

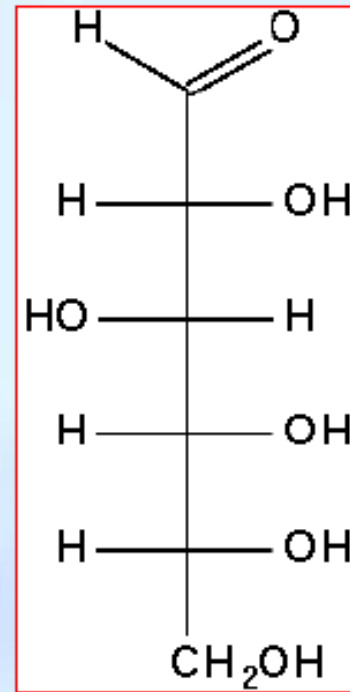
ISOLASI, PRESERVASI DAN PENGEMBANGAN MIKROBIA FERMENTASI

Rizky Muliani Dwi Ujianti, S.Pi., M.Si
Tekpang UPGRIS

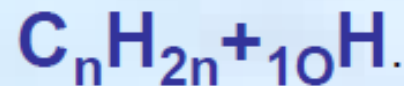
Definisi Fermentasi

Fermentasi

merupakan proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa sederhana yang melibatkan mikroorganisme.



Glukosa



Rumus kimia umum alkohol



Tujuan Fermentasi

Menghasilkan suatu produk
(bahan pakan) yang
mempunyai kandungan nutrisi,
tekstur, biological availability
yang lebih baik

Disamping itu juga menurunkan
zat anti nutrisinya

Jenis-jenis Fermentasi

- Berdasarkan produk yang dihasilkan
 - Alcoholic fermentation
 - Lactic acid fermentation
- Berdasarkan proses kerja
 - Batch culture fermentation
 - Fed culture fermentation
 - Semi batch culture fermentation
 - Continuous culture fermentation
 - Recycling continuous culture fermentation
- Berdasarkan kondisi
 - Aseptis/ steril → pembuatan alcohol dan asam sitrat
 - Semi aseptis / tdk kurang steril → pembuatan tempe, kecap, silase

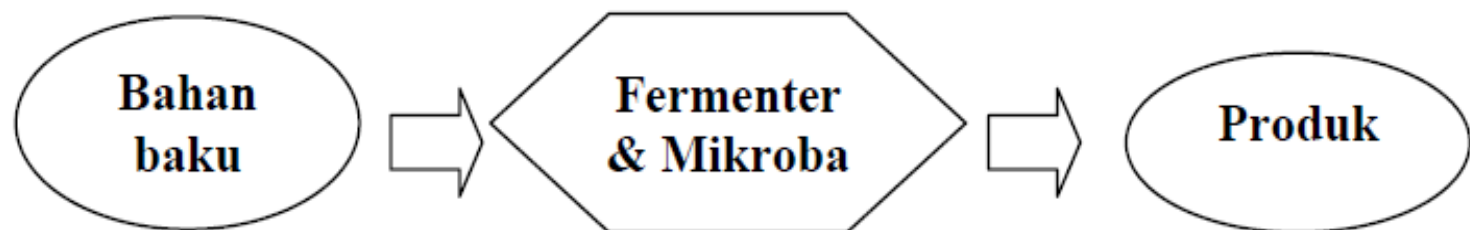
- Batch culture : tanpa penambahan substrat selama fermentasi berlangsung
- Fed batch culture: bbrp nutrisi/media ditambahkan slm fermentasi dlm interval tertentu, tdk ada medium pertumbuhan yg dipindahkan
- Semi batch culture: sebag dari cairan fermentasi dipindahkan stlh proses berlangsung (70-80 %) & sel yg tertinggal dlm tangki diendapkan/disentrifugasi digunakan lagi utk batch berikutnya
- Kultur kontinyu: nutrien/media ditambahkan terus menerus ke dalam fermenter dan produk dipindahkan dari tangki fermenter scr terus menerus
- Kultur kontinyu dg recycle: biomassa sel dipisahkan dan dikembalikan ke fermentor

Fermentasi dapat dibedakan menjadi:

- (1) fermentasi aerob jika memerlukan oksigen mengubah substrat gula menjadi dan hasil akhirnya asam piruvat dan karbondioksida (CO_2), dan
- (2) fermentasi anaerob jika tidak memerlukan oksigen, gula akan diubah menjadi asam piruvat, kemudian asetaldehida dan akhirnya menjadi alkohol; etanol atau methanol dan asam laktat.

Sebagai suatu proses fermentasi memerlukan:

1. Mikroba sebagai inokulum (starter).
2. Tempat (wadah) untuk menjamin proses fermentasi berlangsung dengan optimal.
3. Substrat sebagai tempat tumbuh (medium) dan sumber nutrisi bagi mikroba.
4. Produk, sesuatu yang dihasilkan dari proses fermentasi.



Prinsip-prinsip Fermentasi

Hal-hal yang perlu diperhatikan agar fermentasi dapat berjalan dengan optimal, maka harus memperhatikan faktor-faktor berikut ini:

1. Aseptis: terbebas dari kontaminan
2. Volume kultur relatif konstan (tidak bocor atau menguap)
3. Kadar oksigen terlarut harus memenuhi standar
4. Kondisi lingkungan seperti: suhu, pH harus terkontrol.
5. Komposisi medium pertumbuhan harus mencukupi kebutuhan mikroba.
6. Penyiapan inokulum harus murni.
7. Sifat fermentasi
8. Prinsip kultivasi mikroba dalam sistem cair
9. Desain bioreaktor (fermenter)
10. Desain medium
11. Instrumentasi dan pengendalian proses dalam bioreaktor
12. Teknik pengukuran
13. Pemindahan massa dan energi
14. Peningkatan skala
15. Fermentasi substrat padat
16. Kultur biakan murni (isolat)
17. Tahap produksi akhir.

FERMENTASI

SISI BOKIMIA

Berhubungan dengan pembangkitan energi dengan proses katabolisme senyawa – senyawa organik, yg berfungsi sebagai donor elektron dan terminal elektron acceptor.

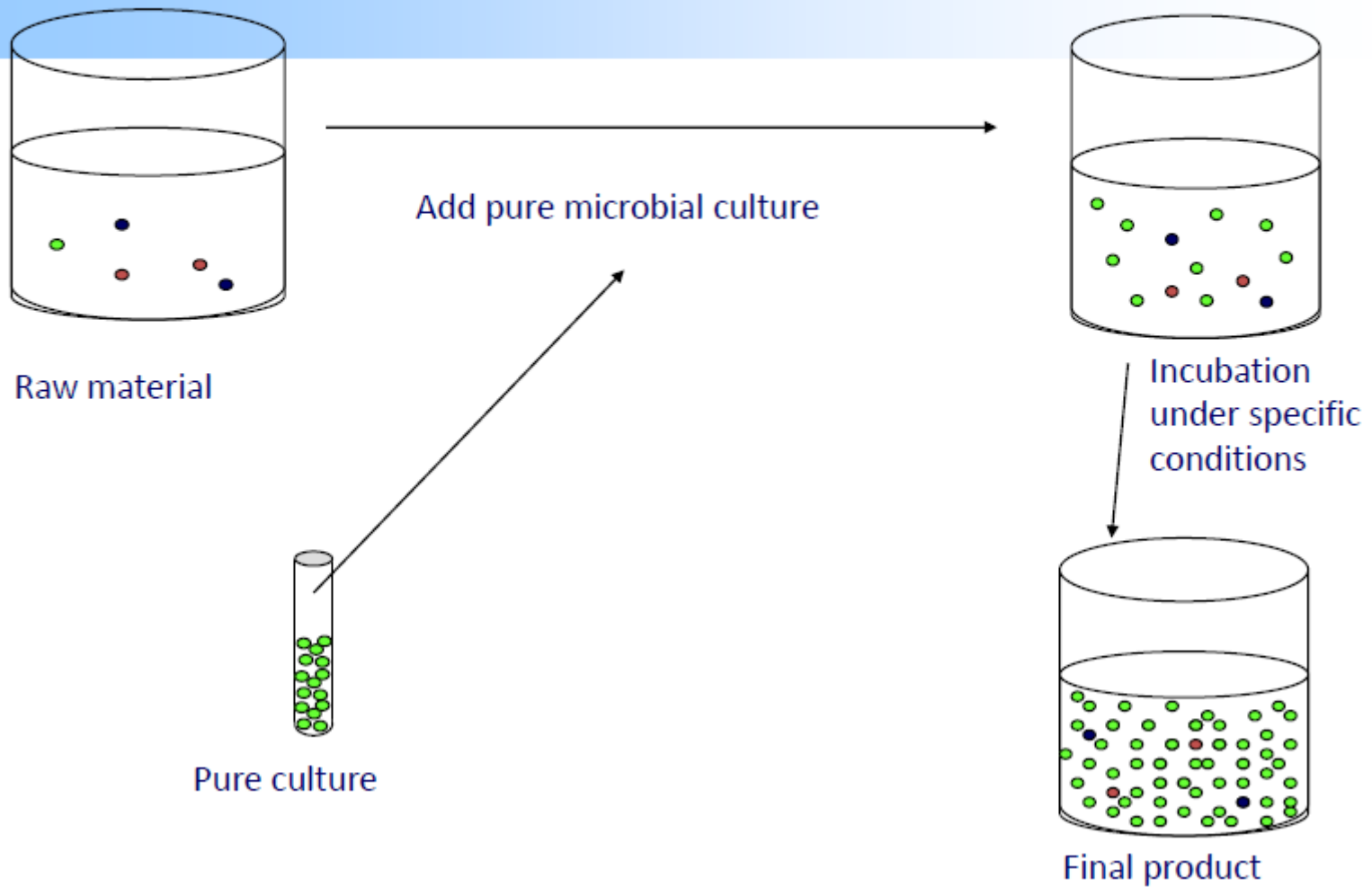
SISI MIKROBIOLOGI INDUSTRI

Berhubungan dengan proses produksi produk dengan menggunakan mikroorganisme sebagai biokatalis

FERMENTASI

- SUBMERGED CULTURE : Proses fermentasi yang mikroorganisme dan substrat berada menjadi satu dalam SUBMERGED STATE dalam media cair yang berjumlah besar
- SOLID STATE : proses fermentasi yg pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan produk terjadi pada permukaan substrat padatan.

★ Controlled Fermentation: pure cultures



Tabel I.1. Perbedaan fermentasi “solid state” dan “submerged”

Karakteristik	Fermentasi “solid state”	Fermentasi”submerged”
1. kondisi mikroorganisme dan substrat	statis	teraduk
2. status substrat	mentah	murni
3. keadaan alami dari mikroorganisme	System fungi	-
4. keberadaan air	terbatas	tinggi
5. suplai oksigen	difusi	Dengan menyemburkan atau menggelembungkan
6. kontak dengan oksigen	langsung	oksigen terlarut
7. kebutuhan media fermentasi	kecil	besar
8. kebutuhan energi	rendah	tinggi
9. studi kinetika	kompleks	mudah
10. perubahan suhu dan konsentrasi	Fungsi step	“smooth”
11. Pengendalian reaksi	sulit	mudah
12. potensi kontaminasi	kecil	tinggi
13. jumlah cairan yang harus dibuang	rendah	tinggi
14. problem polusi	rendah	tinggi

Ruang lingkup proses fermentasi :

1. Fermentasi yang menghasilkan sel (biomas) sebagai produk
Contoh : yeast, Single cell protein
2. Fermentasi yang memproduksi enzim
Contoh : enzyme glucoamilase
3. Fermentasi yang menghasilkan hasil metabolisme mikroba :
Primary metabolite products dan *secondary metabolite products*
4. Fermentasi yang memodifikasi senyawa (proses transformasi)

ISOLASI

Pemisahan sample mikrobia menjadi sel – sel individu yang kemudian berkembang biak menjadi satu koloni.

□ 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 METODE ISOLASI

1. ENRICHMENT LIQUID CULTURE

Teknik yg menghasilkan naiknya jumlah organisme relatif terhadap jumlah dr tipe2 dlm inokulum asli

- a. Mengambil mixed population
- b. melengkapi kondisi yg sesuai utk pertumbuhan dan tipe2 yg dikehendaki

2. SOLIDIFIED MEDIA

Sudah digunakan untuk isolasi dari produser – produser enzym tertentu . Teknik ini umumnya meliputi kegunaan dari selective medium yg menggunakan substrat yg dapat mempercepat pertumbuhan dari tipe organisme yg dikehendaki.

BAGAIMANA MIKROORGANISME BERISOLASI

- Dalam teknologi fermentasi, mikroorganisme memegang kunci untuk keberhasilan atau kegagalan proses bioteknologi.
- Oleh karena itu, penting untuk memilih mikroorganisme yang paling cocok untuk melaksanakan proses industri yang diinginkan.
- Tahap pertama dalam mendirikan sebuah proses industri berbasis mikroba adalah untuk mendapatkan mikroorganisme yang cocok dan potensi mikroorganisme untuk aplikasi industri.
- Isolasi dan screening membutuhkan satu untuk mendapatkan kultur baik murni atau campuran, diikuti oleh penilaian mereka untuk menentukan yang dapat melakukan reaksi yang diinginkan atau menghasilkan produk yang diinginkan yang paling efisien

METODE METODE ISOLASI YG TDK MENGGUNAKAN SELEKSI DARI KARAKTERISTIK YG DIINGINKAN

SCREENING UNTUK PRODUKSI ANTIBIOTIK

1. Screening senyawa – senyawa aktif farmakologi

Jika suatu senyawa menghambat suatu enzim in vitro (di luar), berarti dia punya aksi farmakologi in vivo

Target area	Target Enzyme
Anti histamin	Histidine decarboxylase Histamine _ N - methyltransferranse
glycohydrolases	A – amylase, sucrase

2. Screening untuk produksi dari faktor – faktor pertumbuhan

- Faktor pertumbuhan : asam amino, nucleotides
- Sangat sulit dilakukan dalam prosedur isolasi seleksi karakteristik
- Deteksi dari produser faktor pertumbuhan tergantung pd stimulasi dari bertumpuhan dari bakteri auxotropik
- Produser asam amino umumnya : arthrobacter, microbaterium, micrococcus, corynebacterium

3. Screening untuk produksi dari polisakarida

Limbah karohidrat dapat digunakan untuk mendapatkan mikroorganisme tipe ini. Sifat2 dari produksi polysakarida sulit bila dijalankan dg metode isolasi dg seleksi karakteristik, jd dipakai metode isolasi screening.

KRITERIA PENTING DALAM MEMILIH ORGANISME UNTUK APLIKASI INDUSTRI DALAM ISOLASI

1. Karakteristik gizi dan organisme → proses dijalankan dg medium yg tdk mahal
2. Suhu optimum dari organisme umumnya suhu kamar 25⁰c
3. Reaksi dari organisme dg peralatan yg akan dicapai dan kecocokan dr organisme terhadap proses yg digunakan
4. Stabilitas organisme dan dpt diuji dg manipulasi genetik
5. Produktivitas organisme diukur dlm kemampuannya mengubah substrate mjd produk dan memberi yield yg tinggi dr produk per satuan waktu.
6. Mudahna recovery hasil dari kultur

SEJUMLAH MIKROORGANISME IDEAL YG BERGUNA DALAM INDUSTRI:

- mikroorganisme harus stabil secara genetik.
- Strain harus murni, bebas dari mikroorganisme lainnya.
- strain harus tumbuh dengan penuh semangat dan cepat setelah inokulasi ke dalam tangki biji atau fermentor lainnya. Satu harus menghindari strain yang mungkin bereaksi dengan peralatan.
- Strain yang harus menunjukkan karakteristik yang diinginkan atau menghasilkan produk yang diinginkan dalam jangka waktu yang wajar (misalnya. 3 hari), lebih bebas dari racun oleh-produk lain dan cell lysis.

- strain harus melindungi diri terhadap kontaminasi, jika memungkinkan. perlindungan diri dapat berupa menurunkan pH, kemampuan untuk dibudidayakan pada suhu tinggi atau produksi agen antimikroba (misalnya. antibiotik atau faktor pembunuh). Perhatikan bahwa pertumbuhan pada suhu tinggi juga mengurangi kebutuhan pendinginan secara signifikan.
- strain harus bisa untuk manipulasi genetik.
- strain harus siap dipertahankan untuk jangka waktu yang lama.
- strain harus (idealnya) menunjukkan kebutuhan pertumbuhan sederhana.

Screening penggunaan prosedur yang sangat selektif untuk memungkinkan deteksi dan isolasi hanya mikroorganisme atau metabolit yang menarik, dari antara populasi yang besar.

Screening industri yang ideal harus:

- ☐ cepat.
- ☐ peka.
- ☐ murah.
- ☐ Spesifik
- ☐ prediktif.
- ☐ sederhana.

Major Culture Collections

Culture collections	Country
American Type Culture Collection (ATCC)	USA
National Collection of Type Culture (NCTC)	London
National Collection of Yeast Cultures (NCYC)	UK
Japan Collection of Microorganisms (JCM)	Japan
Culture Collection of the Institute for Fermentation (IFO)	Osaka, Japan

BERBAGAI TEKNIK KULTUR MIKROORGANISME

1. Peralatan harus steril
Bebas dari mikroorganisme
2. teknik aseptik digunakan
3. Berbagai jenis media
Mengandung nutrisi
Padat atau cair



MEDIA

1. Media cair

- Nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan
- kebutuhan yang berbeda untuk spesies yang berbeda
- tidak dapat digunakan untuk mengisolasi kultur murni

2. media padat

Media cair ditambah memperkuat agen agar

Memungkinkan isolasi kultur murni

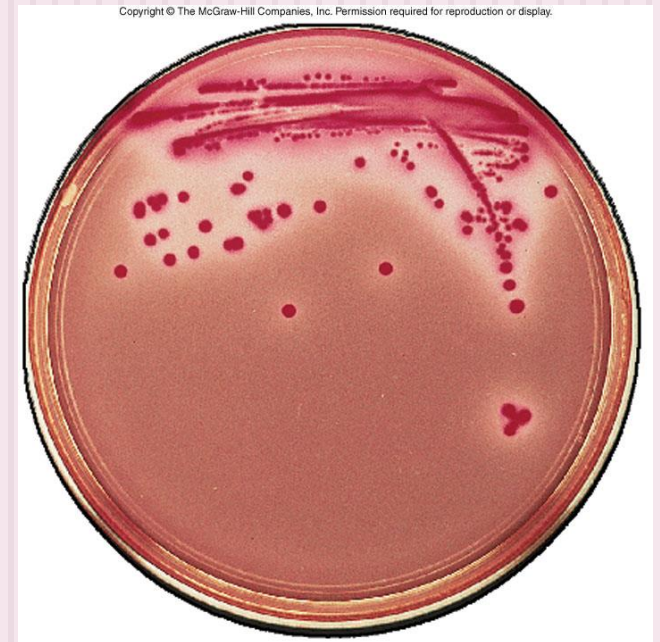
3. Containers

Petri dish , tabung



AGAR

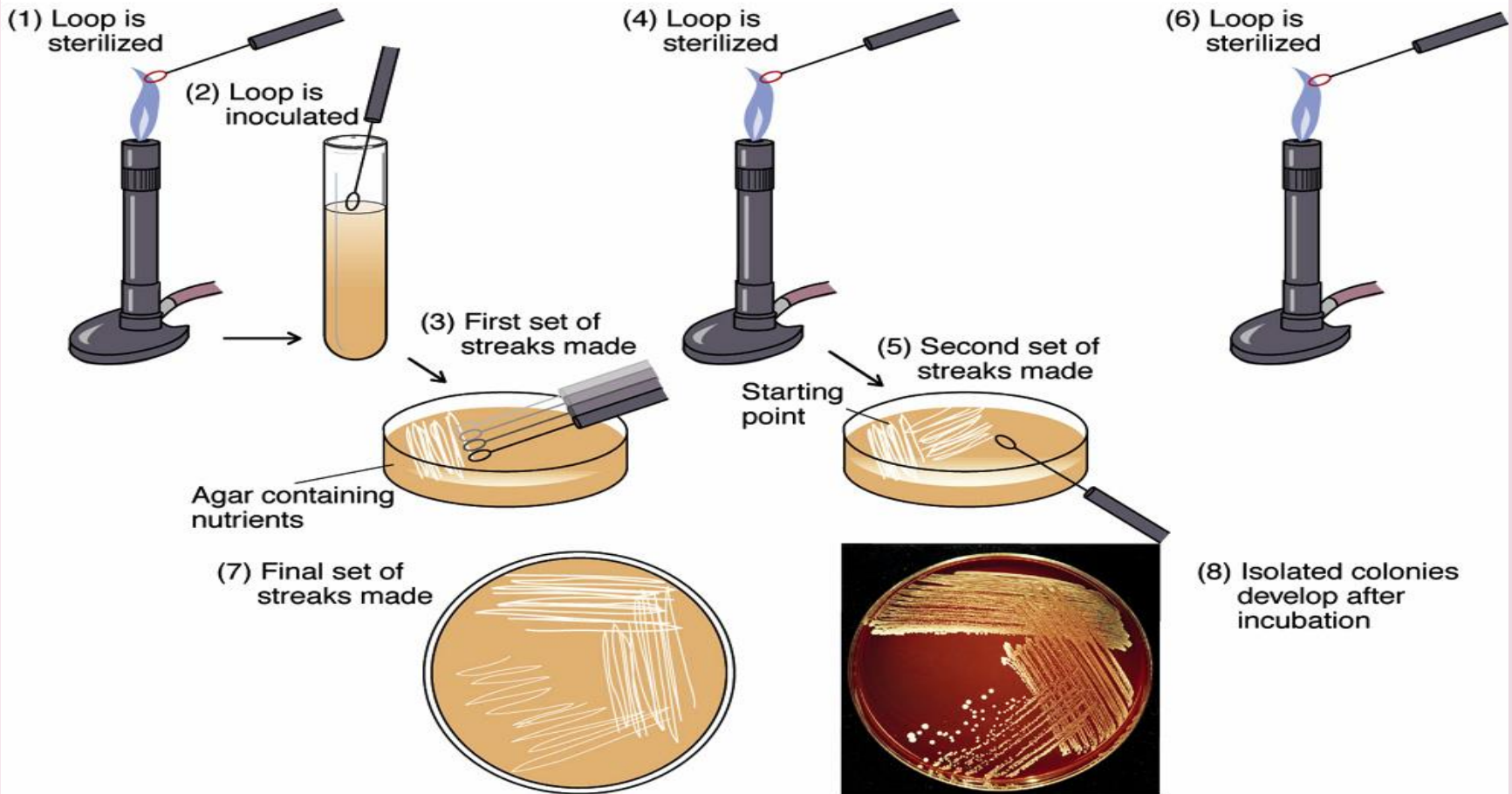
1. Tahan terhadap degradasi bakteri
 2. Bertahan pd suhu tinggi
 - Dapat disterilisasi dalam autoclave
 3. Mencairkan pada suhu tinggi
- Dapat dituangkan ke dalam wadah yang mudah
4. tetap cair sampai bawah 45°C
 5. Setelah dipadatkan, tetap solid pd berbagai suhu
 - Meleleh pada 95°C
 6. Tembus cahaya
- Koloni yang tampak jelas



PURE CULTURE

- Bakteri dipisahkan dan ditempatkan pada media padat
- Berbagai jenis pengenceran dan teknik plating digunakan

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



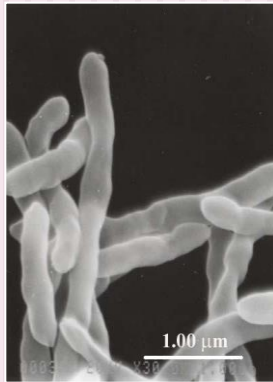
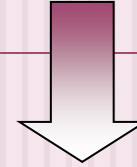
Streak-Plate Isolation

Screening methods

- memanfaatkan karakterisasi yang diinginkan
 - Pengayaan kultur cair
 - kultur pengayaan menggunakan dipadatkan media
- Tidak memanfaatkan pemilihan karakterisasi yang diinginkan

Screening of chitinase-producing bacteria

Crab`s waste



Compost soil : 10 kg
Starter : 2.5 l
Rice bran : 1 kg
(water content 50-60%)



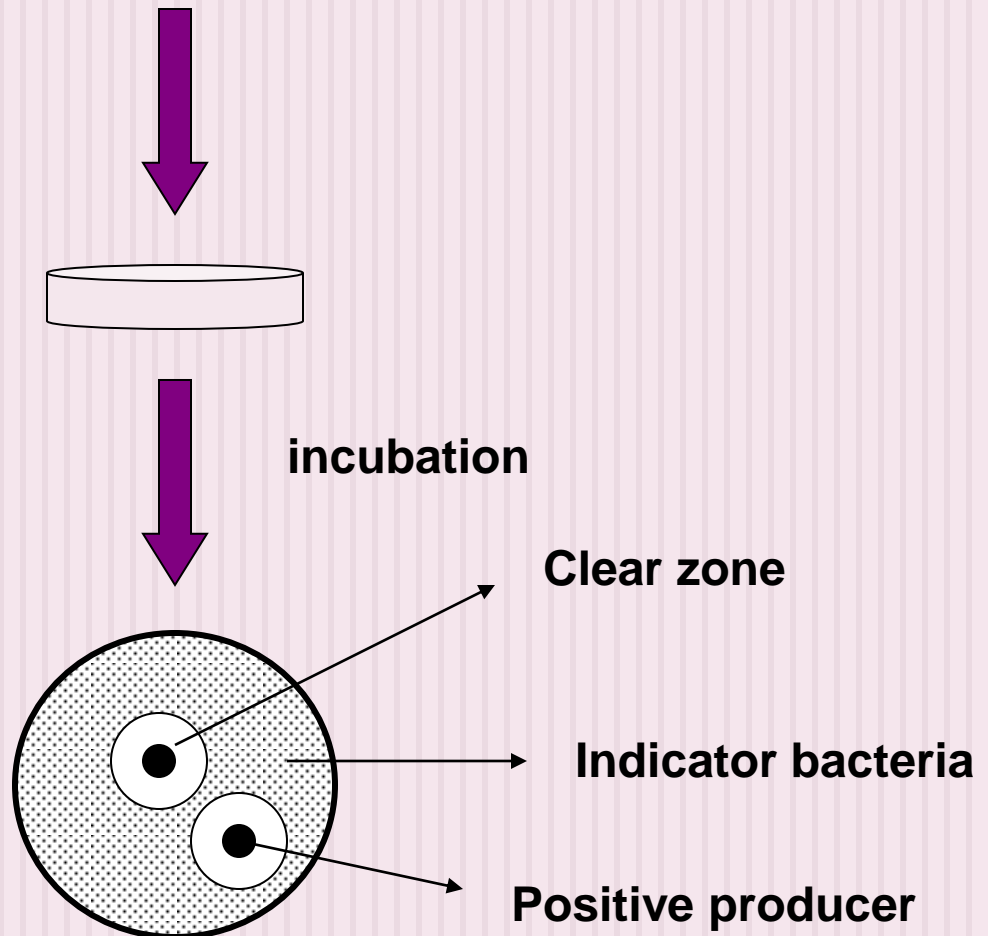
55°C, 48 h

Colloidal Chitin Plate

Colloidal chitin	: 0.3%
Pepton	: 0.8%
NaCl	: 0.1%
KH₂PO₄	: 0.1%
MgSO₄7H₂O	: 0.05%
Trace element	: 0.01%
Agar	: 1.5%

Screening of antimicrobial-producing bacteria

Potential producer + indicator microorganism



Molecular Technique

- Probe molekuler untuk urutan gen tertentu untuk mendeteksi organisme yang mampu menghasilkan produk tertentu
- Pengembangan imunologis assay seperti ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Jenis strain mikroorganisme dapat diperoleh dari perusahaan, universitas dan koleksi kultur nasional atau internasional & lingkungan alam

PERUSAHAAN

- Berbagai strain yang berpotensi tersedia.
- Strain Terbaik tidak mungkin tersedia perusahaan cenderung untuk menjaga strain terbaik untuk mereka gunakan sendiri.
- Strain mungkin telah diuji industri.
- Mungkin tidak banyak penelitian dasar telah dilakukan, kecuali untuk produksi strain terbaik . Namun strain terbaik tidak mungkin diberikan. Oleh karena itu, strain yang diperoleh adalah strain dg karakteristik yg tdk baik
- Namun masih bisa didapatkan
- Biasanya disediakan secara gratis

Universitas

- Berbagai strain yang terbatas tersedia di masing-masing lab, tapi dg sistem
- Kolektif
- Strain Terbaik" mungkin tersedia dan dapat diperoleh.
- Strain telah mungkin tidak diuji industri.
- Strain yang lebih baik ditandai dan hasil diterbitkan.
- Mungkin harus menyerahkan beberapa lisensi
- mematenkan hak untuk mendapatkan strain
- Biasanya disediakan secara gratis

Koleksi Nasional atau Internasional :

- Berbagai besar strain yang tersedia.
- "strainTerbaik" tersedia & dapat diperoleh.
- Strain telah mungkin tidak diuji industri.
- Strain baik ditandai dan hasilnya dipublikasikan.
- Kurang kekhawatiran tentang hak lisensi dan paten.
- Akan mengenakan biaya untuk strain.

LINGKUNGAN:

- sumber berbagai jenis mikroorganisme.
- satu berpotensi mendapatkan novel dan strain yang lebih baik dari lingkungan daripada yang tersedia dari koleksi nasional
- biaya mungkin lebih rendah
- kelemahan utama dengan memperoleh mikroba dari lingkungan adalah bahwa mikroba tidak murni dan mereka harus diisolasi dari antara banyak mikroorganisme lainnya.
- waktu mengkonsumsi dan upaya yang cukup untuk mencapai

STOCK CULTURES

- Setelah memperoleh biakan murni, itu dipertahankan sebagai stock culture
 - Dipertahankan sebagai inokulum untuk studi nantinya
- Berbagai sarana penyimpanan
- "Agar miring"
 - Dibekukan dalam larutan gliserol
- Gliserol mencegah kerusakan sel-sel dari kristal es
- Nitrogen cair
 - Lyophilized (freeze-kering)

Preservation on agar slopes



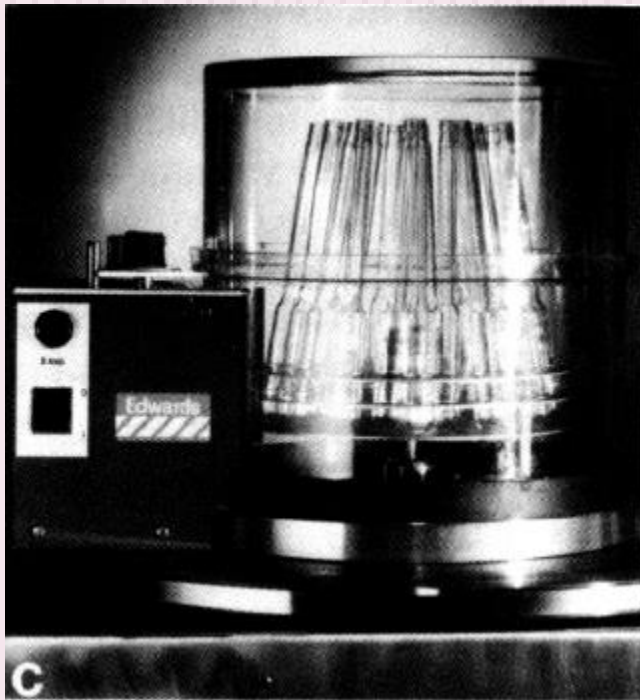
PRESERVASI DENGAN NITROGEN CAIR:

- Untuk mengurangi aktivitas metabolisme sejak suhu yang sangat rendah. diterapkan (-150°C to -190°C)
- kehilangan Viabilitas selama pembekuan-pencairan

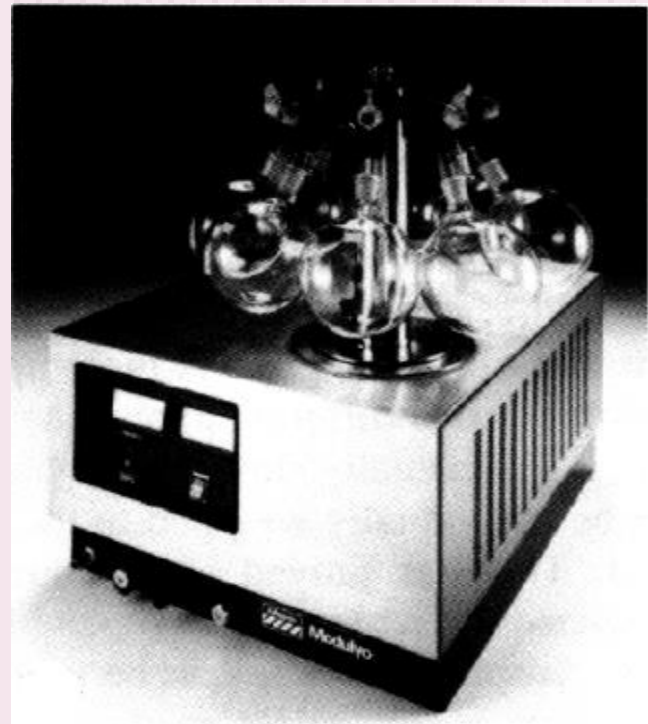


Pelestarian dengan liofilisasi:

- Juga disebut beku-kering, adalah metode pengeringan yang secara signifikan mengurangi hangnya aktivitas atau kerusakan lainnya.
- Metode: pembekuan diikuti dengan pengeringan di bawah sublimasi vakum



Ampoules in spin freezer

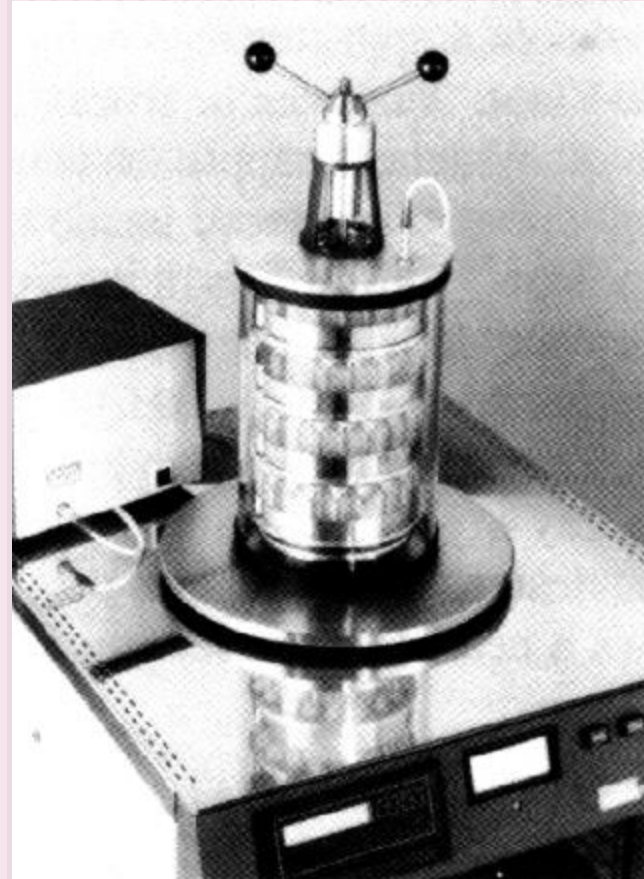


500 ml flask-manifold

continued



vacuum



Prefrozen vials

Bagaimana mengontrol
STOCK CULTURES
diawetkan?

Quality Control of preserved stock cultures

