

Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba

Muhammad Machmud

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

Techniques for Conservation and Storage of Microbes. *Muhammad Machmud.* Microbiologists need to keep their microbial culture collections for different purposes. Therefore, they have to conserve and store their collections in order to maintain survival and genetic stability of the microbes. In this paper, the term microbes is synonymy to microorganisms including viruses, bacteria, fungi, nematodes, yeast, algae, and protozoa, that are saprophytic, epiphytic, parasitic, antagonistic, and pathogenic. Based on the period and objective, the microbial conservation and storage were distinguished into (1) short-term, for a short period of time, such as from isolation until correct identification is done; (2) intermediate-term, such as the duration of a research project, and (3) long-term, for collection, conservation, or research references. The life duration of a microbial isolate is affected by several factors such as the microbial characters, composition, and pH of the medium, aeration, relative humidity, and temperature of the storage. Therefore, there are various different techniques for conservation and storage of the microbial cultures. Generally, the microbiologists agree that the preferred techniques for long-term conservation and storage of microbes are freeze drying or lyophilization technique and cryogenic technique. However, not all laboratory are accessible to facilities for those techniques. Alternative techniques need to be used without reducing the success of the objective of the microbial conservation and storage. This paper is a brief review of general techniques for conservation and storage of microbial cultures with more emphasize on bacteria.

Key words: Conservation, storage, microbes

Indonesia yang terletak di daerah tropik merupakan sumber biodiversitas yang luas, termasuk mikrobanya, baik yang merugikan maupun yang berguna bagi pertanian. Mikroba tersebut, di samping beragam jenisnya juga sangat mudah mengalami perubahan sifat sehingga menjadi strain baru yang berbeda dengan aslinya. Hal ini menambah cepat tumbuh dan berkembangnya biodiversitas tersebut. Dalam melaksanakan kegiatan ilmiahnya, para pakar mikrobiologi dan pakar ilmu yang terkait seperti pakar fitopatologi dan entomologi perlu mempunyai koleksi plasma nut-fah mikroba, baik untuk digunakan sehari-hari, untuk jangka menengah, maupun jangka panjang. Oleh karena itu, perlu melakukan koleksi, menyimpan, dan memelihara mikroba dengan baik.

Para ilmuwan tersebut perlu memiliki metode pembuatan dan penyimpanan koleksi (preservasi)

yang sesuai untuk menjaga agar biakan mikroba tetap hidup, ciri-ciri genetiknya tetap stabil dan tidak berubah, serta hemat biaya dan tenaga. Metode yang dipilih sangat tergantung pada sifat mikroba dan tujuan preservasi. Sifat mikroba tercermin dalam (1) ciri-ciri morfologi mikroba yang beragam (virus, bakteri, jamur, nematoda, algae, khamir, dan protozoa), (2) ciri-ciri fisiologi dan biokimia mikroba, dan (3) kemampuan mikroba bertahan hidup baik dalam lingkungan alaminya maupun lingkungan buatan.

Tujuan koleksi dan preservasi meliputi tujuan jangka pendek dan jangka panjang. Preservasi jangka pendek dilakukan untuk keperluan rutin penelitian yang disesuaikan dengan kegiatan program atau proyek tertentu. Preservasi jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi plasma nut-fah mikroba, sehingga apabila suatu saat diperlukan, dapat diperoleh kembali atau dalam keadaan tersedia. Dalam kaitannya de-

ngan pemanfaatan koleksi mikroba, tujuan koleksi dan preservasi mikroba dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu untuk keperluan (1) pribadi atau lembaga non-komersial dan (2) lembaga dan swasta komersial.

Keberhasilan pembuatan koleksi plasma nut-fah mikroba tergantung pada tiga faktor, yaitu (1) penguasaan teknologi, (2) ketersediaan fasilitas preservasi, dan (3) ketersediaan tenaga terampil, tekun, dan rutin.

Penentuan teknik penyimpanan atau pengawetan mikroba memerlukan penelitian yang rumit, jangka waktu lama, dan pemantauan, serta dana yang besar. Hal ini berkaitan dengan tujuan utama preservasi, yaitu (1) mereduksi atau mengurangi laju metabolisme dari mikroorganisme hingga sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitas (daya hidupnya) dan (2) memelihara sebaik mungkin biakan, sehingga diperoleh angka perolehan (*recovery*) dan kehidupan (*survival*) yang tinggi dengan perubahan ciri-ciri yang minimum. Namun demikian, saat ini berbagai teknik preservasi untuk berbagai mikroba telah tersedia dalam berbagai buku acuan, sehingga penggunanya tinggal mengadopsi teknologi tersebut sesuai dengan kebutuhannya.

Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan mendinginkan secara berkala jangka pendek misalnya sebulan sekali dari media lama ke media baru. Teknik ini memerlukan waktu dan tenaga yang banyak. Beberapa teknik penyimpanan sederhana yang efektif untuk penyimpanan isolat jangka pendek atau menengah, dan biasanya tidak sesuai untuk penyimpanan jangka panjang. Di antara teknik tersebut ialah penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manik-manik porse-

lin, lempengan gelatin, dan P_2O_5 dalam keadaan vakum. Walaupun tidak digunakan secara luas, teknik tersebut hanya memerlukan peralatan yang sederhana dan mudah diperoleh, sehingga dapat bermanfaat bagi lembaga yang belum memiliki peralatan canggih (Skerman, 1973).

Metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan ialah metode liofilisasi atau kering beku (*liophylization* atau *freeze drying*) dan kriopreservasi (*cryopreservation* atau *cryogenic preservation*) (Clark, 1976; Ashwood-Smith dan Farrant, 1980). Kedua teknik tersebut dilaporkan paling berhasil untuk penyimpanan jangka panjang berbagai mikroba. Kendala utamanya adalah tidak semua laboratorium mempunyai peralatan tersebut.

Tahapan dalam pembuatan koleksi dan preservasi plasma nutfah mikroba pada dasarnya sama, yaitu meliputi koleksi contoh mikroba, isolasi (pemurnian), dan karakterisasi isolat, preservasi, pemeliharaan dan pembuatan bank data.

Pembuatan koleksi plasma nutfah mikroba di lingkup Badan Litbang Pertanian sudah dimulai dengan koordinasi Dr. Sukardi dari Balai Penelitian Veteriner (Balitvet), Bogor. Pembuatan koleksi mikroba skala lebih terbatas perlu dilakukan guna meningkatkan kelancaran pelaksanaan dan mempermudah pengelolannya. Berdasarkan pertimbangan tersebut perlu dibuat koleksi mikroba di lingkup Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan (Puslitbangtan), khususnya mikroba yang merugikan dan bermanfaat bagi peningkatan produksi tanaman pangan.

TEKNIK PENYIMPANAN DAN PEMELIHARAAN

Peremajaan Berkala

Peremajaan dengan cara memindahkan atau memperbaiki biakan mikroba dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali. Teknik ini merupakan cara paling tradisional yang digunakan peneliti untuk memelihara koleksi isolat mikroba di laboratorium. Cara ini juga digunakan untuk penyimpanan dan pemeliharaan isolat mikroba yang belum diketahui cara penyimpanan jangka panjangnya. Peremajaan berkala tidak dianjurkan untuk penyimpanan jangka panjang. Teknik ini mempunyai berbagai kendala, di antaranya (1) kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian, (2) peluang terjadinya kontaminasi, dan (3) terjadi kekeliruan pemberian label. Kendala tersebut memberi peluang yang lebih besar terjadinya kehilangan isolat dibandingkan dengan teknik lain. Meskipun demikian, banyak bakteri dan jamur yang dapat bertahan hidup dalam tabung agar miring yang tertutup rapat hingga sepuluh tahun atau lebih, baik di dalam suhu ruang maupun di kulkas.

Penyimpanan dalam Akuades Steril

Beberapa jenis bakteri, 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. Tidak semua bakteri dapat disimpan dengan baik menggunakan cara ini, misalnya pada anggota genus *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, dan *Curtobacterium*. Pada kondisi penyimpanan ini bakteri yang disimpan masih berpeluang tumbuh dengan lambat, sehingga tidak dapat dijamin stabilitas genetiknya untuk jangka panjang. Penyimpanan de-

ngan cara ini juga memungkinkan terjadinya kontaminasi. Oleh karena itu, cara ini lebih dianjurkan sebagai alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping penyimpanan jangka panjang (De Vay dan Schnathorst, 1963; McGinnis *et al.*, 1974)

Tahap penyimpanan mikroba dalam akuades steril adalah sebagai berikut:

1. Akuades steril disiapkan dalam botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml, 5-10 ml/botol (Sly, 1983) atau dalam tabung ependorf (Machmud, 1996 tidak dipublikasi).
2. Mikroba yang akan disimpan ditumbuhkan dalam bentuk biakan murni pada medium agar miring yang sesuai.
3. Biakan bakteri berumur 24-48 jam disimpan dengan beberapa cara seperti:
 - a. menambahkan 3-5 ml akuades steril ke dalam biakan miring, mengocok tabung hingga diperoleh suspensi pekat bakteri (10^8 - 10^9 sel/ml), dan memindahkan 1 ml suspensi ke dalam tiap botol yang berisi air steril.
 - b. memindahkan satu ose biakan miring bakteri ke dalam tabung reaksi berisi 3-5 ml akuades steril, tabung dikocok hingga suspensi merata, dan memindahkan 1 ml suspensi ke dalam tiap botol yang berisi air steril.
 - c. memindahkan satu ose biakan miring bakteri langsung ke dalam tiap botol yang berisi air steril dan mengocok hingga merata.
4. Botol ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang atau suhu 10-15°C.
5. Uji viabilitas mikroba dan pemeliharaan stok isolat dilakukan secara rutin.

6. Penumbuhan kembali biakan di-lakukan dengan mengambil bo-tol dari tempat penyimpanan, mengocok, dan mengambil satu ose suspensi dan menumbuh-kan pada medium cair atau langsung pada medium agar yang sesuai.

Penyimpanan dalam Minyak Mineral

Salah satu cara sederhana untuk memelihara biakan bakteri, khamir dan jamur adalah dengan cara menyimpan dalam tabung agar miring dan menutup dengan minyak mineral atau parafin cair. Dasar teknik penyimpanan ini adalah mempertahankan viabilitas mikroba dengan mencegah pengering-an medium, sehingga waktu pere-majaan dapat diperpanjang hingga beberapa tahun. Beberapa jenis jamur dapat bertahan hidup sampai 20 tahun. Daya tahan hidup mikro-ba lebih baik apabila biakan disim-pan pada suhu kulkas (4°C).

Mikroba yang akan dipelihara ditumbuhkan pada tabung berisi medium agar miring atau medium cair (*broth*) yang sesuai, kemudian permukaan biakan ditutup dengan minyak mineral steril setinggi 10-20 mm dari permukaan atas medium. Teknik ini sederhana, tetapi kurang praktis untuk ditransportasi. Di samping itu, keberadaan minyak mineral mengakibatkan peremajaan menjadi kotor.

Cara penyimpanan dalam minyak mineral menurut Elliot (1975) adalah sebagai berikut:

1. Penyediaan tabung reaksi dengan tutup berdrat atau botol McCartney berisi medium agar miring yang sesuai untuk mikroba yang akan dipelihara.
2. Penyediaan minyak mineral atau parafin cair steril, diautoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit.

3. Menumbuhkan mikroba yang akan disimpan dalam tabung agar miring selama 24-48 jam dan memeriksa kemurnian biak-an untuk menghindari kontami-nasi.
4. Setelah mikroba tumbuh baik, parafin cair steril dimasukkan ke dalam botol secukupnya, sehingga permukaan parafin atas berada 10-20 mm di atas permukaan medium agar.
5. Botol biakan yang telah diberi parafin cair disimpan pada suhu ruang atau di kulkas.
6. Uji viabilitas mikroba dan pemeliharaan isolat dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
7. Penumbuhan kembali (*recovery*) mikroba (bakteri, khamir) dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik sebagian biakan dari tabung, memindahkan dan mensuspensikan pada medium cair. Minyak mineral mengapung di permukaan suspensi dan sebagian suspensi digoreskan pada medium agar yang sesuai. Biakan jamur digoreskan langsung pada medium agar.

Penyimpanan dalam Tanah Steril

Banyak bakteri dan jamur yang dapat bertahan hidup dengan baik pada tanah kering yang disimpan pada suhu ruang untuk waktu yang lama, hingga 20 tahun atau lebih. Teknik penyimpanan mikroba pada tanah kering terutama berguna untuk fungi, *Streptomyces* spp., dan bakteri yang membentuk spora seperti *Bacillus* spp. dan *Clostridium* spp. *Rhizobium* spp. juga dapat disimpan dengan baik dengan cara ini (Jensen, 1961; Vincent 1970). Teknik ini mempunyai beberapa keuntungan, yaitu biaya murah, penyimpanan pada suhu ruang, dan stabilitas genetik mikroba dapat dipertahankan.

Cara penyimpanan dalam tanah steril adalah sebagai berikut:

1. Diambil tanah yang agak liat, dikering anginkan dan diayak untuk memisahkan partikel tanah yang agak besar dan membuang sisa-sisa tanaman.
2. Tanah yang sudah kering dan diayak dimasukkan ke dalam tabung atau botol dengan tutup berdrat ukuran 25 ml hingga 1 cm dari permukaan tutup.
3. Tabung atau botol yang berisi tanah diberi akuades steril hingga kebasahan 50% kapasitas lapang, kemudian diautoklaf pada suhu 121°C tiga kali berturut-turut selama tiga hari masing-masing selama satu jam.
4. Bilamana diperlukan, sterilitas tanah diuji dengan menumbuhkan contoh tanah pada medium agar.
5. Selanjutnya, botol dioven kering pada suhu 105°C selama satu jam dan setelah dingin disimpan di dalam desikator hingga digunakan.
6. Suspensi mikroba yang akan disimpan (sel, spora atau konidia, miselia) dibuat dalam larutan steril pepton 2% dalam akuades.
7. Suspensi mikroba (0,1 ml) diambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tiap botol yang telah disiapkan.
8. Botol dikembalikan ke desikator untuk disimpan di dalamnya atau setelah kering diambil dan disimpan di ruangan.
9. Mikroba yang disimpan diuji viabilitasnya setiap tahun dengan menumbuhkan pada medium agar.
10. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik sebagian contoh tanah dari botol penyimpanan, memindahkan ke medium cair diikuti dengan menggoreskan suspensi medium cair

pada medium agar yang sesuai atau langsung dengan menumbuhkan contoh tanah pada medium agar.

Penyimpanan dengan Manik-manik Porselin

Cara sederhana lain untuk pemeliharaan berbagai jenis mikroba adalah mengeringkan suspensi sel pada manik-manik porselin (*porcelain beads*) atau gelas (*glass beads*) menggunakan gel silika sebagai pengering (Norris, 1963). Selapis gel silika diletakkan di alas botol dengan tutup berdrat, kemudian di atasnya ditutup dengan lapisan kapas atau *slag wool* dan di atasnya diletakkan manik-manik porselin atau kaca yang diimpregnasi dan telah dicelupkan dalam suspensi mikroba yang akan disimpan. Kelembaban yang ada pada manik-manik diserap oleh gel silika yang ada di bawahnya. Kelebihan gel silika juga berfungsi menjaga kekelembaban udara di dalam botol.

Prosedur penyimpanan dan pemeliharaan dengan manik-manik porselin adalah sebagai berikut:

1. Gel silika (berwarna biru bila kering dan ungu bila lembab) sebanyak 3-4 g dimasukkan ke dalam botol tutup berdrat ukuran 25 ml.
2. Di atas gel silika dilapisi kapas atau *slag wool* setebal 1 cm agar tidak bergerak tetapi tetap berpori.
3. Di atas lapisan kapas diletakkan 20-50 manik-manik porselin atau gelas yang diimpregnasi (No. 2).
4. Botol dibuka tutupnya dan disterilkan dengan oven kering suhu 160°C selama 1-2 jam. Tutup botol karena berlapis karet disterilkan dengan autoklaf, suhu 121°C selama 15 menit, kemudian di oven kering dengan suhu 100°C selama 1

jam, dan setelah dingin ditutupkan ke botolnya secara aseptik.

5. Mikroba yang akan disimpan di biakkan 24-48 jam dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml medium cair yang sesuai.
6. Manik-manik porselin dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi biakan mikroba dan kelebihan suspensi bakteri dibuang.
7. Manik-manik yang basah oleh suspensi bakteri dikembalikan ke dalam botol dan ditutup rapat. Sebagian gel silika di dalam botol akan berubah warna menjadi merah jambu, sedangkan sisanya tetap berwarna biru. Apabila seluruh gel silika berubah warna menjadi merah jambu, hendaknya botol tidak digunakan.
8. Botol yang berisi mikroba disimpan pada suhu ruang atau di kulkas.
9. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
10. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu manik-manik botol penyimpanan, memindahkannya ke medium cair atau dengan menggosokkan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu optimal.

Menurut Leben dan Slesman (1982) penyimpanan dengan manik-manik porselin dapat diganti dengan butiran gel silika.

Penyimpanan Menggunakan Lempengan Gelatin

Teknik penyimpanan ini sederhana, tetapi sangat efektif untuk penyimpanan bakteri. Mula-mula teknik ini dilaporkan oleh Stamp pada tahun 1947 (Sly, 1983; Klement, 1990) untuk penyimpanan jangka panjang bakteri. Tetapi saat ini sa-

ngat sedikit data tentang keefektifan penyimpanan dan daya tahan hidup bakteri dalam penyimpanan, sehingga teknik ini perlu diuji lebih lanjut.

Tahapan teknik penyimpanan dengan lempengan gelatin adalah sebagai berikut:

1. Sepuluh mililiter lilin (*paraffin wax*) disterilkan dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Sebagai pengganti lilin dapat juga digunakan kertas lilin (Lapage *et al.*, 1970a) atau cairan silikon (Sly, 1983) yang ditempatkan pada alas cawan petri.
2. Biakan bakteri umur 24-48 jam disediakan dan dibuat suspensi pekat bakteri (10^8 - 10^9 sel/ml) dalam medium gelatin nutrisi 10% yang mengandung 0,25% asam askorbat.
3. Suspensi bakteri dalam medium gelatin nutrisi diteteskan secara aseptik menggunakan pipet Pasteur steril pada permukaan lilin atau kertas lilin di dalam cawan petri. Setiap petri dapat ditetesi beberapa tetes suspensi.
4. Cawan petri yang telah diberi tetesan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam desikator vakum yang berisi P_2O_5 dan dievakuasi hingga tetesan menjadi kering dan berupa lempengan gelatin.
5. Lempengan gelatin diambil secara aseptik menggunakan pinset dan dipindahkan ke dalam botol steril dengan tutup berdrat 5-10 lempengan/botol. Botol-botol yang berisi lempengan gelatin disimpan dalam wadah yang berisi P_2O_5 pada suhu 4°C.
6. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
7. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu lempengan gelatin dari botol penyimpanan, memindahkannya

ke medium cair, kemudian menggoreskan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai, serta menginkubasikan pada suhu optimal untuk pertumbuhan mikroba.

Penyimpanan Menggunakan Potongan Kertas Filter

Teknik penyimpanan ini mirip teknik penyimpanan dengan lempengan gelatin. Sebagai pengganti lempengan gelatin digunakan bundaran potongan kertas filter steril. Teknik ini juga sederhana dan mudah, tetapi sangat efektif untuk penyimpanan bakteri. Namun demikian, data tentang keefektifan penyimpanan dan daya tahan hidup bakteri dalam penyimpanan masih sedikit, sehingga perlu diteliti lebih lanjut.

Tahapan teknik penyimpanan bakteri menggunakan potongan kertas filter menurut Sly (1983) adalah sebagai berikut:

1. Mikroba yang akan disimpan di biakkan pada medium yang sesuai.
2. Suspensi pekat bakteri (10^8 - 10^9 sel/ml) dibuat dalam larutan pepton 1%, susu skim 1%, atau Na-glutamat 1%.
3. Bundaran kertas steril dibuat dengan alat pelubang kertas, dimasukkan ke dalam botol kecil ukuran 10 ml dengan tutup berdrat, 25-50 bundaran kertas filter/botol. Botol disterilkan dengan oven 105°C selama 1 jam.
4. Beberapa tetes suspensi mikroba dimasukkan secara aseptik ke dalam botol yang berisi kertas filter hingga menjadi jenuh air.
5. Isi botol dikering-vakumkan menggunakan alat *vaccum freeze dryer*, kemudian ditutup rapat dan disimpan pada suhu ruang atau di kulkas.

6. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
7. Penumbuhan kembali bakteri dilakukan dengan cara mengambil secara aseptik satu bundaran kertas filter dari botol penyimpanan, memindahkannya ke medium cair, menggoreskan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai, serta menginkubasikan pada suhu optimal untuk pertumbuhan mikroba.

Penyimpanan *In Vacuo* dalam Gas Fosfopentaoksida

Teknik penyimpanan ini disebut juga teknik Sordelli, karena mula-mula ditemukan oleh Sordelli (Lapage *et al.*, 1970b). Biakan mikroba disimpan dalam serum kuda yang ditempatkan dalam tabung gelas kecil atau ampul. Tabung ini ditempatkan di dalam tabung lain yang lebih besar berisi sedikit fosfopentaoksida (P_2O_5) dan disimpan pada suhu ruang atau di kulkas. Teknik ini sesuai untuk penyimpanan jangka panjang bakteri, khamir, dan jamur. Mikroba tersebut dapat bertahan hidup dengan baik selama 5-28 tahun, tergantung pada strain mikroba yang disimpan.

Tahap penyimpanan *in vacuo* dalam senyawa P_2O_5 menurut Sor-delli (Soriano, 1970) adalah sebagai berikut:

1. Mikroba yang akan disimpan di biakkan pada medium agar miring yang sesuai.
2. Suspensi pekat mikroba disediakan dari biakan mikroba menggunakan cairan steril serum kuda dalam tabung steril.
3. Suspensi biakan (0,1-0,5 ml) dimasukkan ke dalam ampul atau botol kecil steril dan ditutup rapat.
4. Ampul atau botol yang berisi suspensi mikroba dimasukkan ke dalam botol yang lebih besar

yang sebelumnya telah diisi P_2O_5 secukupnya

5. Bagian luar tabung besar dipersempit dengan pemanasan api las, kemudian dipasang pada pompa vakum, dievakuasi, dan ditutup dengan pemanasan api las.
6. Tabung yang berisi mikroba disimpan pada suhu ruang atau di kulkas.
7. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.
8. Penumbuhan kembali mikroba dilakukan dengan cara memotong tabung gelas dengan pemotong kaca dan mengambil tabung kecil yang ada di dalamnya. Tabung dibuka dan isinya disuspensikan dengan menambahkan akuades steril atau medium cair, kemudian menggoreskan suspensi medium cair pada medium agar yang sesuai.

Penyimpanan dengan Teknik Kering Beku

Teknik kering beku atau teknik liofilisasi merupakan teknik penyimpanan yang paling populer dan banyak digunakan untuk penyimpanan jangka panjang mikroba. Teknik ini cocok untuk menyimpan berbagai jenis mikroorganisme termasuk virus (Holding dan Lelliott, 1960), bakteri (Sly, 1983), khamir, jamur berspora dan jamur yang tidak berspora, bahkan algae dan protozoa (Clark, 1976). Bagi lembaga koleksi dan pemasok biakan mikroba, teknik ini juga sangat sesuai, karena ampul dalam jumlah besar dapat diproduksi dan dengan mudah disebarluaskan. Banyak biakan mikroba yang disimpan dengan cara ini dapat bertahan hidup hingga puluhan tahun, tetapi beberapa mikroba memerlukan media pengawet tertentu yang sesuai.

Teknik kering beku merupakan teknik yang paling rumit apabila dibandingkan dengan beberapa teknik penyimpanan lain, karena teknik ini memerlukan keterampilan teknis dan modal dasar yang relatif tinggi untuk membeli peralatan pengering beku (*freeze dryer*). Namun, apabila peralatan tersedia, maka teknik ini menjadi sederhana dan sangat memuaskan. Sebenarnya alat pengering beku tidak selalu merupakan alat yang canggih dan mahal, karena peralatan yang sederhana dapat dirakit sendiri dengan mengkombinasikan pompa vakum dan kompresor pendingin. Saat ini berbagai model alat pengering beku dijumpai di pasaran yang harganya terjangkau oleh suatu lembaga penelitian.

Proses kering beku merupakan kombinasi dua teknik penyimpanan jangka panjang yang paling baik, yaitu pembekuan dan pengeringan. Garis besar tahapan proses ini meliputi pembuangan uap air dengan cara sublimasi vakum dari status beku. Sebelum proses pengeringan, teknik ini menggunakan salah satu dari dua cara pembekuan suspensi sel. Pada tahap pembekuan (*pre-freezing*), suspensi sel mikroba dapat dibekukan dengan menambahkan campuran pendingin seperti es kering (*dry ice*) dalam etanol. Alternatif lain adalah pembekuan dengan cara pembekuan sentrifugal, di mana suspensi sel dibekukan dengan cara pendinginan dan peng-uapan pada kondisi vakum, semen-tara ampulnya diputar dengan ke-cepatan rendah untuk menghindari timbulnya buih. Selanjutnya suspen-si beku mikroba di dalam ampul dikeringkan dalam kondisi vakum. Cara ini menghilangkan kendala yang terjadi pada pengeringan biak-an dari kondisi cair. Selanjutnya ampul kering beku dapat disimpan pada suhu ruang di

tempat gelap. Kemampuan bertahan hidup jang-ka panjang mikroba dapat diting-katkan dengan penyimpanan di kul-kas.

Hal yang perlu diperhatikan adalah cairan pengawet (preservatif) yang akan digunakan untuk pembuatan suspensi sel untuk mencegah kerusakan sel hidup pada tahap pembekuan dan pengeringan. Fungsi preservatif adalah menstabilkan protein, mencegah kerusakan akibat pembekuan, dan melindungi dari kekeringan yang berlebihan. Pemilihan preservatif tergantung pada mikroba yang akan disimpan. Senyawa preservatif harus dapat memelihara mikroba dalam kondisi hidup dan memberi peluang untuk dapat ditumbuhkan kembali dengan baik dari kondisi kering. Salah satu preservatif terbaik dan telah digunakan untuk penyimpanan jangka panjang mikroba adalah *mist dessiccants* (Sly, 1983) yang merupakan cairan dengan komposisi pepton Difco 12 g dan glukosa 30 g dalam 100 ml akuades. Beberapa cairan preservatif lain yang sering digunakan ialah larutan pepton 1%, larutan susu skim 1%, larutan N-glutamat 1%, dan larutan campuran serum kuda dengan pepton 10% (Sly, 1983). Uraian yang lebih lengkap mengenai jenis senyawa pengawet diurai-kan secara rinci oleh Greaver (Sly, 1983), Lapage *et al.* (1970a), serta Redway dan Lapage (1974).

Tahap penyimpanan kering beku adalah sebagai berikut:

1. Ampul kosong ukuran 1,0 ml diberi label di dalamnya dengan menuliskan nomor kode strain mikroba pada sepotong kertas filter 3 mm x 20 mm menggunakan pensil, ditutup dengan kapas dan di luar ampul diberi label nomor kode strain menggunakan spidol permanen. Ampul disterilkan dengan oven kering bersuhu 160°C selama satu jam.

2. Strain mikroba yang akan disimpan dibiakkan pada medium yang sesuai hingga pertumbuhan optimum (*log phase*), umumnya 24-48 jam pada suhu ruang.
3. Penyediaan larutan preservatif yang sesuai untuk mikroba yang akan diawetkan.
4. Suspensi pekat strain mikroba 10^8 - 10^9 sel atau konidia/ml dibuat dalam cairan preservatif.
5. Ampul yang telah disterilkan diisi dengan 0,1-0,3 ml suspensi mikroba secara aseptik menggunakan pipet Pasteur atau pipet mikro.
6. Suspensi mikroba dalam ampul dibekukan pada suhu -20 sampai -30°C atau menggunakan *dry ice*.
7. Ampul yang telah dibekukan dengan cepat dilakukan proses kering beku dengan menempelkan pada alat pengering beku. Prosedur kering beku dilakukan sesuai dengan petunjuk pada masing-masing alat.
8. Setelah selesai proses kering beku, ampul dipotong menggunakan api las.
9. Ampul yang sudah dipotong diatur rapi pada kotak penyimpanan ampul.
10. Sebagian ampul diambil sebagai contoh untuk menguji viabilitas mikroba setelah proses kering beku.
11. Pengujian juga dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun, untuk mengetahui viabilitas mikroba.
12. Penumbuhan kembali mikroba:
 - a. Ampul dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan diredam pada suhu 37°C atau dibiarkan beberapa saat pada suhu ruang untuk mencairkan isi ampul (*thawing*).
 - b. Secara aseptik leher ampul dipotong dengan pemotong

- kaca dan dipatahkan.
- c. Beberapa tetes medium cair dimasukkan ke dalam ampul, dibiarkan beberapa saat dan agak dikocok agar biakan cepat larut.
 - d. Sebagian suspensi diambil dan ditumbuhkan pada cawan medium agar yang sesuai.
 - e. Koloni mikroba ditumbuhkan pada medium agar miring.

Penyimpanan dengan Teknik Pengeringan Cairan

Beberapa strain bakteri yang peka terhadap proses kering beku dapat disimpan dengan cara pengeringan suspensi (*liquid drying*) mikroba. Teknik ini dikembangkan oleh Annear pada tahun 1954, 1956, dan 1962 (Sly, 1983) dan berhasil digunakan untuk menyimpan bakteri, khamir, jamur, dan virus. Teknik ini dimodifikasi oleh Banno dan Saka-ne (1979). Keefektifan teknik ini untuk penyimpanan khamir dibuktikan oleh Banno *et al.* (1979).

Tahapan teknik pengeringan cairan adalah sebagai berikut:

1. Ampul steril bertutup kapas dan diberi label kertas filter di dalamnya disediakan seperti untuk penyimpanan dengan teknik kering beku.
2. Suspensi pekat biakan mikroba (10^8 - 10^9 sel/ml) dibuat dalam cairan pengawet seperti larutan *mist dessicant*, pepton 1%, susu skim 1% atau Na-glutamat 1%.
3. Pada tiap ampul dimasukkan 0,1-0,3 ml suspensi mikroba, tutup kapas dipasang dan digunting, kemudian dimasukkan ke dalam ampul hingga leher ampul atau tepat di atas label.

4. Ampul dipasang pada alat pengering beku dan dilakukan proses kering beku. Bilamana perlu bawah ampul dicelupkan dalam air (*waterbath*) 25°C.
5. Sebelum ampul dipotong dianjurkan untuk memasukkan gas nitrogen murni ke dalamnya.
6. Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, paling tidak setiap tahun.

Penyimpanan secara Kriogenik

Virus, bakteriofah, khamir, jamur, beberapa jenis algae, dan protozoa dapat disimpan lama dalam kondisi beku dengan cara reduksi sebagian besar aktivitas atau kecepatan metabolismenya. Mikroba tersebut telah disimpan dalam *freezer* yang bersuhu -20°C dan -70°C. Semakin rendah suhu penyimpanan, semakin kecil peluang kehilangan viabilitasnya. Penyimpanan pada suhu lebih tinggi dari -70°C sebaiknya tidak terlalu lama dilakukan, paling lama setahun.

Penyimpanan mikroba pada suhu sangat rendah (*ultra-low temperatures*) dengan cara pembekuan dalam nitrogen cair yang bersuhu -196°C memberi peluang peneliti menyimpan mikroba menggunakan teknik baku sederhana yang telah dibuktikan keberhasilannya untuk menyimpan berbagai jenis mikroba dan sel mamalia dengan kehilangan viabilitas yang sangat rendah dan stabilitas genetik yang tinggi Moore dan Carlson, 1975). Berbagai jenis bakteri dapat dibekukan langsung dalam medium tumbuhnya, tetapi penambahan senyawa krioprotektan seperti gliserol atau dimethylsulfoxide (DMSO) dapat mengurangi dampak negatif (*stress*) dari pembekuan. Krioprotektan lain yang dapat digunakan adalah meta-nol, gula sakarida, pati, dan polyvi-nyl pyrrolidone (PVP). Beberapa senyawa krioprotektan bersifat toksik dan berdampak

negatif terhadap mikroba, terutama pada saat pem-bekuan dan pencairan biakan yang disimpan. Oleh karena itu, senyawa tersebut perlu diencerkan terlebih dahulu atau dihilangkan sama sekali pada waktu penumbuhan kembali mikroba.

Pembekuan pada proses kriopreservasi sebaiknya dilakukan secara pelan-pelan dan diatur hingga mencapai suhu -0°C atau -40°C, selanjutnya didinginkan dengan cepat hingga mencapai suhu akhir pendinginan (-196°C). Pembekuan dengan cepat dapat berakibat terbentuknya kristal es di ruang antarsel dan ketidakseimbangan elektrolit yang dapat mematikan atau merusak sel. Pencairan biakan mikroba yang disimpan sebaiknya dilakukan dengan cepat. Secara umum, bakteri, khamir, dan jamur lebih tahan terhadap kerusakan pembekuan dibandingkan dengan algae, protozoa atau biak jaringan.

Tahapan teknik kriopreservasi adalah sebagai berikut:

Penyediaan Ampul

Ampul (ukuran 1 ml) yang akan digunakan untuk menyimpan mikroba diberi label di dalamnya dengan potongan kertas filter dan di bagian luarnya juga diberi label dengan menggunakan spidol permanen. Ampul ditutup kertas aluminium dan disterilkan dengan oven kering suhu 160°C.

Penumbuhan Biakan

Biakan mikroba disiapkan seperti pada penyimpanan dengan teknik kering beku. Biakan jamur dapat disediakan dengan cara menginokulasi 0,3 ml medium agar yang sesuai langsung pada ampul dan diinkubasi hingga membentuk spora atau konidia, dengan membuat suspensi spora atau konidia, atau dengan mengambil potongan agar yang ditumbuhi miselia.

Suspensi Sel dalam Medium Preservasi

Menggunakan pipet steril ukuran 5 ml dipindahkan 5 ml medium preservatif misalnya larutan gliserol 5-10% atau DMSO 5% pada biakan miring mikroba. Biakan disuspensikan pada medium preservatif menggunakan pipet Pasteur steril sehingga terbentuk suspensi pekat mikroba. Suspensi mikroba dipindahkan ke dalam ampul yang telah disediakan, 0,3-0,5 ml setiap ampul. Biakan jamur yang telah ditumbuhkan dalam ampul dapat langsung ditambahkan 0,4 ml enceran preservatif.

Penutupan Ampul

Penutupan ampul dilakukan menggunakan penangas api las. Ampul yang telah dipotong, dipak sesuai dengan kebutuhan dan siap untuk disimpan.

Penyimpanan Ampul

Ampul yang telah dipak dan diperiksa label luarnya ditempatkan pada *freezer* bersuhu -30°C untuk prapembekuan secara perlahan. Setelah itu, ampul dipindahkan dengan cepat ke alat kriogenik, yaitu alat penyimpanan menggunakan nitrogen cair.

Uji viabilitas bakteri dilakukan secara periodik dan rutin, misalnya setiap tahun.

Penumbuhan Kembali Mikroba

Ampul dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan direndam pada suhu 37°C atau dibiarkan beberapa saat pada suhu ruang untuk mencairkan isi ampul (*thawing*).

Secara aseptik leher ampul dipotong dengan pemotong kaca dan dipatahkan.

Beberapa tetes medium cair dimasukkan ke dalam ampul, dibiarkan

beberapa saat dan agak dikocok agar biakan cepat larut.

Sebagian suspensi diambil dan ditumbuhkan pada cawan medium agar yang sesuai.

Koloni mikroba ditumbuhkan pada medium agar miring.

BEBERAPA CATATAN PENTING DALAM PENYIMPANAN MIKROBA

1. Tiap isolat biakan paling sedikit dibuat lima duplikat, tetapi semakin banyak semakin baik, sehingga pengujian viabilitas dapat dilakukan lebih leluasa.
2. Pemberian label yang jelas, tidak mudah hilang, untuk memudahkan pelacakan data.
3. Pengecekan rutin tidak hanya untuk menguji viabilitas, tetapi juga stabilitas genetik, terutama virulensinya.
4. Pembuatan database dari koleksi isolat mutlak diperlukan.

KESIMPULAN

Koleksi biakan merupakan kunci utama dalam mikrobiologi dan fitopatologi karena identifikasi, penelitian, dan pelatihan yang efektif memerlukan sumber mikroorganisme yang dapat dipercaya. Koleksi biakan memegang peranan yang mendasar dalam perkembangan mikrobiologi dengan memberikan jaminan bahwa seluruh mikroba yang telah dideskripsi atau diketahui ciri-cirinya telah tersimpan dengan baik dan aman baik untuk keperluan generasi sekarang maupun generasi yang akan datang. Dengan demikian, koleksi biakan merupakan laboratorium yang permanen di mana strain mikroba tersimpan dan dapat dimanfaatkan oleh ilmuwan yang ingin mengulang, membandingkan atau mengembangkan penelitian lebih lanjut dari suatu hasil penelitian yang terdapat di pustaka.

Koleksi biakan dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu (1) koleksi layanan (*service collection*), (2) koleksi kelembagaan (*institutional collection*), dan (3) koleksi pribadi (*private collection*). Koleksi layanan dibuat atau dilakukan oleh lembaga swasta atau pemerintah yang bertujuan untuk melayani pengguna. Koleksi ini disesuaikan dengan kebutuhan dan pengguna dapat memperoleh dengan imbalan dana (membeli). Koleksi kelembagaan merupakan koleksi yang dibuat oleh suatu instansi pemerintah untuk keperluan lembaga yang bersangkutan maupun untuk pengguna lainnya, umumnya dapat diperoleh secara cuma-cuma. Koleksi pribadi biasanya dibuat untuk keperluan peneliti yang bersangkutan. Koleksi pribadi dapat merupakan koleksi strain yang sangat spesifik dan diperlukan oleh ilmuwan lain dan seringkali merupakan koleksi jenis atau strain langka suatu mikroba.

Koleksi biakan tidak hanya sekedar tempat menyimpan, tetapi juga merupakan pusat informasi tentang organisme dan cara penyimpanannya dan juga sebagai pusat kegiatan penelitian dan pelatihan tentang identifikasi dan sistematika mikroba. Nomenklatur atau pemberian nama mikroorganisme dan klasifikasinya sangat tergantung pada pemeliharaan biakan asal (*type culture*) yang akan digunakan sebagai acuan bagi pengkajian taksonomi atau identifikasi organisme yang baru ditemukan. Koleksi biakan merupakan landasan atau titik tolak bagi para ahli mikrobiologi dalam upaya mempertahankan stabilitas nomenklatur dan klasifikasi mikroba. Isolat yang penting sebaiknya perlu disimpan di satu atau lebih koleksi biakan, guna menjamin agar strain yang telah dikarakterisasi dengan baik atau diketahui ciri-cirinya yang khu-

sus dapat disimpan dengan kondisinya yang tidak berubah, sehingga dapat digunakan sebagai acuan, pembanding atau bahan penelitian selanjutnya.

Informasi tentang koleksi biakan yang dimiliki oleh suatu lembaga maupun perorangan sebaiknya se-lain dicatat di bank data atau data-base lembaga yang bersangkutan juga dilaporkan ke pusat pengumpulan data internasional seperti *World Data Center for Microorganisms* yang berada di Departemen Mikrobiologi, *University of Queensland, Australia*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashwood-Smith, M.J. and J. Farrant. 1980. Low temperature preservation in medicine and biology. Tunbridge Wells, UK Pitman.
- Banno, I. and T. Sakane. 1979. Viability of various bacteria after L-drying. Institute for Fermentation. (Osaka) Research Communication 9:35-45.
- Banno, I., K. Mikata, and T. Sakane. 1979. Viability of various yeasts after L-drying. Institute for Fermentation. (Osaka) Research Communication 9:27-34.
- Clark, W.A. 1976. Selected bibliography of literature on preservation of microorganisms, blood, tissues, and vaccines with emphasis on freezing and freeze-drying (1968-1976). US Department of Health Education and Welfare, Center for Disease Control, Atlanta.
- De Vay, J.E. and W.C. Schnathorst. 1963. Single-cell isolation and preservation of bacterial cultures. Nature, London 199. p. 775-777.
- Elliott, R.F. 1975. Methods for preserving minicultures of fungi under mineral oil. Laboratory Practice 24:751.
- Holdings, M. and R.A. Lelliott. 1960. Preservation of some plant viruses by freeze-drying. Plant Pathology 9:63-66.
- Jensen, H.L. 1961. The viability of lucerne rhizobia in soil culture. Nature, London 192. p. 682.
- Klement, Z. 1990. Methods in phyto-bacteriology. Akademiai Kiado, Budapest.
- Lapage, S.P., J.E. Shelton, and T.G. Mitchell. 1970a. Media for the maintenance and preservation of bacteria. In Norris, J.R. and D.W. Ribbons (Eds.). Methods in Microbiology 3A:2-133.
- Lapage, S.P., J.E. Shelton, T.G. Mitchell, and A.R. Mackenzie. 1970b. Culture collections and preservation of bacteria. In Norris, J.R. and D.W. Ribbons (Eds.). Methods in Microbiology 3A:135-227.
- Leben, C. and J. P. Slesman. 1982. Preservation of plant pathogen bacteria on silica gel. Plant Disease 66:327.
- McGinnis, M.R., A.A. Padhye, and L. Ajello. 1974. Storage of stock culture of filamentous fungi, yeast, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. Applied Microbiology 28:218-222.
- Moore, L.W. and R.V. Carlson. 1975. Liquid nitrogen storage of phytopathogenic bacteria. Phytopathology 65:246-250.
- Norris, D.O. 1963. A porcelain bead method for storing Rhizobium. Empire Journal of Experimental Agriculture 31:255-258.
- Redway, K.F. and S.P. Lapage. 1974. Effect of carbohydrates and related compounds on the long-term preservation of freeze-dried bacteria. Cryobiology 11:73-79.
- Skerman, V.B.D. 1973. The organization of a small general culture collection. In Pestana de Castro, A.F., E.J. Da Silva, V.B.D. Skerman, and W.W. Leveritt (Eds.). Proceedings of the Second International Conference on Culture Collections. Brisbane: Unesco/UNEP/ICRO/WFCC/World Data Center for Microorganisms.
- Sly, L.I. 1983. Preservation of microbial culture. In Fahy, P.C. and G.J. Persley (Eds.). Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. Sidney. p. 275-298.
- Soriano, S. 1970. Sordelli's method for preservation of microbial cultures by desiccation in vacuum. In Iizuka, H. and T. Hasegawa (Eds.). Proc. First International Conference on Culture Collection. University of Tokyo Press. Tokyo. p. 269.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Sci. Publ. Oxford.