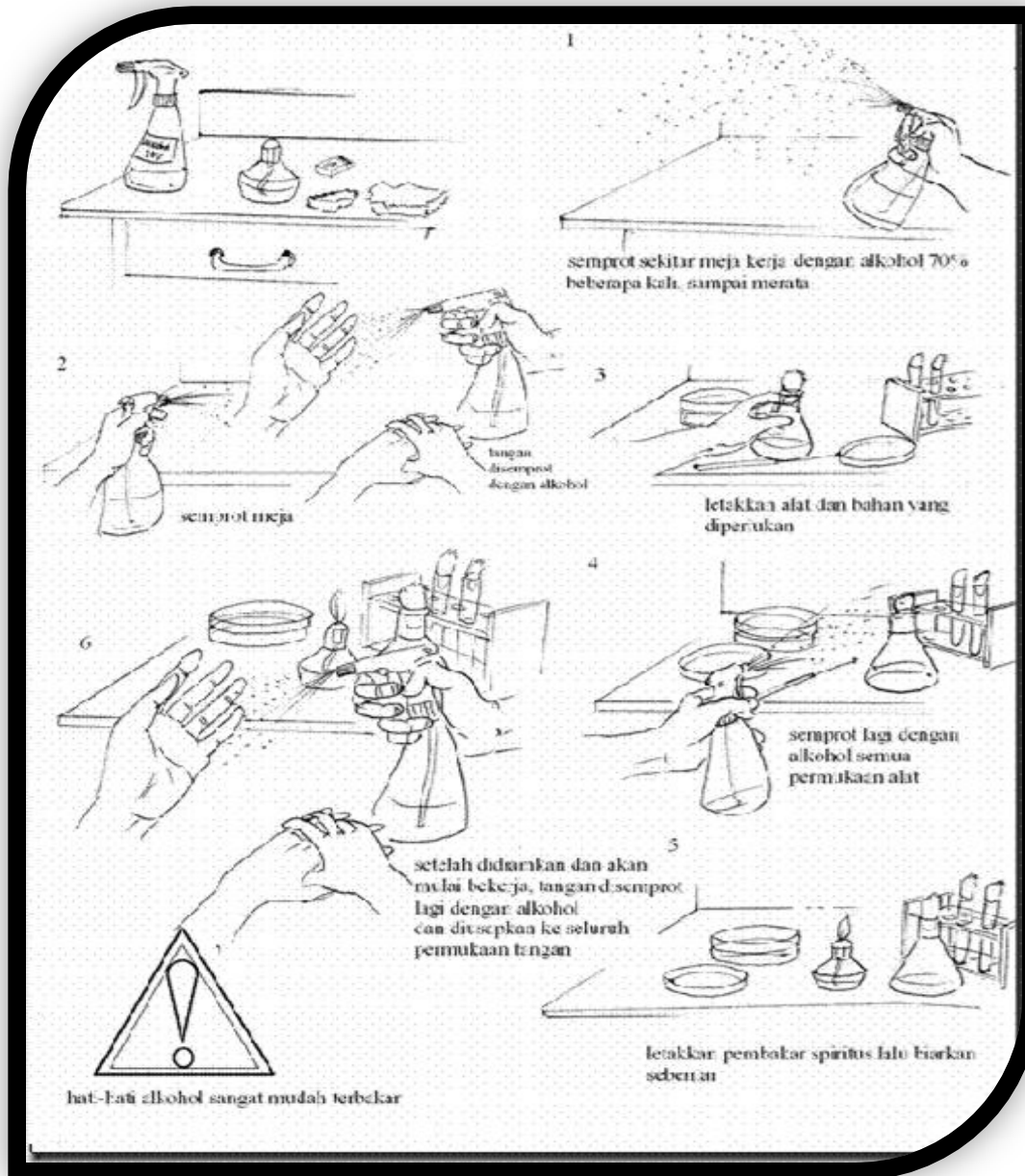
Prosedur Penggunaan LAF

1. Hidupkan lampu UV selama 2 jam
2. Matikan lampu UV sebelum penggunaan LAF
3. Pastikan kaca penutup terkunci dan pada posisi terendah
4. Nyalakan lampu neon dan blower. Biarkan selama 5 menit
5. Cuci tangan dengan sabun gemisidal / alkohol 70%
6. Usap permukaan interior LAF dengan alkohol 70% atau desinfektan yang cocok dan biarkan menguap

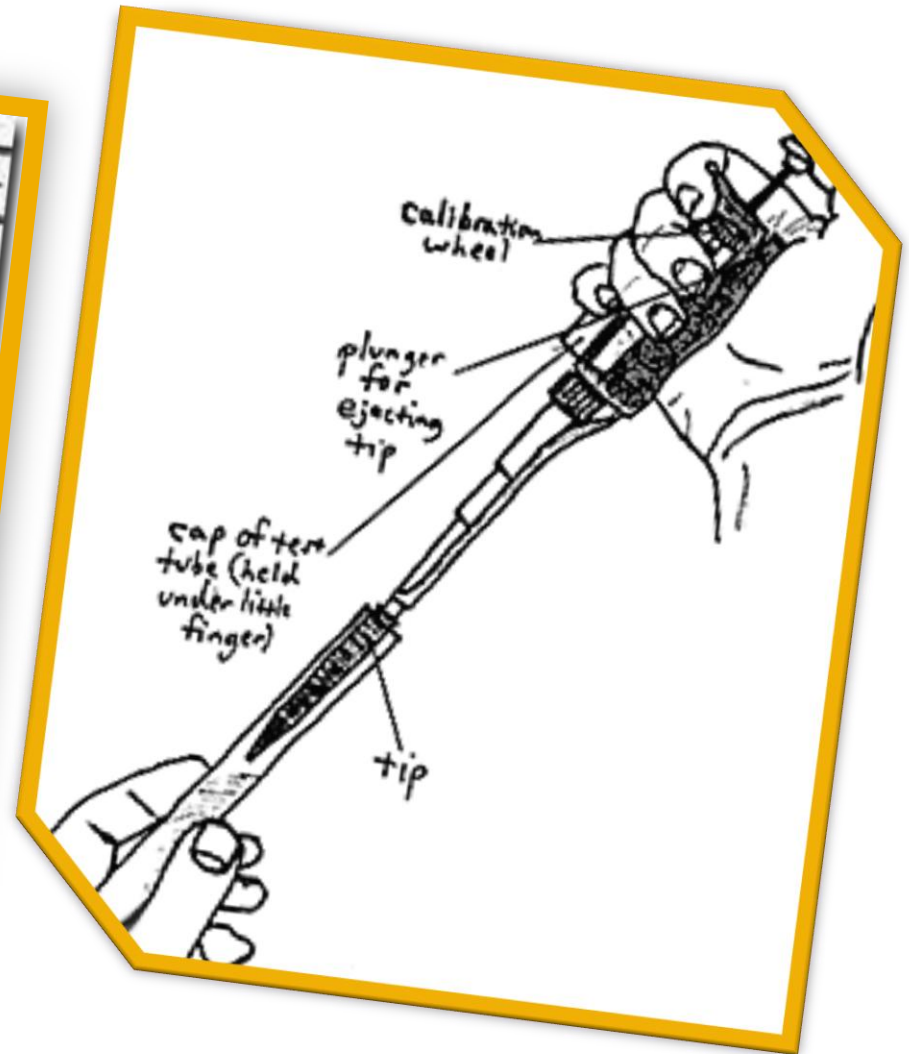
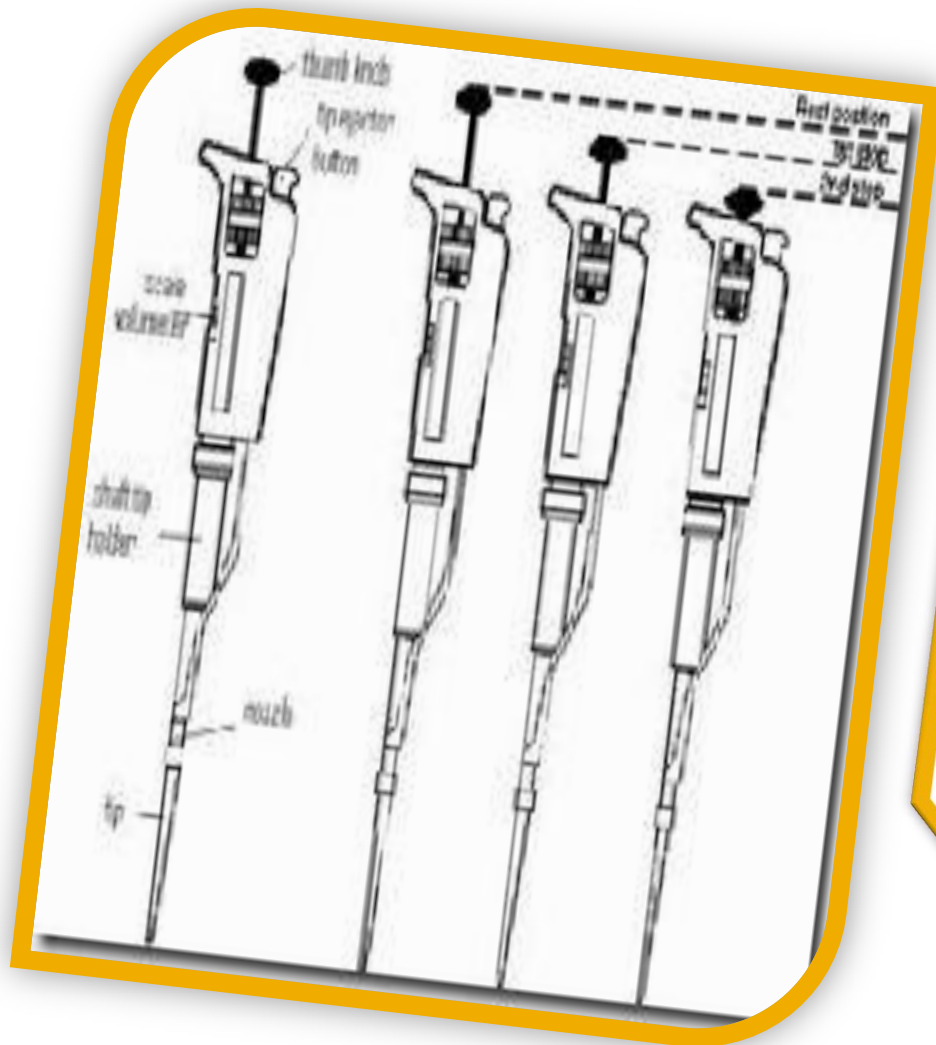
Prosedur Penggunaan LAF

7. Masukkan alat dan bahan yang telah steril
8. Atur alat dan bahan di dalam LAF
9. Kerja secara aseptis dan jangan sampai pola aliran udara terganggu oleh aktivitas kerja
10. Setelah selesai : usap permukaan interior LAF dengan alkohol 70%
11. Biarkan menguap lalu tangan dibasuh dengan desinfektan
12. Matikan lampu neon dan blower

Teknik Aseptis Bekerja di LAF



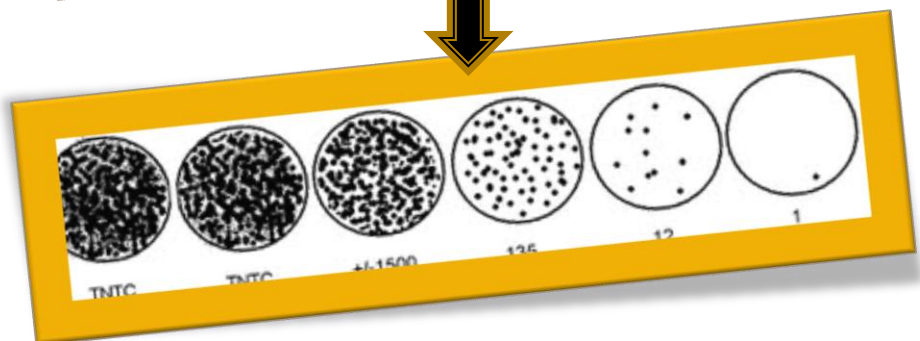
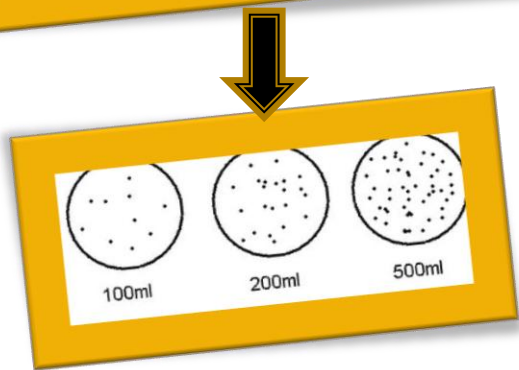
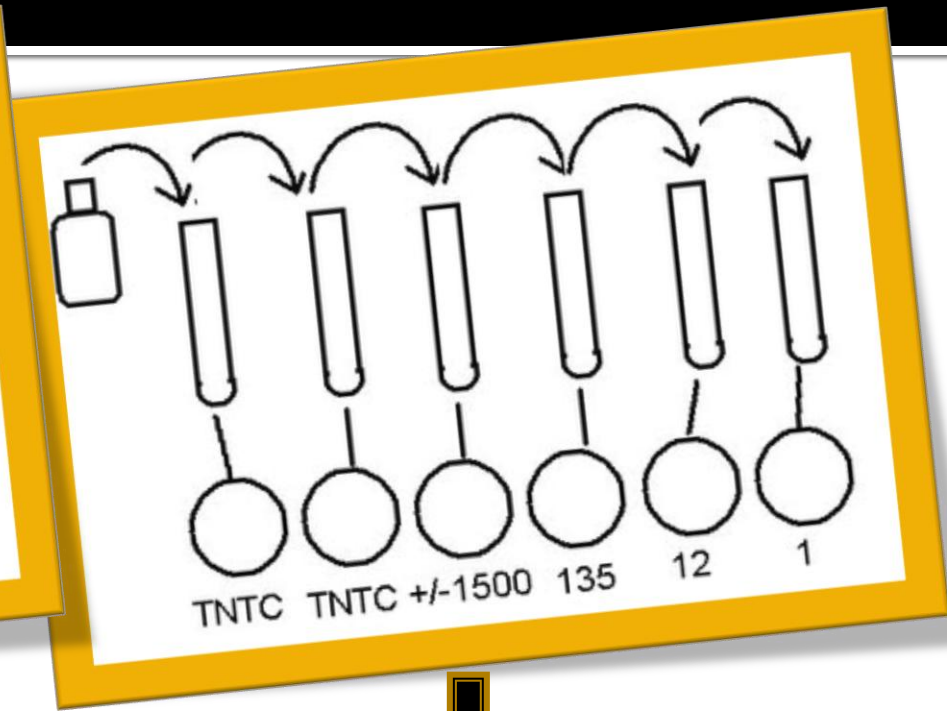
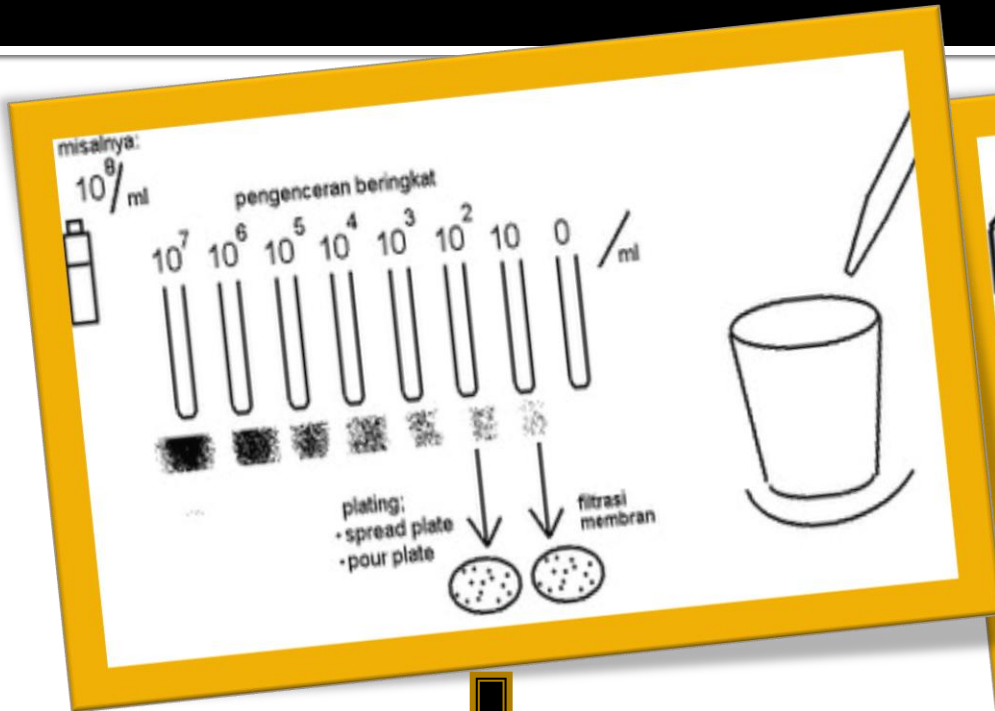
5. PENGGUNAAN MIKROPIPET



Prosedur Penggunaan Mikropipet

1. Perhatikan jenis mikropipet (2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 1000) μL
2. Mengatur ukuran volume sampel yg akan diambil
3. Memasang tip secara aseptis
4. Tekan *thumb knob* mikropipet dengan ujung ibu jari hingga hentakan ke-1
5. Masukkan tip ke dalam cairan sampel, tahan mikropipet pd posisi vertikal, lepas ujung ibu jari perlahan hingga sampel masuk ke dlm tip
6. Keluarkan sampel cairan ke tempat penampung dengan menekan *thumb knob* dengan ibu jari hingga hentakan ke-2
7. Kembalikan pengatur volume sampel ke posisi semula

6. SERI PENGECERAN



“ Semakin tinggi tingkat pengenceran semakin sedikit m.o yang teramati “

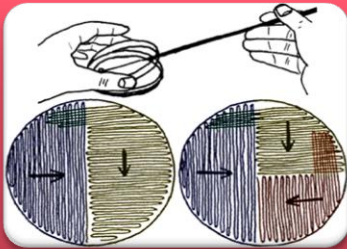
Prosedur Pengenceran

- Siapkan larutan pengencer @ 9 ml ke dalam tabung reaksi
- Sterilisasi dan dinginkan
- Beri label pada tabung berisi larutan steril
- Sampel cairan awal (10^0) → diambil 1 mL
- Sampel padat (timbang ± 5 g)
- Sampel padat + 45 ml pepton / garfis / aquades steril) → ambil 1ml
- 1 ml sampel (cair) + 9 mL larutan pengencer steril (10^{-1})
- Buatlah pengenceran (s/d 10^{-n})

Prosedur Pengenceran

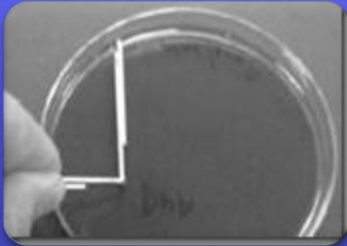


7. TEKNIK ISOLASI



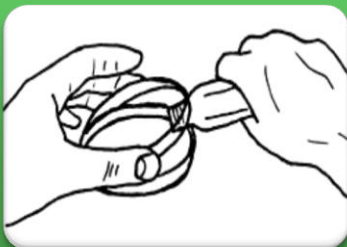
Streak Plate

- Kultur / sampel digoreskan ke media agar
- Alat yang digunakan ose / jarum



Spread Plate

- Kultur / sampel disebar ke dalam media agar
- Alat yang digunakan triangel /hockey glass



Pour Plate

- Kultur / sampel dituang ke petri → + media agar
- Petri berisi media & sampel → diratakan

Teknik Isolasi

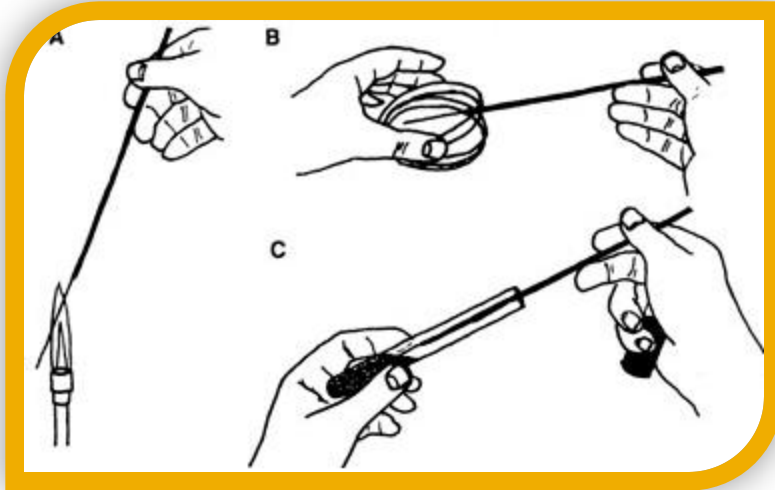
SPREAD PLATE



POUR PLATE

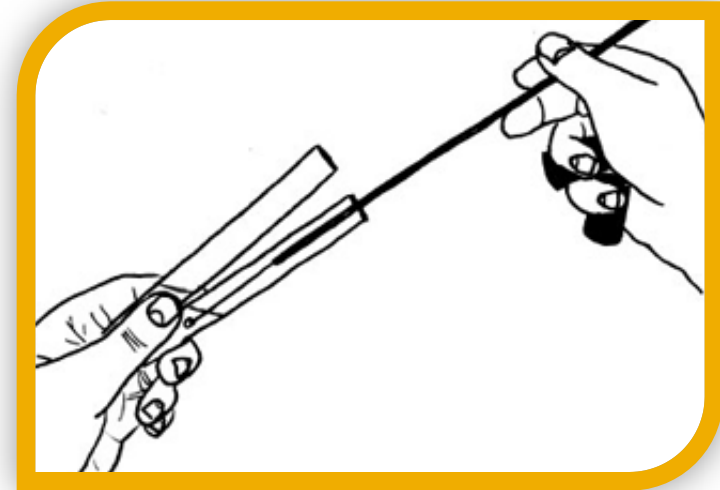


TEKNIK TRANSFER KULTUR



Transfer kultur dari agar ke agar

- A. Panaskan ose/loop dengan api bunsen
- B. Ambil satu ose biakan kultur dari agar plate
- C. Goreskan ke media agar miring



Transfer kultur dari cair ke cair

1. Panaskan ose/loop dengan api bunsen
2. Ambil satu ose biakan kultur dari medium cair
3. Pindahkan ke medium cair baru

MEMINDAHKAN BIAKAN DARI CAWAN



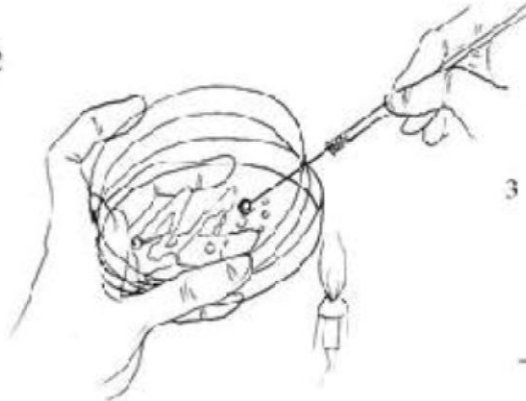
1



pijarkan
jarum
inokulum dan
dinginkan

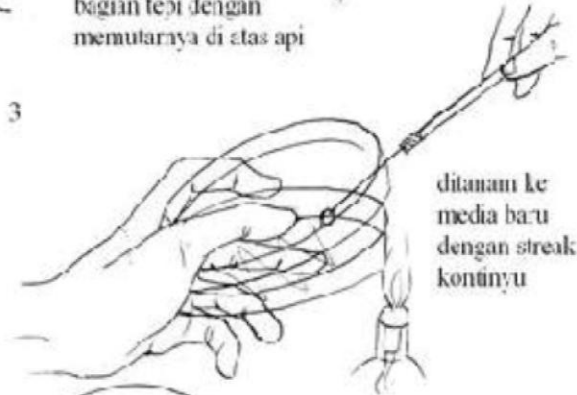
bakar mulut cawan
bagian tepi dengan
memutaranya di atas api

2



buka mulut cawan, ambil koloni tunggal
dengan menempelkan jarum inokulum
loop

3



ditanam ke
media baru
dengan streak
kontinyu

4

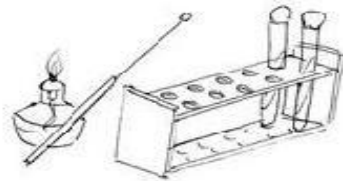


panaskan
mulut
cawan lagi



panaskan lagi jarum inokulum

MEMINDAHKAN BIAKAN SECARA ASEPTIS



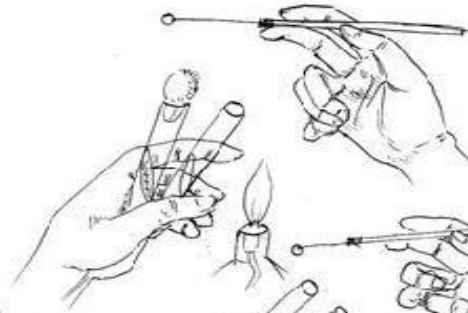
kerja selalu dekat dengan api

1



ujung sampai pangkal dibakar hingga memijar dan tunggu dingin

2



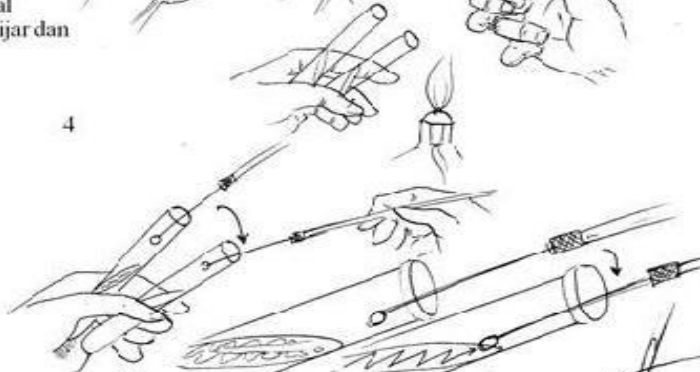
buka tutup kedua tabung

3



bakar mulut tabung supaya kontaminan mati

4



ambil satu ulasan

streak zig-zag

5



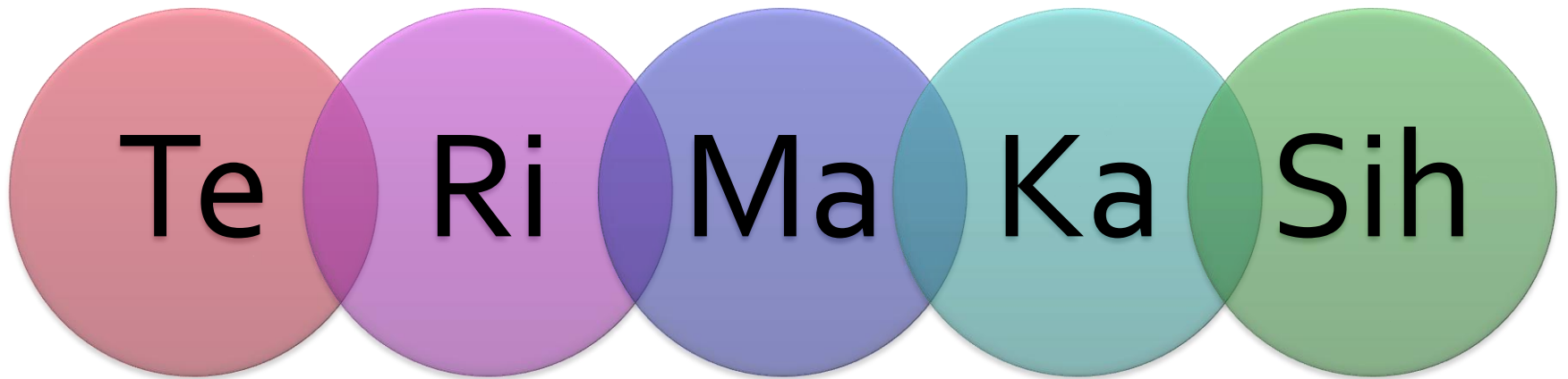
bakar lagi agar kontaminan dari proses transfer hilang

6



tutup kedua tabung

bakar jarum inokulum untuk membunuh bakteri sisa



Te

Ri

Ma

Ka

Sih