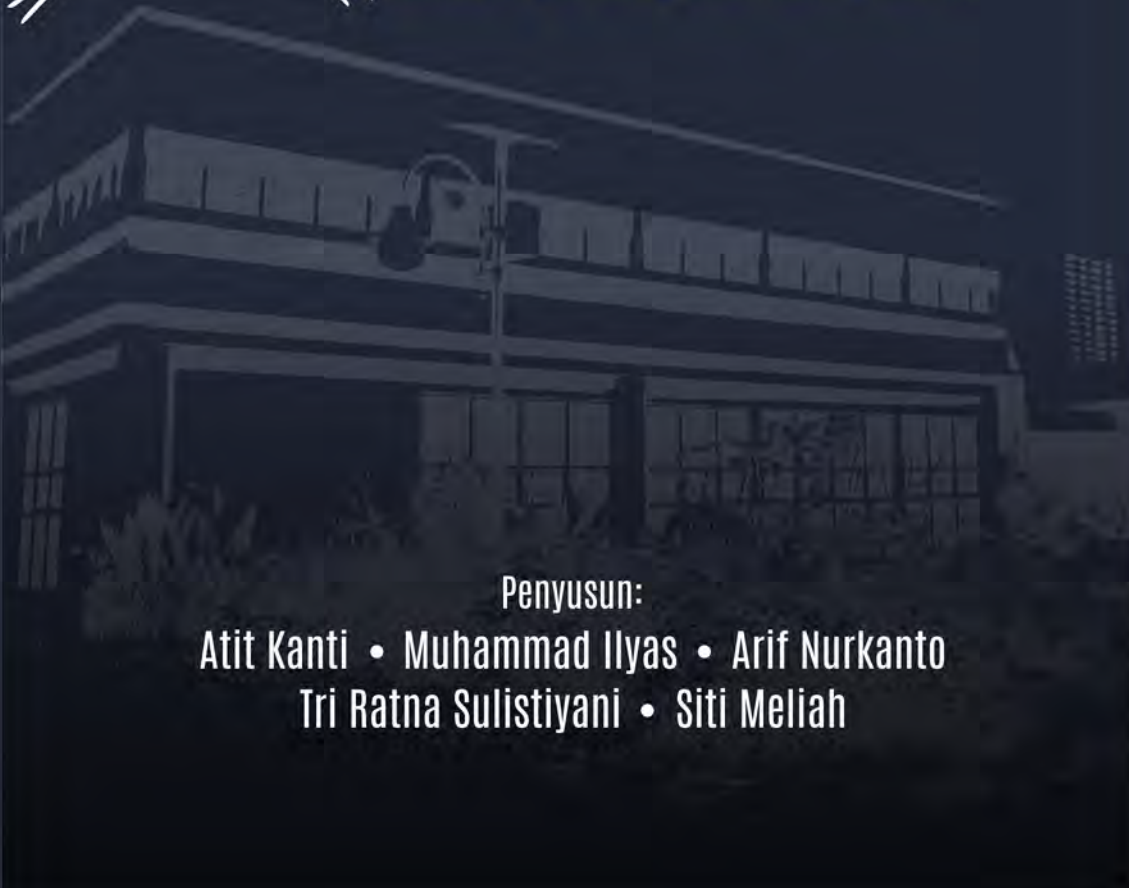




Panduan Pengelolaan
KOLEKSI
MIKROORGANISME
Indonesian Culture Collection (InaCC)



Penyusun:

Atit Kanti • Muhammad Ilyas • Arif Nurkanto
Tri Ratna Sulistiyani • Siti Meliah



Panduan Pengelolaan
KOLEKSI
MIKROORGANISME
Indonesian Culture Collection (InaCC)

Dilarang mereproduksi atau memperbanyak seluruh atau sebagian dari buku ini dalam bentuk atau cara apa pun tanpa izin tertulis dari penerbit.

© Hak cipta dilindungi oleh Undang-Undang No. 28 Tahun 2014

All Rights Reserved



Panduan Pengelolaan
KOLEKSI
MIKROORGANISME
Indonesian Culture Collection (InaCC)

Penyusun:

Atit Kanti • Muhammad Ilyas • Arif Nurkanto
Tri Ratna Sulistiyani • Siti Meliah

LIPi Press

© 2018 Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Pusat Penelitian Biologi

Katalog dalam Terbitan (KDT)
Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme Indonesian Culture Collection (InaCC)/Atit Kanti, Muhammad Ilyas, Arif Nurkanto, Tri Ratna Sulistiyani, dan Siti Meliah – Jakarta: LIPI Press, 2018.

xxiii + 191 hlm.; 14,8 x 21 cm

ISBN 978-979-799-982-7 (cetak)
978-979-799-983-4 (e-book)

1. Panduan
2. Mikroorganisme

3. Indonesia

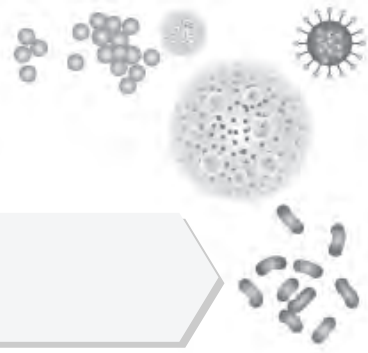
579

Copyeditor : Fadly Suhendra dan M. Sidik
Proofreader : Noviasuti Putri Indrasari
Desainer isi : Siti Qomariyah dan Meita Safitri
Desainer sampul : Dhevi E.I.R. Mahelingga
Kontributor : Ade Lia Putri
Ahmad Jauhar Arief
Atit Kanti
Debora Christin Purbani
Dwi Susilaningsih
Mia Kusmiati
Nilam Fadmaulidha Wulandari
Rinatus Siswi
Shanti Ratnakomala
Tri Ratna Sulistiyani
Yopi
Agustinus Joko Nugroho
Arif Nurkanto
Deden Sumirat Hidayat
Dian Alfian Nurcahyanto
I Nyoman Sumerta
Muhammad Ilyas
Puspita Lisdiyanti
Ruby Setiawan
Siti Meliah
Yeni Yuliani

Cetakan Pertama : November 2018



Diterbitkan oleh:
LIPI Press, anggota Ikapi
Jln. R.P. Soeroso No. 39, Menteng, Jakarta 10350
Telp: (021) 314 0228, 314 6942. Faks.: (021) 314 4591
E-mail: press@mail.lipi.go.id
Website: www.lipipress.lipi.go.id
f LIPI Press
@lipi_press



DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
PENGANTAR PENERBIT	xvii
KATA PENGANTAR	xix
PRAKATA	xxi
BAB I MIKROORGANISME DAN InaCC	1
A. Kekayaan dan Preservasi Mikroorganisme di Indonesia	1
B. <i>Global Issue Nagoya Protocol on Access and Benefit Sharing</i>	5
C. Indonesian Culture Collection (InaCC)	6
BAB II MANAJEMEN DEPOSITORI, DISTRIBUSI, PENERIMAAN JASA, DAN PENANGANAN MIKROORGANISME SECARA UMUM DI InaCC	11
A. Prosedur Depositori Mikroorganisme InaCC	11
B. Prosedur Distribusi Mikroorganisme InaCC	14
C. Prosedur Pelayanan dan Jasa InaCC	16
D. Prosedur Akses Pangkalan Data Koleksi Mikroorganisme InaCC	18
E. Prosedur Penghapusan atau Peniadaan Koleksi Mikroorganisme InaCC	19
F. Prosedur Kesehatan dan Keselamatan Kerja	19

G. Prosedur Penanggulangan Bahaya Kebakaran	20
H. Prosedur Pengamanan Lingkungan Kerja	20
BAB III MANAJEMEN PEMELIHARAAN KOLEKSI	
MIKROORGANISME InaCC	23
A. KOLEKSI ARKEA	25
1. Prosedur Penyimpanan <i>L-drying</i> Isolat Arkea	25
2. Prosedur Penyimpanan <i>Freezing</i> Isolat Arkea	27
B. KOLEKSI AKTINOMISETES	29
1. Prosedur Penyimpanan <i>L-drying</i> Isolat Aktinomisetes	30
2. Prosedur Penyimpanan <i>Freeze-drying</i> Isolat Aktinomisetes	34
3. Prosedur Penyimpanan <i>Freezing</i> Isolat Aktinomisetes	36
C. KOLEKSI BAKTERI	38
1. Prosedur Penyimpanan <i>L-drying</i> Isolat Bakteri	39
2. Prosedur Penyimpanan <i>Freeze-drying</i> Isolat Bakteri	42
3. Prosedur Penyimpanan <i>Freezing</i> Isolat Bakteri	44
D. KOLEKSI KHAMIR	46
1. Prosedur Penyimpanan <i>L-drying</i> Isolat Khamir	47
2. Prosedur Penyimpanan <i>Freeze-drying</i> Isolat Khamir	50
3. Prosedur Penyimpanan <i>Freezing</i> Isolat Khamir	53
E. KOLEKSI KAPANG	55
1. Prosedur Penyimpanan <i>L-drying</i> Isolat Kapang	56
2. Prosedur Penyimpanan <i>Freeze-drying</i> Isolat Kapang	58
3. Prosedur Penyimpanan <i>Freezing</i> Isolat Kapang	61
F. KOLEKSI MIKROALGA	64
1. Prosedur Penyimpanan <i>Subculturing</i> dan <i>Freezing</i> Isolat Mikroalga	65

BAB IV MANAJEMEN MUTU	71
A. MANAJEMEN MUTU MIKROORGANISME PROKARIOTIK	71
1. Uji Viabilitas (<i>Accelerated Rate Test</i>) Isolat Mikroorganisme Prokariotik (Bakteri dan Aktinomisetes)	72
2. Identifikasi Isolat Bakteri	75
3. Identifikasi Isolat Aktinomisetes Secara Molekuler Berdasarkan Sekuen 16S rDNA	93
B. MANAJEMEN MUTU MIKROORGANISME EUKARIOTIK	99
1. Uji Viabilitas (<i>Accelerated Rate Test</i>) Isolat Mikroorganisme Eukariotik (Khamir dan Kapang)	100
2. Identifikasi Isolat Khamir secara Molekuler Berdasarkan 26S rDNA	103
3. Identifikasi Isolat Kapang Secara Molekuler Berdasarkan Sekuen ITS	109
4. Identifikasi Isolat Mikroalga Secara Morfologi dan Molekuler	116
C. MANAJEMEN MUTU ARKEA	125
1. Uji Viabilitas (<i>Accelerated Rate Test</i>) Isolat Arkea	125
2. Identifikasi Isolat Arkea Secara Molekuler Berdasarkan 16S rDNA	129
BAB V PEMANFAATAN KOLEKSI MIKROORGANISME SECARA BERKELANJUTAN	139
DAFTAR PUSTAKA	145
LAMPIRAN	153
INDEKS	187
BIOGRAFI PENYUSUN	189



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Koleksi Kultur Mikroorganisme di LIPI	7
Gambar 1.2	Struktur Organisasi InaCC	10
Gambar 2.1	Bagan Alur Depositori Isolat Mikroorganisme ke InaCC	12
Gambar 2.2	Bagan Alur Distribusi Isolat Mikroorganisme InaCC	15
Gambar 2.3	Bagan Alur Pelayanan Jasa InaCC	17
Gambar 3.1	Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Arkea	26
Gambar 3.2	Tata Cara Pelabelan <i>Cryotube</i> Isolat Arkea	29
Gambar 3.3	Penampilan Morfologi Koloni Isolat Aktinomisetes yang Ditumbuhkan pada Media <i>Yeast Starch Agar</i> (YSA)	30
Gambar 3.4	Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Aktinomisetes	31
Gambar 3.5	Prosedur Penyimpanan Kering-beku <i>L-drying</i> Aktinomisetes	35
Gambar 3.6	Pengujian kevakuman tabung ampul menggunakan <i>spark tester</i> . Tabung ampul yang vakum menghasilkan cahaya warna biru muda atau ungu muda (a), sedangkan tabung ampul yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya (b)	35
Gambar 3.7	Tata Cara Pelabelan <i>Cryotube</i> Aktinomisetes	37
Gambar 3.8	Tata Cara Pengambilan Isolat Aktinomisetes	37

Gambar 3.9	Penyimpanan Beku <i>Freezing</i> -80°C	38
Gambar 3.10	Penampilan Morfologi Koloni Beberapa Isolat Bakteri	39
Gambar 3.11	Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Bakteri	40
Gambar 3.12	Tabung Ampul Hasil Penyimpanan Isolat Bakteri dengan Metode <i>L-drying</i>	42
Gambar 3.13	Tata Cara Pelabelan <i>Cryotube</i> Isolat Bakteri	45
Gambar 3.14	Isolat yang Disimpan dalam <i>Cryotube</i> dengan Metode <i>Freezing</i>	46
Gambar 3.15	Penampilan Morfologi Koloni Beberapa Isolat Khamir	46
Gambar 3.16	Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Khamir	49
Gambar 3.17	Tabung Ampul Hasil Penyimpanan Isolat Khamir dengan Metode <i>L-drying</i>	52
Gambar 3.18	Tata Cara Pelabelan <i>Cryotube</i> Isolat Khamir	53
Gambar 3.19	Penampilan Morfologi Koloni Isolat Kapang	55
Gambar 3.20	Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Kapang	57
Gambar 3.21	Tata Cara Pelabelan <i>Cryotube</i> Isolat Kapang	62
Gambar 3.22	Penyimpanan Beku Isolat Fungi dengan Metode <i>Freezing</i> -80°C	63
Gambar 3.23	Uji Viabilitas Isolat Fungi dengan Metode <i>Freezing</i> -80°C	63
Gambar 3.24	Koleksi Mikroalga dan Penampilan Morfologi Beberapa Isolat Mikroalga yang Diamati Menggunakan Mikroskop Cahaya	64
Gambar 3.25	Tata Cara Pelabelan Tabung Ulir dan <i>Cryotube</i> Isolat Mikroalga	66
Gambar 3.26	Prosedur <i>Subculturing</i> Isolat Mikroalga	70
Gambar 4.1	Prosedur Metode ART pada Isolat Bakteri yang Disimpan dengan Cara <i>L-drying</i>	76
Gambar 4.2	Skema Metode Penghitungan Jumlah Koloni dengan Metode Angka Lempeng Total (ALT)	76

Gambar 4.3	Pembuatan Apusan Bakteri untuk Pewarnaan Gram (Tahap 3–5)	78
Gambar 4.4	Prosedur Pewarnaan Gram (Tahap 6–13)	80
Gambar 4.5	Morfologi dan kelompok bakteri dapat ditentukan melalui pewarnaan Gram.	81
Gambar 4.6	Prosedur Amplifikasi 16S rDNA untuk Mengidentifikasi Isolat Bakteri	85
Gambar 4.7	Kegiatan fraksinasi DNA menggunakan gel elektroforesis.	86
Gambar 4.8	Tampilan Situs www.ncbi.nlm.nih.gov	91
Gambar 4.9	Tampilan Layar Pilihan Menu Program BLAST	91
Gambar 4.10	Tampilan Layar Hasil Pencarian Homologi Sampel dengan Sekuen Terdekat	92
Gambar 4.11	Cuplikan Tampilan Layar Hasil Pencarian Homologi dengan BLAST yang Memperlihatkan <i>Score</i> dan <i>Query Coverage</i> pada Penyejajaran Sekuen DNA	93
Gambar 4.12	Prosedur Uji Viabilitas Preservasi dalam Ampul <i>L-drying</i> / <i>Freeze-drying</i>	129
Gambar 5.1	Perkiraan Jumlah Mikroorganisme	140
Gambar 5.2	Pemanfaatan Mikroorganisme dalam Kehidupan Manusia	141
Gambar 5.3	Tata Kelola Koleksi Kultur Mikroorganisme/ <i>Culture Collection</i>	143



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Daftar Koleksi Kultur Mikroorganisme di Indonesia sampai Tahun 2017	4
Tabel 4.1	Komposisi PCR untuk Amplifikasi 16S rDNA	84
Tabel 4.2	Komposisi PCR untuk amplifikasi 16S rDNA menggunakan <i>Go Taq green master mix</i> (Promega).	84
Tabel 4.3	Primer untuk Pengurutan (<i>Sequencing</i>) 16S rDNA	87
Tabel 4.4	Komposisi Siklus Sekuensing 16S rDNA	88
Tabel 4.5	Program Reaksi PCR 16S rDNA Isolat Aktinomisetes	96
Tabel 4.6	Program Reaksi PCR 26S rDNA Isolat Khamir	105
Tabel 4.7	Program Reaksi PCR untuk Isolat Kapang	112
Tabel 4.8	Primer Spesifik Mikroalga yang Digunakan untuk Mengamplifikasi 16S rDNA	122
Tabel 4.9	Primer Spesifik Mikroalga yang Digunakan untuk Mengamplifikasi 18S rDNA	123
Tabel 4.10	Program PCR untuk Isolat Mikroalga	123
Tabel 4.11	Program Reaksi PCR untuk Amplifikasi 16S rDNA Arkea	132
Tabel 4.12	Primer Spesifik Arkea untuk Pengurutan 16S rDNA	134
Tabel 4.13	Komposisi Siklus Pelabelan DNA dalam Kegiatan Pengurutan Basa Nukleotida	134



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Formulir 1 <i>Deposition Data Sheet</i>	153
Lampiran 2	Formulir 2 <i>MTA for Deposition</i>	156
Lampiran 3	Formulir 4 <i>Preservation Sheet</i>	159
Lampiran 4	Formulir 5 <i>Request for Certificate</i>	160
Lampiran 5	Formulir 6 <i>Order Form</i>	161
Lampiran 6	Formulir 7 <i>MTA for Distribution</i>	162
Lampiran 7	Formulir 8 Serah Terima Barang/Jasa	165
Lampiran 8	Formulir 9 Pengaduan Pembelian Mikroorganisme Pelanggan	166
Lampiran 9	Formulir 10 Penerimaan Jasa	167
Lampiran 10	Formulir 11 Penerimaan & Penyimpanan Contoh Uji	168
Lampiran 11	Formulir 12 Laporan Analisis	169
Lampiran 12	Formulir 13 Hasil Identifikasi Mikroorganisme	170
Lampiran 13	Formulir 14 Jawaban Hasil Identifikasi Kapang	172
Lampiran 14	Formulir 15 Jawaban Hasil Identifikasi Bakteri	174
Lampiran 15	Formulir 16 Jawaban Hasil Identifikasi Khamir	176
Lampiran 16	Formulir 17 Jawaban Hasil Identifikasi Aktinomisetes	178
Lampiran 17	Komposisi Media Kultivasi	180

A collection of various microscopic organisms, including clusters of small spheres, a larger textured sphere, a sun-like structure with spikes, and several rod-shaped bacteria, arranged in the top right corner of the page.

PENGANTAR PENERBIT

Sebagai penerbit ilmiah, LIPI Press mempunyai tanggung jawab untuk menyediakan terbitan ilmiah yang berkualitas. Upaya tersebut merupakan salah satu perwujudan tugas LIPI Press untuk ikut serta dalam mencerdaskan kehidupan bangsa sebagaimana yang diamanatkan dalam pembukaan UUD 1945.

Penerbitan buku panduan ini merupakan salah satu upaya untuk mempertahankan kekayaan mikroorganisme Indonesia. Penyusunan buku ini dilakukan oleh pusat depositori koleksi mikroorganisme Indonesia, yaitu Indonesian Culture Collection (InaCC). InaCC dibangun untuk memperkuat fungsi otoritas ilmiah LIPI sebagai pusat acuan dalam pengelolaan sumber daya hayati nasional. Melalui buku panduan ini, InaCC berupaya mendokumentasikan dan membagi informasi yang terkait dengan sistem manajemen mutu koleksi mikroorganisme, mulai dari sistem administrasi hingga pemeliharaan koleksi yang berstandar internasional berdasarkan panduan World Federation for Culture Collections (WFCC) dan sistem manajemen ISO 9001:2008.

Diharapkan buku panduan ini dapat memenuhi kebutuhan akan adanya metode baku dan sistematis dalam pengelolaan koleksi mikroorganisme yang berstandar internasional untuk tetap mempertahankan kekayaan mikroorganisme Indonesia. Mengingat kekayaan

mikroorganisme Indonesia yang disimpan dalam suatu sistem penyimpanan berstandar internasional akan terus bertambah seiring dengan kegiatan eksplorasi yang terus dilakukan.

Akhir kata, kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu proses penerbitan buku ini. Semoga buku ini dapat menjadi referensi bagi para peneliti, teknisi laboratorium, dan staf administrasi yang terkait dengan pengelolaan koleksi mikroorganisme di Indonesia.

LIPi Press



KATA PENGANTAR

Indonesian Culture Collection (InaCC) adalah pusat depositori koleksi mikroorganisme Indonesia yang dibangun untuk memperkuat fungsi otoritas ilmiah LIPI sebagai pusat acuan dalam pengelolaan sumber daya hayati nasional. Hal ini sejalan dengan implementasi nyata kegiatan *ex situ* konservasi, seperti tertera di dalam Convention on Biological Diversity (CBD) pada Artikel 9. Pembentukan koleksi kultur mikroorganisme Indonesia merupakan salah satu komponen utama pendukung implementasi misi tersebut. Pengembangan InaCC berjalan dengan cepat seiring terjalannya kerja sama antara pemerintah Indonesia dan pemerintah Jepang dalam payung kegiatan JST-JICA yang menggabungkan kegiatan eksplorasi dan studi taksonomi mikroorganisme asli Indonesia sebagai salah satu landasan dasar koleksi mikroorganisme yang dikelola berdasarkan panduan World Federation for Culture Collections (WFCC) dan sistem manajemen ISO 9001:2008.

Sebagai lembaga yang diproyeksikan menjadi sebuah koleksi kultur mikroorganisme internasional, InaCC memerlukan fasilitas koleksi kultur mikroorganisme yang lengkap, valid, dan mempunyai sistem manajemen yang berstandar dan diakui secara internasional. Beberapa dokumen internasional yang diacu oleh InaCC dalam pengelolaan koleksi ini, antara lain adalah *Bonn Guide Line, Nagoya*

Protocol, Microorganism Sustainable Use and Access Regulation International Code of Conduct (MOSAIC) dan *Budapest Treaty*. Pembentukan koleksi kultur yang valid juga sejalan dengan konsep penyediaan sarana penelitian dan pendidikan bertaraf internasional seperti yang telah dijalankan oleh Herbarium Bogoriense untuk koleksi tumbuhan dan Museum Zoological Bogoriense untuk koleksi hewan.

Buku berjudul *Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme InaCC* ini merupakan acuan dalam pengelolaan koleksi mikroorganisme yang berstandar internasional berdasarkan panduan WFCC dan sistem manajemen ISO 9001:2008. Pengelolaan koleksi mikroorganisme meliputi proses deposit mikroorganisme hasil eksplorasi ke InaCC. Proses penyimpanan mikroorganisme dengan teknik standar ini bertujuan untuk mencegah perubahan fisiologis dan genetik dari koleksi mikroorganisme InaCC dan mengurangi risiko kontaminasi yang biasanya terjadi pada proses penyimpanan dengan metode *subculturing* serta prosedur untuk mempertahankan kemurnian dan identitas mikroorganisme yang disimpan.

Informasi tentang prosedur untuk mengakses koleksi mikroorganisme InaCC dan jasa-jasa analisis yang dapat dilakukan di InaCC menjadi bagian penting dari buku ini. Dalam penyajiannya, buku ini dibagi menjadi empat bagian, yaitu Pendahuluan, Manajemen, Pemeliharaan Koleksi InaCC, dan Manajemen Mutu Koleksi Mikroorganisme InaCC.

Bogor, Maret 2018

Dr. Ir. Witjaksono, M.Sc.
Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI



PRAKATA

Prosedur pelaksanaan pengelolaan sangat penting untuk diterapkan guna menjamin kualitas dan standar mutu dari isolat-isolat yang tersimpan di Indonesian Culture Collection (InaCC). Berkaitan dengan itu, penerbitan buku *Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme Indonesian Culture Collection* (InaCC) ini merupakan salah satu upaya untuk memenuhi kebutuhan metode baku dan sistematis, khususnya dalam aktivitas harian terkait manajemen koleksi mikroorganisme. Buku ini berisi panduan sederhana yang harus dilaksanakan oleh *culture collection* terkait sistem manajemen administrasi, pemeliharaan koleksi, dan manajemen mutu isolat yang tersimpan.

Pada Bab I dijelaskan tentang sejarah singkat pembentukan InaCC dan struktur organisasi, sedangkan tata kelola manajemen menjadi topik utama. Penjelasan tersebut dirasa perlu untuk menunjukkan pentingnya pusat koleksi mikroorganisme dalam menjawab tantangan pengelolaan dan pemanfaatan sumber daya hayati Indonesia.

Kemudian, Bab II membahas secara umum tentang sistem manajemen yang diterapkan dalam InaCC, khususnya tentang berbagai prosedur administrasi yang digunakan. Selain itu, bab ini menjelaskan langkah-langkah yang harus dilakukan, baik oleh penge-

lola InaCC sendiri maupun pihak luar yang terkait. Hal tersebut untuk mempermudah penerapan sistem manajemen yang efektif dan efisien dalam tata laksana pengelolaan koleksi.

Selanjutnya, Bab III menjabarkan tentang manajemen dan metode pemeliharaan koleksi mikroorganisme, seperti aktinomisetes, arkea, bakteri, kapang, khamir, dan mikroalga sehingga pemeliharaannya relatif berbeda untuk memperoleh kualitas penyimpanan yang optimal. Bab ini juga menjelaskan secara sistematis metode preservasi mikroorganisme secara runut, langkah demi langkah yang mudah diikuti. Prosedur yang disajikan juga dilengkapi dengan gambar yang relevan untuk mempermudah pemahaman pembaca.

Sementara itu, Bab IV menjelaskan tentang manajemen mutu yang berisi prosedur uji viabilitas dan metode identifikasi. Hal tersebut perlu dilakukan dalam pengelolaan koleksi mikroorganisme untuk menjamin viabilitas dan kemurnian isolat. Dalam manajemen mutu, pembahasan langkah-langkah kerja akan dipisahkan untuk tiap-tiap taksa sehingga mempermudah pemahaman.

Terakhir, Bab V memberikan informasi berupa ringkasan umum dan kesimpulan dari isi buku ini. Bab akhir ini juga dilengkapi dengan lampiran komposisi media yang sesuai dengan aktivitas preservasi dan uji viabilitas.

Panduan ini disiapkan oleh tim untuk membantu pengelolaan koleksi di Indonesian Culture Collection (InaCC), terutama sebagai pedoman bagi para teknisi dan staf yang terlibat dalam pemeliharaan isolat koleksi mikroorganisme. Diharapkan buku ini dapat menjadi pegangan bagi para peneliti, teknisi laboratorium, dan staf administrasi yang terkait dengan pengelolaan koleksi mikroorganisme. Selain itu, juga diharapkan menjadi cikal bakal dan titik tolak penting dalam menjadikan InaCC sebagai rujukan tentang depository mikroorganisme yang berstandar internasional.

Pada kesempatan ini tim penyusun juga mengucapkan banyak terima kasih kepada semua staf dari NITE Biological Resources Center (NBRC) Jepang, yang banyak membantu dalam teknis manajemen *culture collection* di InaCC. Terima kasih khusus juga penulis sampaikan kepada Pusat Penelitian Biologi LIPI dan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI atas dukungan fasilitas dan finansial untuk dapat menyelesaikan buku ini. Tidak lupa kami juga menyampaikan penghargaan dan terima kasih kepada Prof. Dr. Endang Sukara, Prof. Dr. Bambang Prasetya, Dr. Siti Nurmaliati Prijono, Prof. Dr. Enny Sudarmonowati, Dr. Ir. Witjaksono, M.Sc., Dr. Ir. Bambang Sunarko, Dr. Achmad Dinoto, M.Sc., Ir. Ahmad Jauhar Arief, M.Sc., Prof. Dr. Ken-ichiro Suzuki (NBRC), Abdul Karim, dan Gita Azizah Putri serta berbagai pihak yang telah membantu tim sehingga buku panduan ini dapat disusun.

Bogor, Maret 2018

Tim Penyusun

BAB I

MIKROORGANISME DAN InaCC

A. KEKAYAAN DAN PRESERVASI MIKROORGANISME DI INDONESIA

Indonesia adalah negara nomor dua di dunia setelah Brasil yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar. Dengan luas daratan mencapai 1,3% daratan dunia yang terdiri atas hutan tropis, gunung berapi, dan lautan (termasuk luasan dan kedalamannya), Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki tidak kurang dari 42 ekosistem daratan alami dan lima ekosistem lautan. Digambarkan pula bahwa walaupun kawasan Indonesia hanya menempati 1,3% dari dataran bumi, Indonesia memiliki 17% dari seluruh spesies di dunia. Oleh karena itu, sudah sepantasnya Indonesia disebut sebagai negara yang mempunyai sumber “keanekaragaman hayati raksasa” (*mega-biodiversity country*).

Keanekaragaman hayati Indonesia, baik flora, fauna maupun mikroorganisme, sebenarnya merupakan aset strategis yang tak ternilai harganya dan mampu bersaing dalam penentuan posisi tawar bangsa dalam pergaulan global. Nilai-nilai fundamental, seperti pangan, obat dan kesehatan, sosial, etika, kebudayaan dan ekonomi yang dikembangkan berdasarkan keanekaragaman hayati Indonesia menjadi bagian dari agama/spiritualitas, seni, dan literatur sejak awal perkem-

bangun sejarah manusia Nusantara. Kearifan budaya tradisional untuk memanfaatkan dan sekaligus melestarikan keseimbangan lingkungan alamnya adalah bukti nyata Indonesia masih punya predikat “*mega-biodiversity*” kedua di dunia (Bappenas, 2003).

Khusus untuk kekayaan mikroorganismenya, sampai saat ini belum dimanfaatkan secara optimal untuk meningkatkan harkat, martabat, dan kesejahteraan bangsa Indonesia. Ditinjau dari perkembangan ilmu pengetahuan, hasil penelitian menunjukkan bahwa mikroorganismenya memegang peranan penting dalam menghasilkan produk-produk bernilai ekonomi tinggi. Potensi mikroorganismenya Indonesia untuk bidang pertanian (penghasil herbisida alami, pupuk biologis, biokontrol, untuk berbagai jenis penyakit tanaman, probiotik, starter kompos, starter silase, dan antibiotik terbang untuk fumigasi lahan pertanian dan pengepakan buah dan sayuran), bidang kesehatan (sumber penghasil antibiotik, senyawa bioaktif baru, *ion-blocker* untuk pengobatan penyakit kanker dan molekul penangkal infeksi virus, termasuk flu burung, dll.), bidang lingkungan (bioremediator, termasuk untuk menangani pencemaran minyak), bidang pangan (berbagai makanan fermentasi tradisional, seperti tempe yang sudah mendunia, fermentasi kakao, pangan fungsional, dan nutrasetikal) banyak dilakukan secara nasional, baik di LIPI (Sukara dan Lisdiyanti, 2016) maupun di berbagai departemen/ lembaga non-departemen, perguruan tinggi, dan perusahaan swasta di Indonesia. Bahkan, negara-negara maju sangat tertarik untuk mengakses kekayaan mikroorganismenya Indonesia yang masih belum didata dan dieksplorasi secara optimal.

Kekayaan mikroorganismenya Indonesia juga sangat perlu dipergunakan secara optimal untuk kegiatan yang mendukung kegiatan-kegiatan Prioritas Nasional Pemerintah di segala lini prioritas ekonomi. Mikroorganismenya adalah jasad renik yang dapat bermanfaat ataupun merugikan bagi manusia di bidang perikanan, misalnya sebagai

penyebab penyakit ikan; di bidang makanan dan pertanian, misalnya untuk produksi pupuk organik; di bidang peternakan, misalnya untuk kesehatan ternak dan produksi obat ternak berbasis mikroorganisme; di bidang kesehatan, misalnya dalam pencarian obat baru berbasis mikroorganisme; di bidang informasi teknologi, misalnya mengenai pangkalan data mikroorganisme Indonesia yang bermanfaat dan merugikan; dan di bidang pelestarian lingkungan, yaitu konservasi sumber daya mikroorganisme Indonesia dan hasil-hasil turunannya.

Kekayaan mikroorganisme perlu disimpan dengan baik sehingga pemanfaatan selanjutnya dapat dilakukan. Di Indonesia telah ada 18 koleksi kultur mikroorganisme yang bersatu dalam Forum Komunikasi Kurator Koleksi Kultur Mikroorganisme Indonesia (Forkomikro) (Tabel 1.1). Dengan adanya koleksi kultur mikroorganisme yang dikelola dengan baik di Indonesia, tidak dimungkiri percepatan difusi dan pemanfaatan hasil riset yang berbasis mikroorganisme dapat menghasilkan inovasi dalam dunia usaha dan kegiatan sosial ekonomi masyarakat. Koleksi biakan mikroorganisme dapat pula membangkitkan peran masyarakat dalam melestarikan lingkungan dan memanfaatkan mikroorganisme yang telah dieksplorasi juga dalam kegiatan sosial ekonomi dalam rangka menuju masyarakat Indonesia yang sejahtera.

Koleksi kultur mikroorganisme di Indonesia juga sangat erat berhubungan dengan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (Permi) yang didirikan sejak tahun 1977. *FORKOMIKRO Catalogue of Cultures of Indonesian Microorganisms* juga telah diterbitkan bersama pada tahun 2008 (Sjamsuridzal dkk., 2008). Mikroorganisme yang ada di katalog bersama dapat diakses oleh para peneliti mikroorganisme, baik dalam maupun luar negeri.

Tabel 1.1 Daftar Koleksi Kultur Mikroorganisme di Indonesia sampai Tahun 2017

No.	Nama Koleksi Kultur Mikroorganisme dan Alamat
1.	<i>Balivet Culture Collection (BCC)</i> Balai Besar Penelitian Veteriner, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian Jln. R. E. Martadinata No. 30, Bogor 16114
2.	<i>Biofarma Culture Collection (BFCC)</i> PT Bio Farma Jln. Pasteur No. 28, Bandung 40161
3.	<i>Biogen Culture Collection (BiogenCC)</i> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian Jln. Tentara Pelajar 3A, Cimanggu, Bogor 16111
4.	<i>Biotek BPPT Microbial Culture Collection (BioMCC)</i> Laboratorium Mikrobiologi, Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT Kawasan Puspipstek, Serpong, Tangerang 15314
5.	<i>Biotechnology Lemigas Culture Collection (BLCC)</i> R & D Center for Oil and Gas Technology Lembaga Minyak dan Gas Bumi (LEMIGAS) Jln. Cileduk Raya Kav. 109, Cipulir, Jakarta Selatan 12230
6.	<i>BPPT Culture Collection (BPPTCC)</i> Pusat Teknologi Bioindustri, Departemen Teknologi Agroindustri-Bioteknologi Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT Jln. M. H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340
7.	<i>Diponegoro University Culture Collection (DUCC)</i> Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Diponegoro Jln. Prof. Sudarto, SH Tembalang, Semarang 50257
8.	<i>Food and Nutrition Culture Collection (FNCC)</i> Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada Jln. Teknika Utara, Berek, Yogyakarta 55281
9.	<i>IPB Culture Collection (IPBCC)</i> Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor
10.	<i>ITB Culture Collection (ITBCC)</i> Sekolah Farmasi, ITB, Gedung Labtek VII, Jln. Ganesa No. 10, Bandung 40135

No.	Nama Koleksi Kultur Mikroorganisme dan Alamat
11.	<i>Indonesian Culture Collection (InaCC)</i> Pusat Penelitian Biologi, LIPI Jln. Raya Bogor KM 46, Cibinong 16911
12.	<i>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia Culture Collection (MUICC)</i> Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jln. Pegangsaan Timur No. 16, Jakarta 10320
13.	<i>National Center for Fish Quality Control Culture Collection (NCQC CC)</i> National Center for Fish Quality Control and Processing Development Jln. Muara Baru Ujung, Penjaringan, Jakarta Utara 14440
14.	<i>Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi Culture Collection (PAIRCC)</i> Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) Jln. Pasar Jumat, Kebayoran Lama, Jakarta Selatan 12270
15.	<i>RS Paru Dr. H. A. Rotinsulu (RSPRCC)</i> Rumah Sakit Paru Dr. H. A. Rotinsulu, Jln. Bukit Jarian No. 40, Bandung 40293
16.	<i>University of Indonesia Culture Collection (UICC)</i> Departemen Biologi FMIPA, Universitas Indonesia, Kampus UI, Depok 16424
17.	<i>Universitas Udayana Culture Collection (UNUDCC)</i> Lab. Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali
18.	<i>FORDA-CC</i> Kementerian Kehutanan dan Lingkungan Hidup Jln. Gunung Batu No. 5, Bogor 16100

B. GLOBAL ISSUE NAGOYA PROTOCOL ON ACCESS AND BENEFIT SHARING

Untuk mengatur kegiatan eksplorasi, sistem penyimpanan, dan asal-usul mikroorganisme serta memberikan kepastian hukum yang mengatur alur distribusi mikroorganisme Indonesia, diperlukan tata aturan formal dalam bentuk perundang-undangan yang menjamin kelangsungan ketersediaan sumber daya mikroorganisme yang didasari atas manfaat saling menguntungkan bagi pengguna dan pemilik mikroorganisme. Indonesia telah meratifikasi Konvensi Keaneka-

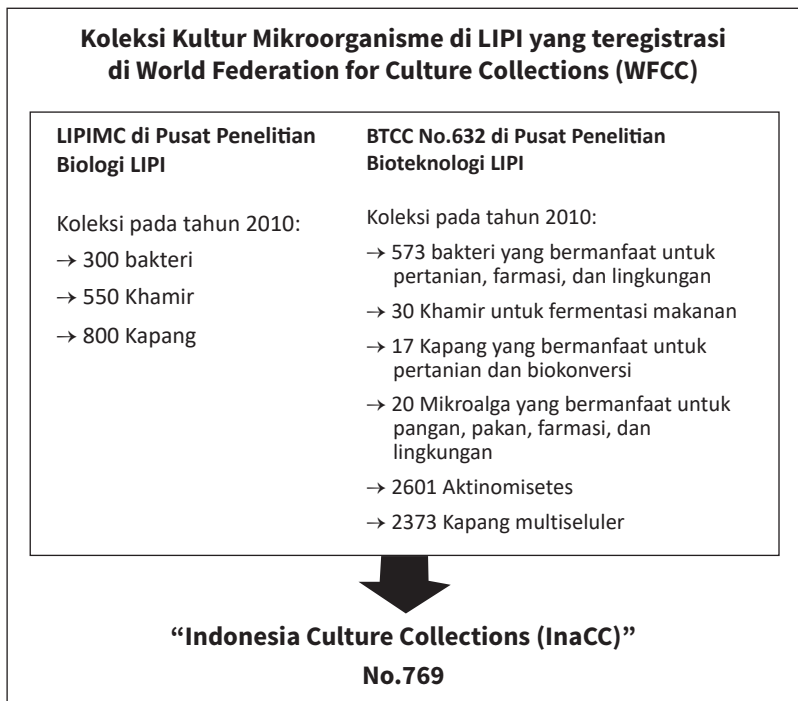
ragaman Hayati (CBD, *Convention on Biological Diversity*) pada 23 Agustus 1994 melalui UU No. 5 Tahun 1994, dan telah berperan aktif dalam beberapa kegiatan *Conference of the Parties* (COP) CBD dan ikut menandatangani Kesepakatan Nagoya (*Nagoya Protocol*) tentang *Access to Genetic Resources and Benefit Sharing for their Utilization* pada 11 Mei 2011, yang merekomendasikan kepada negara anggota untuk mengatur alur kekayaan hayati nasionalnya yang selaras dengan tujuan CBD. Kesepakatan ini memperkuat posisi negara pemilik keanekaragaman hayati. Bahkan, *Nagoya Protocol on Access and Benefit Sharing*, menyebutkan bahwa setiap negara peratifikasi protokol ini direkomendasikan untuk mempunyai lembaga pemerintah yang dapat mengatur alur tersebut. LIPI, sebagai *scientific authority*, sangat tepat sebagai lembaga pemerintah tersebut.

C. INDONESIAN CULTURE COLLECTION (INACC)

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), sampai saat ini, dalam hal eksplorasi kekayaan mikroorganisme telah menjalin kerja sama dengan berbagai perguruan tinggi dan institusi di dalam negeri dan beberapa negara lain, seperti Amerika, Jepang, Australia, dan Jerman. Kerja sama itu telah menghasilkan berbagai jenis mikroorganisme yang sangat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut. Untuk tetap mempertahankan kekayaan mikroorganisme Indonesia, diperlukan sistem dokumentasi, penyimpanan, pemeliharaan, dan pengujian yang berstandar internasional. Kekayaan mikroorganisme Indonesia yang disimpan dalam suatu sistem penyimpanan berstandar internasional akan terus bertambah seiring dengan kegiatan eksplorasi yang terus dilakukan. Untuk mengatur kegiatan eksplorasi, sistem penyimpanan, dan asal-usul mikroorganisme serta memberikan kepastian hukum yang mengatur alur distribusi mikroorganisme di Indonesia, diperlukan tata aturan formal yang menjamin kelangsungan ketersediaan sumber daya mikroorganisme yang didasari atas manfaat saling

menguntungkan bagi pemilik dan pengguna. Sampai saat ini, pemanfaatan mikroorganisme dan fasilitasi penelitian keanekaragaman hayati mikroorganisme Indonesia masih belum diatur dalam suatu bentuk yang jelas.

Jika melihat sejarah, LIPI memiliki dua *culture collection* yang sudah terdaftar di World Data Center for Microorganisms (WDCM), yaitu LIPI Microbial Collection (LIPIMC) Pusat Penelitian Biologi LIPI dan Biotechnology Culture Collection (BTCC) Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Dengan menyinergikan kekuatan yang telah ada berupa jumlah dan jenis koleksi (*holding*), SDM dan spesialisasi (*speciality*), dan melengkapi peralatan (*facilities*) yang dimiliki, Indonesian Culture Collection (InaCC) dapat terwujud (Gambar 1.1).



Gambar 1.1 Koleksi Kultur Mikroorganisme di LIPI

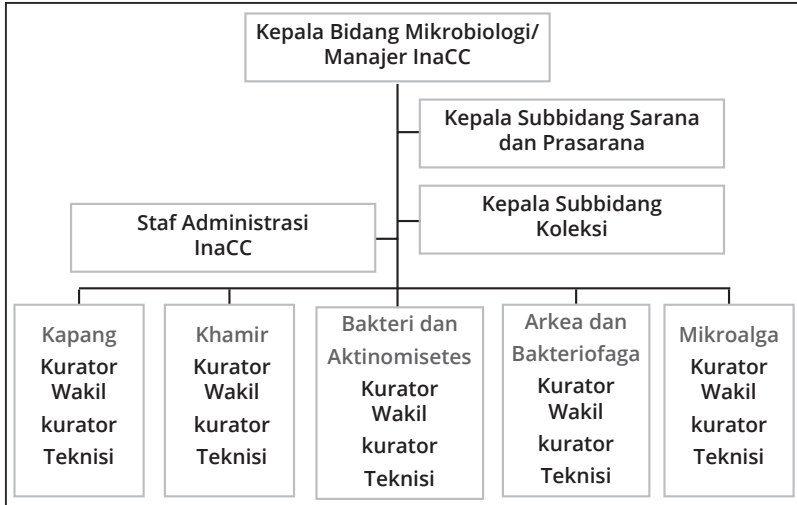
Sampai saat ini InaCC dicanangkan oleh Presiden RI Dr. Susilo Bambang Yudoyono pada 24 Mei 2007 bersamaan dengan peresmian Gedung Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi LIPI. InaCC telah menghasilkan berbagai jenis mikroorganisme yang merupakan aset bangsa dari hasil kegiatan koleksi peneliti Indonesia yang bekerja sama dengan pihak luar. Bahkan, sejak tahun 2000–2016, berbagai hasil penelitian LIPI di bidang mikrobiologi, khususnya taksonomi, LIPI telah menunjukkan perkembangan yang sangat pesat. Beberapa jenis bakteri asam asetat dan aktinomisetes jenis baru (*new genus* dan *new species*) telah ditemukan dan dipublikasikan di jurnal ilmiah internasional (Hamada dkk., 2015, 2016; Hidayat, Meeboon, dan To-Anun, 2007; Kobayashi, Kanti, dan Kawasaki, 2016; Lisdiyanti dkk., 2000, 2001, 2002, 2010; Meebon, Hidayat, To-anun, dan Nakashima, 2007, 2008, 2012, 2013a, 2013b; Mori, Nurcahyanto, Kawasaki, Lisdiyanti, dan Suzuki, 2016a, 2016b; Sukarno dkk., 2009; Nurkanto dkk., 2015a, 2015b, 2016; Siahaan, Hidayat, Kramadibrata, Meebon, dan Takamatsu, 2015; Otoguro dkk., 2009; Yamamura dkk., 2010). Berbagai peluang terbuka luas untuk mencari jenis mikroorganisme baru dan mendapatkan gen-gen potensial serta menggunakannya untuk pembangunan ekonomi dan kesejahteraan bangsa.

LIPI adalah lembaga yang sangat berkomitmen dalam pengelolaan sumber daya hayati dan memiliki SDM yang telah memiliki pola pikir (*mindset*) dalam mengelola InaCC. LIPI telah memiliki peralatan dasar untuk kegiatan pengelolaan InaCC yang cukup memadai melalui hibah JICA-JST dalam *Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development* (SATREPS) Program 2011–2016 yang bertemakan “*Sleeping Microbial Beauties Projects*”. SATREPS adalah program pemerintah Jepang yang mempromosikan kerja sama penelitian luar negeri yang berbasis pada isu-isu global. Dengan adanya prasarana gedung yang memenuhi standar interna-

tional, InaCC menjadi mandiri, berdaya saing di tataran internasional, bermanfaat untuk memajukan perekonomian rakyat dalam hal menjaga kualitas produk berbasis mikroorganisme, dan meningkatkan informasi ilmiah tentang cara memanfaatkan dan menanggulangi kerugian yang diakibatkan oleh sumber daya mikroorganisme.

Jika tidak ada InaCC, sumber daya jasad renik (mikroorganisme) akan hilang tidak tersimpan dan secara langsung berarti hilangnya aset negara. Semua kegiatan tersebut harus ditopang oleh aspek legal yang menjamin keberadaan dan kewenangan InaCC untuk mengoordinasikan dan memfasilitasi konservasi *ex situ* sumber daya mikroorganisme dan menjadi pusat acuan pengelolaan koleksi yang berstandar internasional. Pengembangan *Microbial Culture Collection* juga merupakan fokus pembangunan dalam rangka Program Penelitian, Penguasaan, dan Pemanfaatan Iptek (P3 Iptek).

InaCC yang diresmikan pada 11 September 2014, secara organisasi berada di bawah naungan Pusat Penelitian Biologi dalam lingkup Kedeputian Bidang Ilmu Pengetahuan Hayati (IPH) LIPI. InaCC dipimpin oleh pejabat Eselon III yang bertindak sebagai Manajer InaCC. Dalam bertugas, Manajer InaCC dibantu oleh pejabat Eselon IV untuk mengelola sarana dan prasarana serta koleksi InaCC. Selain itu, terdapat staf administrasi yang membantu mengelola dokumen kegiatan InaCC. Terkait koleksi mikroorganisme InaCC, terdapat lima orang kurator berikut wakilnya untuk tiap-tiap kelompok taksa yang dikoleksi InaCC. Kelompok taksa tersebut, yakni Kapang, Khamir, Bakteri dan Aktinomisetes, Arkea dan Bakteriofaga serta Mikroalga. Adapun ringkasan struktur organisasi yang digunakan dalam mengelola koleksi mikroorganisme di InaCC ditampilkan pada Gambar 1.2. Saat ini, InaCC didukung oleh 12 staf peneliti dan dua teknisi dengan latar belakang taksonomi mikroorganisme.



Gambar 1.2 Struktur Organisasi InaCC

Untuk memudahkan evaluasi dan analisis capaian dalam rangka perbaikan *culture collection*, tugas dan kegiatan InaCC dibagi menjadi enam kegiatan utama, di antaranya:

1. Validasi mikroorganisme koleksi sebagai isolat acuan untuk kegiatan penelitian taksonomi, pendidikan mikrobiologi, dan pengembangan bio-industri.
2. Membangun kerja sama antar-*culture collection* nasional dan internasional.
3. Mendukung kegiatan bioprospeksi.
4. Memperkuat kemampuan taksonom pendukung *culture collection*.
5. Memberikan jasa layanan depository, penyediaan mikroorganisme, identifikasi mikroorganisme, konsultasi, dan pelatihan yang terkait dengan *culture collection*.
6. Membangun pangkalan data mikroorganisme Indonesia sebagai salah satu pusat acuan informasi keanekaragaman hayati.



BAB II

MANAJEMEN DEPOSITORI, DISTRIBUSI, PENERIMAAN JASA, DAN PENANGANAN MIKROORGANISME SECARA UMUM DI InaCC

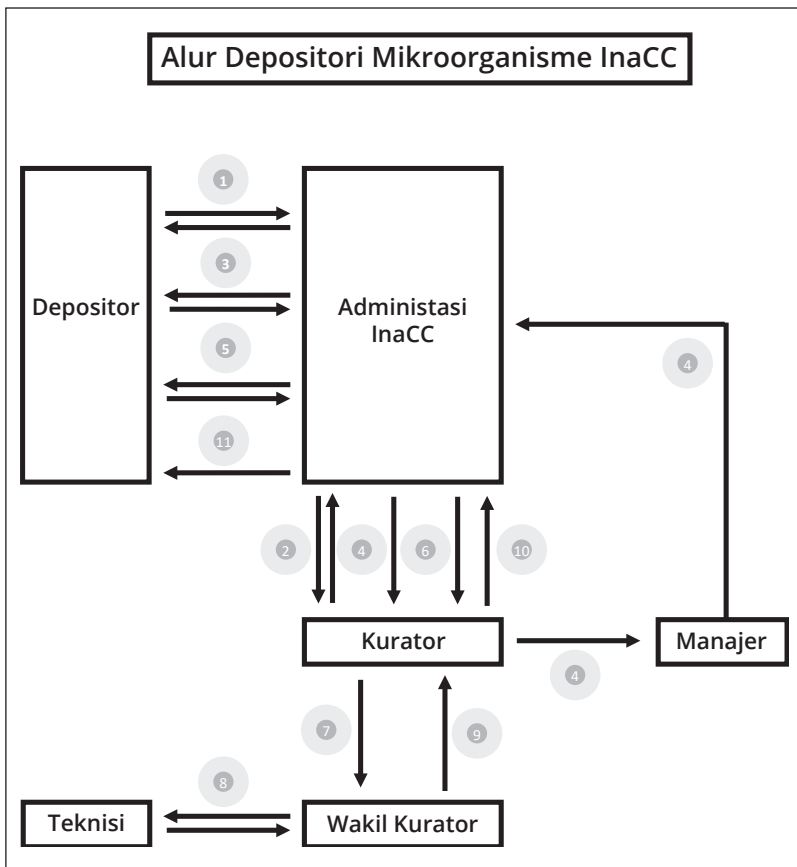
Secara umum, sistem manajemen di koleksi kultur InaCC mencakup kegiatan depositori, distribusi, dan layanan jasa terkait mikroorganisme. Pengelolaan sistem manajemen di InaCC diterapkan berdasarkan standar yang ditetapkan oleh World Federation for Culture Collections (WFCC) dan diintegrasikan dengan sistem manajemen ISO 9001:2008. Sistem manajemen dijalankan melalui sejumlah prosedur, tahapan kerja, dan dokumentasi yang diintegrasikan dengan sistem pangkalan data. Riwayat aktivitas manajemen direkam dalam bentuk dokumen fisik, baik berupa isian catatan/formulir maupun dalam bentuk data elektronik. Sistem manajemen juga mengedepankan standar keselamatan dan keamanan kerja di lingkungan laboratorium InaCC.

A. PROSEDUR DEPOSITORI MIKROORGANISME InaCC

Depositori mikroorganisme InaCC adalah kegiatan penyimpanan isolat mikroorganisme di InaCC. Untuk dapat disimpan dan menjadi koleksi InaCC, terdapat prosedur dan persyaratan minimum yang

harus dipenuhi oleh Depositor. Alur depositori mikroorganisme ke InaCC terangkum dalam Gambar 2.1. Tahap depositori isolat mikroorganisme InaCC adalah sebagai berikut.

1. Depositor mengajukan surat permintaan tertulis dan mengisi tabel *Minimum Data Requirement* (MDR) dalam format Ms. Excel. Kemudian, Depositor menyerahkan surat permintaan tertulis dan tabel MDR yang telah diisi kepada Administrasi InaCC.



Gambar 2.1 Bagan Alur Depositori Isolat Mikroorganisme ke InaCC

2. Administrasi InaCC meminta persetujuan penyimpanan isolat dengan menyerahkan surat permintaan tertulis dan tabel MDR yang telah diisi oleh Depositor kepada Kurator.
3. Kurator menyetujui/tidak menyetujui permintaan Depositor. Apabila disetujui, Depositor diminta untuk mengisi dua formulir, yaitu **Formulir 1** (*Deposition Data Sheet*) dan **Formulir 2** (*MTA for Deposition*) untuk menyimpan isolat mikroorganisme ke InaCC.
4. Kurator dan Manajer InaCC menandatangani **Formulir 1** dan **Formulir 2**, kemudian menyerahkannya ke Administrasi InaCC untuk diproses.
5. Selanjutnya, Administrasi InaCC memberi tahu Depositor dan meminta isolat mikroorganisme yang akan didepositkan.
6. Administrasi InaCC menyerahkan isolat mikroorganisme kepada Kurator yang dituju.
7. Kurator meminta bantuan Wakil Kurator untuk melakukan kendali mutu.
8.
 - a. Wakil Kurator dengan bantuan teknisi melakukan pengecekan kemurnian dan uji viabilitas isolat mikroorganisme (IK TPC dan/atau IK Pengamatan Mikroskop) dan mengisi **Formulir 3** (Kendali Mutu).
 - b. Wakil Kurator dengan bantuan teknisi melakukan validasi isolat sesuai *quality control* (QC) InaCC (IK Identifikasi).
 - c. Wakil Kurator dengan bantuan teknisi mempreservasi isolat (IK Preservasi) dan mengisi **Formulir 4** (*Preservation Sheet*).
9. Wakil kurator menyerahkan hasil preservasi dan identifikasi, kemudian kurator mengklarifikasi hasil preservasi dan identifikasi dengan menyetujui **Formulir 4**. Jika hasilnya telah sesuai, Kurator memberikan nomor InaCC pada **Formulir 1**.

10. Kurator mengembalikan dokumen **Formulir 1** ke Administrasi InaCC dan menyimpan **Formulir 4**.
11. Administrasi InaCC memberi tahu Depositor tentang penomoran InaCC dan memberikan Surat **Formulir 5** (*Request for Certificate*) sesuai dengan permintaan dan menyimpan segala dokumen terkait depositori.

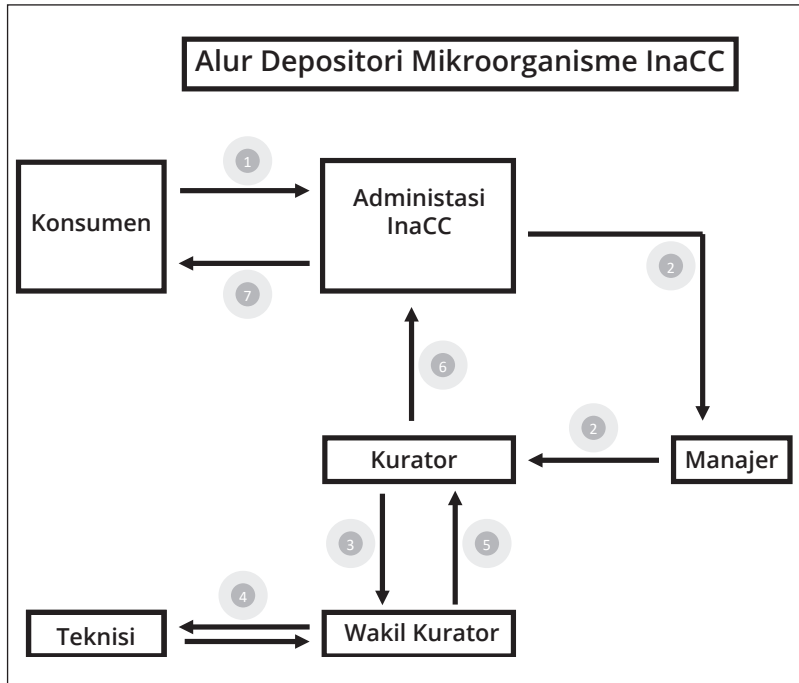
Dokumen Terkait

1. Formulir 1: *Deposition Data Sheet* (**Lampiran 1**)
2. Formulir 2: *MTA for Deposition* (**Lampiran 2**)
3. Formulir 3: Kendali Mutu
4. Formulir 4: *Preservation Sheet* (**Lampiran 3**)
5. Formulir 5: *Request for Certificate* (**Lampiran 4**)

B. PROSEDUR DISTRIBUSI MIKROORGANISME InaCC

Distribusi mikroorganisme InaCC adalah kegiatan penyiapan dan pengiriman isolat mikroorganisme dari InaCC selaku produsen hingga sampai kepada Konsumen/Pengguna/Pelanggan. Alur distribusi mikroorganisme koleksi InaCC terangkum dalam Gambar 2.2. Tahap distribusi isolat mikroorganisme InaCC adalah sebagai berikut.

1. Konsumen menghubungi Administrasi InaCC dan mengisi dua formulir, yaitu **Formulir 6** (*Order Form = permintaan isolat sesuai database InaCC*) dan **Formulir 7** (*MTA for Distribution*).
2. Administrasi InaCC mengajukan pendistribusian koleksi InaCC dengan menyerahkan **Formulir 6** yang telah diisi oleh Konsumen kepada Manajer InaCC dan Kurator.
3. Kurator meneruskan **Formulir 6** kepada Wakil Kurator.
4. Wakil Kurator dengan bantuan teknisi menyiapkan isolat dengan membuka ampul atau menumbuhkan kembali isolat mikro-



Gambar 2.2 Bagan Alur Distribusi Isolat Mikroorganism InaCC

organisme (IK membuka ampul/*freezing*) serta mengecek kemurnian dan identitas (IK TPC & identifikasi) isolat tersebut. Wakil Kurator menyiapkan ampul kembali jika ampul preservasi tersisa dua ampul (IK Preservasi).

5. Wakil Kurator memberikan isolat murni dan **Formulir 6** kepada Kurator.
6. Kurator melakukan validasi dan menyerahkan isolat kepada Administrasi InaCC.
7. Administrasi mengirimkan isolat kepada Konsumen dengan melampirkan **Formulir 8** (*Serah Terima Barang/Jasa*) dan **Formulir 9** (*Pengaduan Pembelian Mikrob Pelanggan*).

- a. Administrasi mendokumentasikan kegiatan distribusi di *Dokumen 1 = Log Book PELAYANAN JASA/DISTRIBUSI*.
- b. Pengaduan harus disampaikan dalam waktu 10 hari.
- c. Pengaduan harus ditanggapi dalam waktu 10 hari.

Dokumen Terkait:

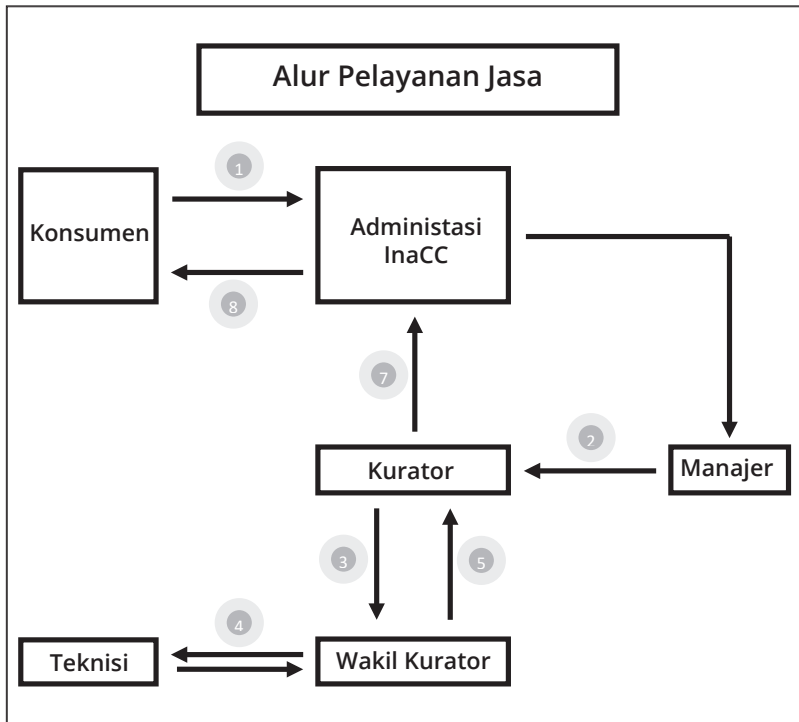
1. Formulir 6: *Order Form* (**Lampiran 5**)
2. Formulir 7: *MTA for Distribution* (**Lampiran 6**)
3. Formulir 8: Serah Terima Barang/Jasa (**Lampiran 7**)
4. Formulir 9: Pengaduan Pembelian Mikrob Pelanggan (**Lampiran 8**)
5. Dokumen 1: *Log Book PELAYANAN JASA/DISTRIBUSI*

C. PROSEDUR PELAYANAN DAN JASA InaCC

Jasa InaCC adalah pelayanan yang diberikan oleh InaCC kepada Konsumen/Pengguna/Pelanggan. Alur pelayanan dan jasa InaCC terangkum dalam Gambar 2.3. Tahapan pelayanan dan jasa InaCC adalah sebagai berikut.

1. Konsumen menghubungi Administrasi InaCC, mengisi dokumen penerimaan jasa (**Formulir 10 & 11**), dan memberikan sampel yang akan diuji.
2. Administrasi InaCC menyerahkan dokumen kepada Manajer InaCC.
3. Manajer InaCC menandatangani **Formulir 10** dan mendisposisi kepada Kurator yang dituju. Administrasi InaCC memberikan sampel kepada Kurator.
4. Kurator meneruskan jasa kepada Wakil Kurator.
5. Wakil Kurator dengan bantuan teknisi mengerjakan jasa dengan IK yang ada di InaCC dan melaporkan hasilnya menggunakan **Formulir 13** (*Laporan Hasil Pengujian*).

6. Wakil Kurator menyerahkan Jawaban **Formulir 14/15/16/17** kepada Kurator.
7. Kurator mengklarifikasi hasil analisis dan jika sudah benar, menyerahkan Laporan Hasil **Formulir 13** kepada Administrasi untuk disampaikan kepada Manajer InaCC.
8. Administrasi melaporkan hasil analisis **Formulir 12** kepada konsumen.



Gambar 2.3 Bagan Alur Pelayanan Jasa InaCC

Dokumen Terkait:

1. Formulir 10: Penerimaan Jasa (**Lampiran 9**)
2. Formulir 11: Form Penerimaan & Penyimpanan Contoh Uji (**Lampiran 10**)
3. Formulir 12: Laporan Analisis (**Lampiran 11**)
4. Formulir 13: Laporan Hasil Identifikasi Mikroorganisme (**Lampiran 12**)
5. Formulir 14: Jawaban Hasil Identifikasi Kapang (**Lampiran 13**)
6. Formulir 15: Jawaban Hasil Identifikasi Bakteri (**Lampiran 14**)
7. Formulir 16: Jawaban Hasil Identifikasi Khamir (**Lampiran 15**)
8. Formulir 17: Jawaban Hasil Identifikasi Aktinomisetes (**Lampiran 16**)
- 9) Dokumen 2: *Log Book* PELAYANAN JASA

D. PROSEDUR AKSES PANGKALAN DATA KOLEKSI MIKROORGANISME InaCC

1. Pangkalan data koleksi mikroorganisme InaCC dibuat dengan menggunakan program IBIS versi 2.0.1.
2. Pangkalan data koleksi mikroorganisme InaCC dapat diakses oleh siapa saja untuk kepentingan ilmiah, industri, perdagangan, atau lainnya dengan batasan-batasan tertentu sesuai dengan kebutuhan masing-masing.
3. Informasi mengenai data umum tentang koleksi mikroorganisme InaCC dapat diakses melalui jaringan internet.
4. Peminat informasi khusus data koleksi mikroorganisme InaCC harus mengajukan permohonan izin kepada Manajer InaCC.
5. Proses pengaksesan pangkalan data koleksi mikroorganisme InaCC selanjutnya akan dilayani dan diatur oleh Manajer Pangkalan Data sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
6. Kebijakan selanjutnya yang berkaitan dengan pengaksesan pangkalan data akan diatur dalam ketentuan tersendiri.

E. PROSEDUR PENGHAPUSAN ATAU PENIADAAN KOLEKSI MIKROORGANISME InaCC

1. Koleksi mikroorganisme yang disimpan di InaCC harus dalam kondisi baku (berstandar internasional sesuai dengan yang ditetapkan oleh WFCC).
2. Koleksi mikroorganisme InaCC yang sudah tidak memenuhi persyaratan baku, yakni yang kehilangan viabilitasnya/terkontaminasi/tidak terpreservasi dengan baik (ampul tidak vakum, retak/pecah) dapat ditiadakan dari daftar koleksi mikroorganisme InaCC.
3. Peniadaan atau penghapusan harus seizin Manajer InaCC.
4. Permohonan izin penghapusan nomor koleksi mikroorganisme InaCC diajukan oleh Kurator kepada Manajer InaCC secara resmi.
5. Rekomendasi penghapusan diberikan atau dapat diputuskan setelah ada pertimbangan dan persetujuan dari tim khusus yang dibentuk oleh Manajer InaCC. Jumlah anggota tim khusus sangat ditentukan oleh nilai atau tingkat kepentingan koleksi tersebut.

F. PROSEDUR KESEHATAN DAN KESELAMATAN KERJA

1. Petugas yang bekerja dengan koleksi mikroorganisme InaCC diwajibkan mematuhi ketentuan kesehatan dan keselamatan kerja.
2. Petugas yang bekerja dengan koleksi mikroorganisme InaCC diharuskan untuk selalu mengenakan jas laboratorium. Petugas yang memanfaatkan fasilitas di ruang-ruang steril diwajibkan mengenakan jas laboratorium. Petugas yang bekerja dengan mikroorganisme dan bahan kimia berbahaya diwajibkan menggunakan sarung tangan dan masker.

G. PROSEDUR PENANGGULANGAN BAHAYA KEBAKARAN

1. Siapa pun tidak diizinkan merokok di dalam gedung InaCC, seperti ruang koleksi mikroorganisme InaCC, ruang proses koleksi mikroorganisme InaCC, dan ruang lain yang terdapat bahan kimia mudah terbakar dan/atau ber-AC.
2. Merokok hanya diperkenankan di luar gedung/tempat merokok yang disediakan dan membuang puntung rokok di tempatnya serta memastikan puntung rokok dalam keadaan mati.
3. Membuang sampah di tempatnya.
4. Selalu membersihkan limbah alkohol dan limbah lainnya setelah menyelesaikan pekerjaan.
5. Segera lapor kepada Kepala Laboratorium apabila menemukan hal-hal yang dicurigai dapat menimbulkan bahaya kebakaran.

H. PROSEDUR PENGAMANAN LINGKUNGAN KERJA

1. Tinggalkan ruangan dalam keadaan terkunci. Pastikan lampu dan aliran listriknya dalam keadaan padam, kecuali peralatan yang memang memerlukan aliran listrik selama 24 jam.
2. Disarankan untuk tidak menyimpan uang dan barang berharga milik pribadi di dalam laboratorium dan/atau ruang kerja masing-masing.
3. Segera melapor kepada petugas keamanan dan/atau Kepala Laboratorium apabila terjadi kehilangan barang/uang di dalam kawasan gedung InaCC.
4. Staf peneliti dan teknisi yang membawa tamu diwajibkan mencatatkan tamunya kepada petugas pencatat di meja penerima tamu dan meminta tanda pengenal bagi tamunya.
5. Segera melaporkan kepada petugas keamanan apabila menemukan pendatang/tamu yang mencurigakan tanpa tanda pengenal berada di dalam gedung InaCC.

6. Peneliti dan teknisi yang akan melakukan kerja lembur di luar jam kerja dan/atau hari libur, baik secara individu maupun kelompok, diwajibkan memberi tahu terlebih dahulu kepada Penanggung Jawab Laboratorium/Manajer InaCC. Tanpa izin dari pejabat yang berwenang, yang bersangkutan tidak diperkenankan melakukan kerja lembur. Petugas pengamanan berhak menolak atau tidak mengizinkan yang bersangkutan masuk ke dalam gedung InaCC apabila tidak dapat menunjukkan bukti izin lembur atau tercatat dalam daftar rencana kerja lembur.
7. Petugas pengamanan berhak memeriksa bawaan (tas/koper/kotak/bungkusan) yang dibawa ke luar gedung InaCC.
8. Jika ditemukan barang yang mencurigakan dalam bawaan tersebut, petugas pengamanan berhak menahan/menyita barang yang dicurigai untuk diserahkan kepada Manajer InaCC guna pemeriksaan lebih lanjut.

BAB III

MANAJEMEN PEMELIHARAAN KOLEKSI MIKROORGANISME InaCC

Sebagai pusat depositori mikroorganisme nasional, salah satu kegiatan utama InaCC adalah melakukan penyimpanan berbagai jenis mikroorganisme hasil eksplorasi. Teknik penyimpanan mikroorganisme di InaCC mengikuti standar yang ditetapkan WFCC, yaitu mikroorganisme disimpan pada kondisi metabolisme inaktif dengan minimal dua metode penyimpanan yang berbeda untuk setiap *strain* mikroorganisme. Prosedur dan teknik penyimpanan disesuaikan dengan karakter mikroorganisme yang akan disimpan. Hal ini bertujuan untuk menjaga viabilitas, validitas, dan stabilitas sel mikroorganisme tersebut ketika disimpan untuk waktu yang lama. Beberapa teknik penyimpanan berbasis metabolisme inaktif yang diterapkan di InaCC, di antaranya sebagai berikut.

1. Penyimpanan Kering-Beku *L-drying*

Penyimpanan kering-beku *L-drying* atau *Lyophilization* adalah metode penyimpanan sel atau spora mikroorganisme dalam ampul pada kondisi kering dan hampa udara. Untuk menurunkan laju kematian sel pada metode penyimpanan ini, ditambahkan media protektif. Kondisi sel atau spora yang kering, hampa udara, dan terlapis media protektif dapat mempertahankan viabilitas dan stabilitas karakter

fenotip dalam rentang waktu yang lama (>10 tahun) karena pada kondisi tersebut sel tidak dapat melakukan aktivitas metabolisme atau berada dalam kondisi dorman. Pada metode ini, suspensi sel/spora mikroorganisme yang sudah dikering-bekukan dan hampa udara di dalam ampul disimpan dalam alat pendingin pada suhu 4°C.

2. Penyimpanan Kering-Beku *Freeze-drying*

Seperti halnya *L-drying*, penyimpanan kering-beku atau *freeze-drying* adalah metode penyimpanan sel atau spora mikroorganisme dalam tabung ampul pada kondisi kering dan hampa udara. Perbedaan dengan *L-drying* terletak pada jenis media protektif dan proses pengering-bekuan. Pada *L-drying*, sel dikeringkan secara evaporasi, sedangkan pada *freeze-drying* sel dikeringkan dengan sublimasi. Kondisi sel yang kering, hampa udara, dan terlapis media protektif akan mempertahankan viabilitas dan stabilitas karakter fenotip dalam rentang waktu yang lama (>10 tahun). Pada metode ini, suspensi sel/spora mikroorganisme dalam ampul yang sudah dikering-bekukan dan hampa udara disimpan pada suhu 4°C.

3. Penyimpanan Beku *Freezing* -80°C

Metode penyimpanan beku dilakukan dengan cara menurunkan suhu di sekitar mikroorganisme sehingga laju metabolisme turun. Penurunan pada suhu tertentu hingga cairan dalam sel membeku akan menyebabkan reaksi biokimia tidak dapat berlangsung sehingga metabolisme terhenti dan sel berada dalam kondisi dorman. Aktivitas metabolisme sel dapat ditekan pada suhu di bawah -70°C. Namun, bentuk kristal es yang lebih stabil dan tidak membahayakan viabilitas sel dicapai pada suhu di bawah -80°C. Untuk mencegah kerusakan sel dan menekan laju kematian sel pada saat *freezing*, digunakan *cryoprotectant*, seperti gliserol, trehalosa, dan DMSO. Kondisi sel yang dorman pada suhu -80°C akan menjaga viabilitas dan stabilitas karakter fenotip sel dalam jangka waktu penyimpanan yang lama (>10 tahun). Penyimpanan beku *freezing* -80°C dapat dilakukan pada

kelompok mikroorganisme yang luas pada taksa arkea, bakteri aktinomisetes, faga, khamir, kapang (berspora atau tidak berspora), dan mikroalga.

A. KOLEKSI ARKEA

Arkea adalah mikroorganisme bersel tunggal yang umumnya hidup pada habitat yang ekstrem. Beberapa karakternya menyerupai sel bakteri dan eukariot. Meskipun demikian, pada tahun 1977 arkea dipisahkan dari kelompok bakteri dan eukariot berdasarkan perbedaan karakter genetik dan biokimianya. Beberapa karakter arkea, di antaranya, memiliki dinding sel yang tidak mengandung peptidoglikan, memiliki RNA polimerase yang kompleks, memiliki tRNA dengan metionin yang tidak termodifikasi, dan memiliki berbagai jenis metabolisme, seperti metanogenesis yang khas pada arkea. Saat ini, InaCC menyimpan arkea sebanyak 86 nomor koleksi yang disimpan dalam bentuk kering-beku *L-drying* dan beku *freezing*. Berikut ini disajikan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan koleksi arkea.

1. Prosedur Penyimpanan *L-drying* Isolat Arkea

a. Alat dan bahan

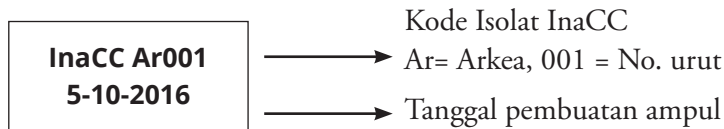
- 1) Isolat murni arkea
- 2) Medium protektif steril dengan kandungan selulosa 2%
- 3) Tabung ampul steril yang telah disumbat kapuk
- 4) Pipet pasteur
- 5) Jarum ose
- 6) Tisu
- 7) Alkohol
- 8) Sarung tangan
- 9) Mesin vakum *L-drying*
- 10) *Gas burner*/Alat pemotong ampul
- 11) Vorteks

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan isolat arkea dalam medium spesifik arkea sekurang-kurangnya satu bulan dalam medium agar miring.
- 2) Siapkan medium protektif untuk kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, 15 menit.
- 3) Siapkan tabung ampul steril dengan sumbat kapuk.

c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai dengan tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.1).
- 3) Tambahkan medium protektif sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang telah ditumbuhi arkea.
- 4) Kerok perlahan sel arkea dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.
- 5) Pindahkan suspensi sel arkea ke tabung reaksi yang baru menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Hitung jumlah koloni yang akan dipreservasi menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) dengan menyebar sebanyak 0,1 mL suspensi pada media agar cawan dan diinkubasi sesuai dengan kondisi optimal pertumbuhan isolat. Jumlah sel yang dipreservasi memiliki kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL.



Gambar 3.1 Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Arkea

- 7) Ambil sisa suspensi sel arkea menggunakan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 8) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pada pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh medium yang telah berisi suspensi sel arkea.
- 9) Pasang tabung ampul dalam mesin *L-drying*, kemudian operasikan mesin hingga suspensi sel menjadi kering dan vakum selama ± 3 jam.
- 10) Potong tabung ampul dari mesin menggunakan *gas burner*. Lakukan pemotongan dengan teknik khusus agar tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
- 11) Pastikan bahwa tabung ampul dalam kondisi vakum dengan memeriksa ampul menggunakan alat penguji vakum (*spark tester*), setelah 24 jam sebelumnya disimpan dalam pendingin bersuhu 4°C . Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali.
- 12) Simpan tabung ampul yang lolos uji vakum dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .
- 13) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas arkea yang disimpan dengan metode *L-drying*.

2. Prosedur Penyimpanan *Freezing* Isolat Arkea

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni arkea dalam cawan petri berisi medium agar
- 2) *Deep freezer* -80°C

- 3) *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 5% (v/v)
- 4) Cawan petri steril
- 5) Pembakar Bunsen
- 6) *Cryotube* 2 mL
- 7) Label *cryotube* + tinta label
- 8) Jarum ose
- 9) Tisu
- 10) Alkohol
- 11) Sarung tangan
- 12) Vorteks

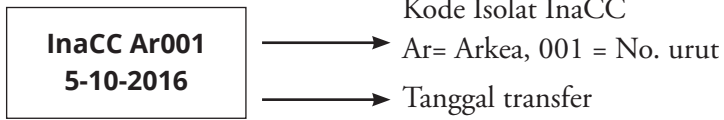
b. Persiapan

- 1) Buat media *cryoprotectant* DMSO 5% (v/v) dengan cara melarutkan DMSO dalam media tumbuhnya.
- 2) Aduk semua bahan sampai larut dan homogen.
- 3) Masukkan larutan 5% DMSO sebanyak 1,7 mL ke dalam *cryotube*.
- 4) Tutup *cryotube* dengan baik dan sedikit longgar.
- 5) Sterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
- 6) Tumbuhkan isolat arkea pada cawan petri berisi media tumbuh spesifik arkea.
- 7) Inkubasi isolat pada suhu 30°C selama 14 hari hingga isolat arkea tumbuh dengan baik.

c. Pelaksanaan

Metode penyimpanan isolat arkea dalam 5% (v/v) DMSO pada suhu -80°C dapat dilakukan melalui langkah-langkah sebagai berikut.

- 1) Siapkan *cryotube* berisi 5% (v/v) DMSO steril dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang dipilih (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Tata Cara Pelabelan *Cryotube* Isolat Arkea

- 2) Kerok koloni arkea menggunakan ose dan masukkan ke dalam *cryotube* yang telah berisi 1,7 mL DMSO 5%. Untuk tiap isolat dibuat sebanyak tiga ulangan.
- 3) Homogenkan *cryotube* yang telah berisi suspensi sel arkea menggunakan vorteks.
- 4) Masukkan *cryotube* ke dalam kotak penyimpanan dan simpan dalam pendingin bersuhu 4°C dengan minimal waktu penyimpanan empat jam dan maksimal waktu penyimpanan 24 jam. Proses ini merupakan tahapan aklimatisasi untuk mencegah protoplasma dan dinding sel arkea rusak yang diakibatkan oleh perubahan suhu.
- 5) Tahap selanjutnya, pindahkan kotak penyimpanan ke dalam *deep freezer* bersuhu -80°C.
- 6) Simpan dua *cryotube* sebagai *seed* dan *permanent stock* pada *deep freezer* yang sudah ditentukan.
- 7) Satu *cryotube* digunakan sebagai stok dalam pendistribusian mikroorganisme.
- 8) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum *cryotube* disimpan pada *deep freezer*.

B. KOLEKSI AKTINOMISETES

Aktinomisetes adalah kelompok bakteri Gram positif dengan kandungan *guanine cytosine* (GC) yang tinggi pada DNA genomnya. Sebagian besar aktinomisetes merupakan bakteri berfilamen yang memanjang dan membentuk hifa bercabang yang selanjutnya membentuk miselium. Sebagian anggota kelompok aktinomisetes ini juga



Gambar 3.3 Penampilan Morfologi Koloni Isolat Aktinomisetes yang Ditumbuhkan pada Media *Yeast Starch Agar* (YSA)

menghasilkan spora yang tahan kering untuk melanjutkan siklus hidupnya (Gambar 3.3). Aktinomisetes banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa metabolit berpotensi obat.

Jumlah koleksi aktinomisetes di InaCC mencapai 392 nomor. Aktinomisetes tersebut dikoleksi dari berbagai wilayah di Indonesia yang di antaranya merupakan *strain* tipe jenis baru.

Berikut ini disajikan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan koleksi aktinomisetes InaCC.

1. Prosedur Penyimpanan *L-drying* Isolat Aktinomisetes

a. Alat dan bahan

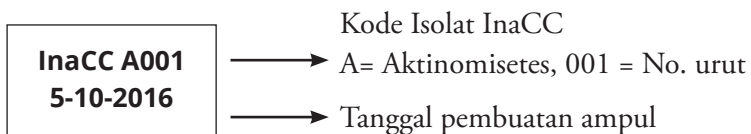
- 1) Isolat murni aktinomisetes
- 2) Media protektif steril
- 3) Tabung ampul steril yang telah disumbat kapuk
- 4) Pipet pasteur
- 5) Jarum ose
- 6) Tisu
- 7) Alkohol
- 8) Sarung tangan
- 9) Mesin vakum *L-drying*
- 10) *Gas burner*
- 11) Vorteks

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan isolat aktinomisetes pada media *International Streptomyces Project 2* (ISP2) atau YSA agar miring sekurang-kurangnya tujuh hari.
- 2) Siapkan media protektif untuk kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, 15 menit.
- 3) Siapkan tabung ampul steril dengan sumbat kapuk.

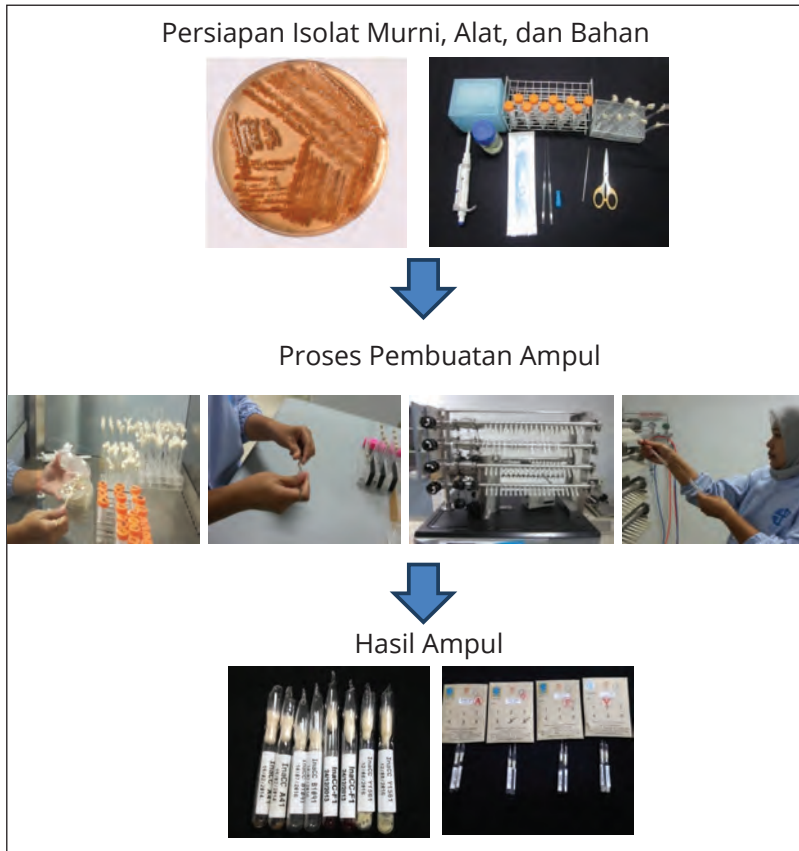
c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.4).
- 3) Tambahkan media protektif sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang telah ditumbuhi aktinomisetes.
- 4) Kerok perlahan sel aktinomisetes dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.
- 5) Pindahkan suspensi sel aktinomisetes ke tabung reaksi yang baru menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Hitung jumlah koloni yang akan dipreservasi menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) dengan menyebar sebanyak 0,1 mL suspensi pada media agar cawan dan diinkubasi sesuai dengan kondisi optimal pertumbuhan isolat. Jumlah sel yang dipreservasi memiliki kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL.



Gambar 3.4 Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Aktinomisetes

- 7) Ambil suspensi sel aktinomisetes menggunakan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 8) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pada pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi isolat.
- 9) Pasang tabung ampul dalam mesin *L-drying*, kemudian operasikan mesin hingga suspensi sel menjadi kering dan vakum selama ± 3 jam.
- 10) Potong ampul dari mesin dengan menggunakan *gas burner*. Lakukan pemotongan dengan teknik khusus agar tabung tetap dalam kondisi hampa udara (Gambar 3.5).
- 11) Pastikan bahwa tabung ampul dalam kondisi vakum dengan memeriksa ampul menggunakan alat penguji vakum (*spark tester*), setelah 24 jam sebelumnya disimpan dalam pendingin bersuhu 4°C . Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 12) Simpan tabung ampul yang lolos uji vakum dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .
- 13) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas aktinomisetes yang disimpan dengan metode *L-drying*.



Gambar 3.5 Prosedur Penyimpanan Kering-beku *L-drying* Aktinomisetes



Keterangan: Tabung ampul yang vakum menghasilkan cahaya warna biru muda atau ungu muda (a), sedangkan tabung ampul yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya (b).

Gambar 3.6 Pengujian kevakuman tabung ampul menggunakan *spark tester*.

2. Prosedur Penyimpanan *Freeze-drying* Isolat Aktinomisetes

a. Alat dan bahan

- 1) Isolat murni aktinomisetes
- 2) Media protektif 20% (w/v) susu skim
- 3) Tabung ampul steril dengan sumbat kapuk
- 4) Pipet pasteur
- 5) Jarum ose
- 6) Tisu
- 7) Alkohol
- 8) Sarung tangan
- 9) Mesin vakum *freeze-drying*
- 10) *Freezer* -80°C
- 11) *Gas burner*
- 12) Vorteks

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan isolat aktinomisetes pada media ISP2 atau YSA miring sekurang-kurangnya tujuh hari.
- 2) Siapkan media protektif untuk kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, 15 menit.
- 3) Siapkan tabung ampul steril dengan sumbat kapuk.

c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai dengan tata cara pelabelan yang telah ditentukan.
- 3) Tambahkan media protektif susu skim sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang telah ditumbuhi aktinomisetes.
- 4) Kerok perlahan sel aktinomisetes dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.

- 5) Pindahkan suspensi sel aktinomisetes ke tabung reaksi yang baru menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Hitung jumlah koloni yang akan dipreservasi menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) dengan menyebarkan sebanyak 0,1 mL suspensi pada media agar cawan dan diinkubasi sesuai dengan kondisi optimal pertumbuhan isolat. Jumlah sel yang dipreservasi memiliki kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL.
- 7) Ambil suspensi sel aktinomisetes dengan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 8) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi isolat.
- 9) Masukkan tabung ampul dalam *freezer* -80°C selama 12 jam.
- 10) Pasang tabung ampul dalam mesin *freeze-drying*, kemudian operasikan mesin hingga sel kering dan ampul vakum selama ± 3 jam.
- 11) Potong ampul dari mesin menggunakan *gas burner*. Lakukan pemotongan dengan teknik khusus agar tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
- 12) Pastikan bahwa tabung ampul dalam kondisi vakum dengan memeriksa ampul menggunakan alat pengujian vakum (*spark tester*), setelah 24 jam sebelumnya disimpan dalam pendingin bersuhu 4°C . Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 13) Simpan tabung ampul yang lolos uji vakum dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .

- 14) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas aktinomisetes yang disimpan dengan metode *L-drying*.

3. Prosedur Penyimpanan *Freezing* Isolat Aktinomisetes

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni aktinomisetes dalam cawan petri berisi media agar
- 2) Sedotan plastik steril
- 3) Gliserol 10% (v/v)
- 4) *Deep freezer* -80°C
- 5) Cawan petri steril
- 6) Tusuk sate/tusuk gigi steril
- 7) Pembakar bunsen
- 8) *Cryotube* 2 mL
- 9) Label *cryotube* + Tinta printer
- 10) Jarum ose
- 11) Tisu
- 12) Alkohol
- 13) Sarung tangan

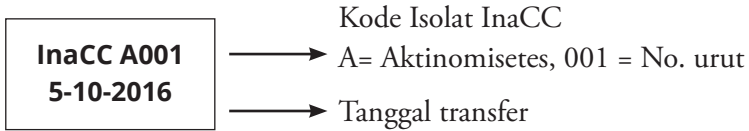
b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan isolat aktinomisetes dalam media ISP2 atau YSA sekurang-kurangnya 7 hari.
- 2) Siapkan *cryoprotectant* 10% (v/v) gliserol dan masukkan ke dalam *cryotube* untuk kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, 15 menit.

c. Pelaksanaan

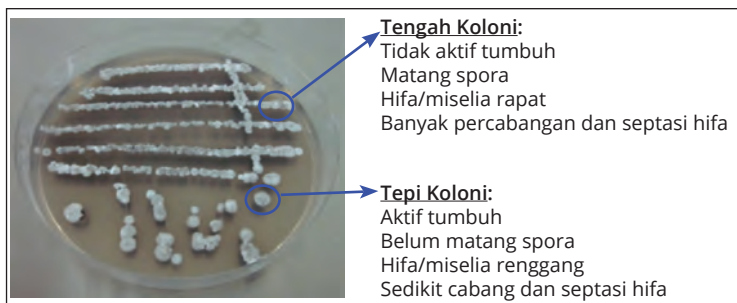
Metode penyimpanan isolat aktinomisetes dalam 10% (v/v) gliserol pada suhu -80°C dapat dilakukan melalui langkah-langkah sebagai berikut.

- 1) Siapkan *cryotube* dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang dipilih (Gambar 3.7).

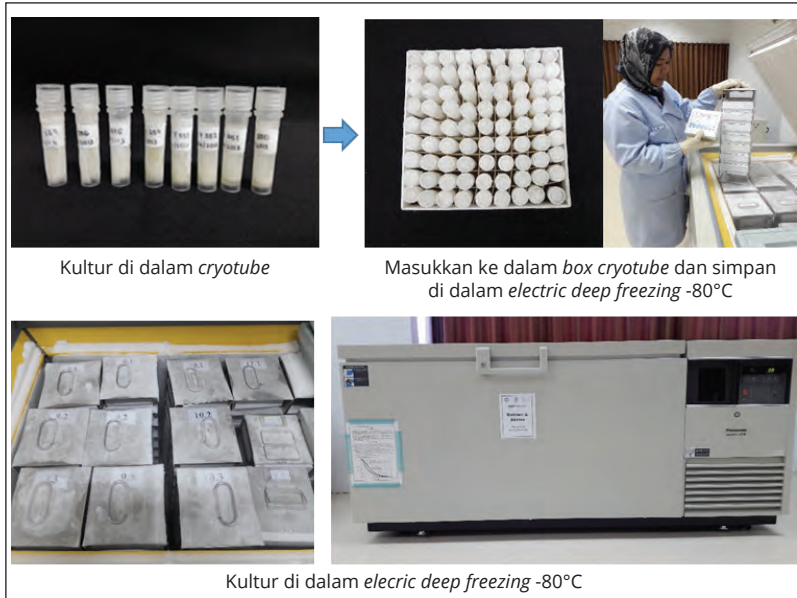


Gambar 3.7 Tata Cara Pelabelan *Cryotube* Aktinomisetes

- 2) Pilihlah koloni aktinomisetes dengan pertumbuhan terbaik dan matang, kemudian dibuat dalam bentuk cakram menggunakan sedotan plastik steril.
 - ➔ Agar hasil penyimpanan sempurna dan representatif, pengambilan isolat dapat dilakukan pada beberapa bagian pertumbuhan koloni (Gambar 3.8).
- 3) Pindahkan cakram agar koloni aktinomisetes (8–10 cakram) ke dalam *cryotube* berisi 1 mL gliserol 10% steril secara aseptik.
- 4) Masukkan tabung dalam kotak penyimpanan dan simpan dalam pendingin bersuhu 4°C selama satu malam, kemudian pindahkan tabung dalam *deep freezer* bersuhu -80°C (Gambar 3.9).



Gambar 3.8 Tata Cara Pengambilan Isolat Aktinomisetes

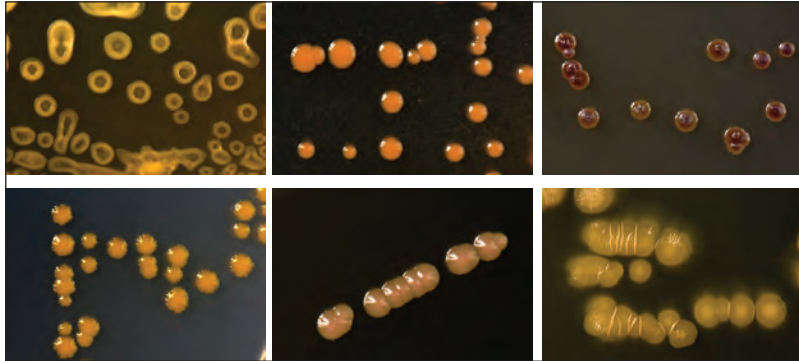


Gambar 3.9 Penyimpanan Beku *Freezing -80°C*

- 5) Dua *cryotube* disimpan sebagai *seed* dan *permanent stock* pada *deep freezer* yang sudah ditentukan. Satu *cryotube* digunakan sebagai stok dalam pendistribusian mikroorganisme.
- 6) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum menyimpan pada *deep freezer*.

C. KOLEKSI BAKTERI

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal dengan struktur internal yang sederhana. Sebagian besar bakteri memiliki kromosom tunggal dengan bentuk sirkuler yang terdapat di sitoplasma. Bentuk sel bakteri bermacam-macam, yaitu bulat, batang, dan spiral (Gambar 3.10). Bakteri dapat ditemukan pada berbagai jenis habitat dan memiliki banyak tipe metabolisme. Produk metabolisme bakteri, seperti antibiotik, enzim, vitamin, dan hormon banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi, pangan, dan pertanian.



Gambar 3.10 Penampilan Morfologi Koloni Beberapa Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang saat ini telah dikoleksi oleh InaCC berjumlah 1.211 nomor. Koleksi tersebut terdiri atas berbagai jenis bakteri yang berhasil diisolasi dari sejumlah wilayah di Indonesia melalui kegiatan eksplorasi. Sebagian besar koleksi bakteri InaCC merupakan anggota Filum Proteobacteria dan Filum Firmicutes.

Berikut ini disajikan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan koleksi mikroorganisme bakteri di InaCC.

1. Prosedur Penyimpanan *L-drying* Isolat Bakteri

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni bakteri
- 2) Mesin ampul *L-drying*
- 3) *Gas burner* untuk memotong ampul
- 4) Tabung ampul steril yang telah disumbat kapuk
- 5) Batang besi untuk memasukkan kapuk ke dalam tabung ampul
- 6) Pipet pasteur steril dengan karet pengisap
- 7) Jarum ose
- 8) Media protektif untuk bakteri: 3 g Na-Glutamat, 1,5 g Adonitol, 0,05 g *L-cysteine hydrochloride*, Buffer Fosfat 0,1 M pH 7,0 (1,74 g K_2HPO_4 ; 1,36 g KH_2PO_4 ; 100 mL akuades)

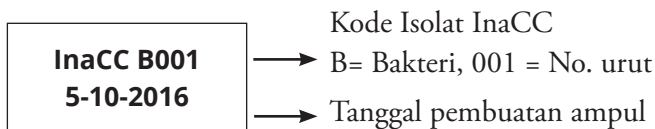
- 9) Pembakar bunsen
- 10) Sarung tangan
- 11) Vorteks

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan bakteri yang akan diampul dalam media agar miring.
- 2) Sterilisasi media protektif menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).
- 3) Siapkan tabung ampul yang sudah disumbat dengan kapuk, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).
- 4) Siapkan pipet pasteur yang sudah disumbat dengan kapas kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).
- 5) Siapkan tabung reaksi kosong yang sudah disumbat dengan kapas kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).

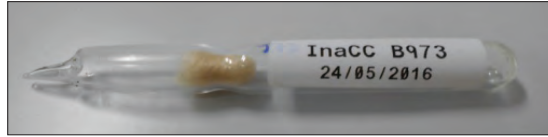
c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.11).
- 3) Tambahkan media protektif sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang telah ditumbuhi oleh bakteri (Gambar 3.12).
- 4) Kerok perlahan sel bakteri dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.



Gambar 3.11 Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Bakteri

- 5) Pindahkan suspensi sel bakteri ke tabung reaksi yang baru menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Lakukan perhitungan jumlah sel awal bakteri yang akan diampul menggunakan metode ALT dengan menyebar 0,1 mL suspensi pada media agar cawan dan diinkubasi sesuai kondisi optimal pertumbuhan isolat. Jumlah sel yang di-preservasi memiliki kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL.
- 7) Ambil suspensi sel bakteri menggunakan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 8) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pada pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi suspensi isolat.
- 9) Tiap tabung ampul disusun dalam mesin vakum *L-drying*, kemudian operasikan mesin hingga suspensi sel kering dan vakum.
- 10) Potong ampul dari mesin dengan *gas burner* menggunakan teknik khusus supaya tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
- 11) Pastikan bahwa tabung ampul dalam kondisi vakum dengan menggunakan alat penguji kevakuman (*spark tester*) setelah tabung disimpan selama 24 jam dalam pendingin bersuhu 4°C . Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 12) Ampul yang mempunyai kondisi vakum yang baik disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .



Gambar 3.12 Tabung Ampul Hasil Penyimpanan Isolat Bakteri dengan Metode *L-drying*

- 13) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas bakteri yang disimpan dengan metode *L-drying*.

2. Prosedur Penyimpanan *Freeze-drying* Isolat Bakteri

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat bakteri yang telah murni
- 2) Mesin *Freeze-drying*
- 3) *Gas burner* untuk memotong ampul
- 4) *Freezer* -80°C
- 5) Tabung ampul yang telah steril dan telah disumbat kapuk
- 6) Batang besi untuk memasukkan kapuk ke dalam tabung ampul
- 7) Pipet pasteur steril dengan karet pengisap
- 8) Jarum ose
- 9) Media protektif untuk bakteri: 20% (w/v) susu skim
- 10) Pembakar bunsen
- 11) Sarung tangan
- 12) Vorteks

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan bakteri yang akan diampul dalam agar miring.
- 2) Sterilisasi media protektif (20% (w/v) susu skim) menggunakan autoklaf (110°C , 1 atm, 15 menit).
- 3) Siapkan tabung ampul yang sudah disumbat dengan kapuk, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C , 1 atm, 15 menit).

- 4) Siapkan pipet pasteur yang sudah disumbat dengan kapas, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).
- 5) Siapkan tabung reaksi kosong yang sudah disumbat dengan kapas, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).

c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai tata cara pelabelan.
- 3) Tambahkan media protektif susu skim sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang telah ditumbuhi bakteri.
- 4) Kerok perlahan sel bakteri dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.
- 5) Pindahkan suspensi sel bakteri ke tabung reaksi yang baru menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Lakukan perhitungan jumlah sel awal bakteri yang akan dipreservasi menggunakan metode ALT. Jumlah sel yang dipreservasi memiliki kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL.
- 7) Ambil suspensi sel bakteri menggunakan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 8) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi suspensi isolat.
- 9) Masukkan tabung ampul dalam *freezer* -80°C selama 12 jam.

- 10) Susunlah tabung ampul dalam keadaan beku dalam mesin *freeze drying*, operasikan mesin hingga sel kering dan ampul vakum.
- 11) Potong ampul dari mesin menggunakan *gas burner* dengan teknik khusus supaya tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
- 12) Pastikan bahwa tabung dalam kondisi vakum dengan memeriksa tabung ampul menggunakan alat penguji kevakuman (*spark tester*) setelah disimpan selama 24 jam dalam pendingin bersuhu 4°C. Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 13) Simpan ampul yang mempunyai kondisi vakum yang baik dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.
- 14) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas isolat bakteri yang disimpan dengan metode *freeze-drying*.

3. Prosedur Penyimpanan *Freezing* Isolat Bakteri

a. Alat dan Bahan

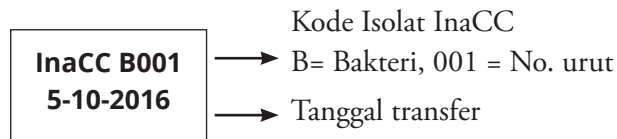
- 1) Isolat murni bakteri
- 2) *Deep freezer* -80°C
- 3) Gliserol 10% (v/v)
- 4) *Cryotube* 2 mL yang telah ditempel label sesuai kode bakteri
- 5) Jarum ose
- 6) Pembakar bunsen
- 7) Tisu
- 8) Alkohol
- 9) Sarung tangan
- 10) Vorteks

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan bakteri pada media padat yang sesuai dengan jenis bakteri yang akan dipreservasi.
- 2) Buatlah larutan 10% (v/v) gliserol.
- 3) Masukkan larutan gliserol 10 % (v/v) sebanyak 1,5 mL ke dalam *cryotube*.
- 4) Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
- 5) Pastikan *Deep freezer* -80°C dapat bekerja dengan baik.

c. Pelaksanaan

- 1) Siapkan *cryotube* yang diberi label sesuai tata cara pelabelan yang dipilih (Gambar 3.13).



Gambar 3.13 Tata Cara Pelabelan *Cryotube* Isolat Bakteri

- 2) Secara aseptik, kerok sel bakteri menggunakan ose dan masukkan ke dalam *cryotube* yang telah berisi 1,5 mL larutan gliserol. Untuk tiap isolat, dibuat tiga buah *cryotube*.
- 3) Homogenkan *cryotube* yang telah berisi suspensi sel bakteri menggunakan vorteks.
- 4) Masukkan *cryotube* ke dalam kotak penyimpanan dan simpan dalam pendingin bersuhu 4°C dengan minimal waktu penyimpanan empat jam dan maksimal waktu penyimpanan 24 jam. Proses ini merupakan tahapan aklimatisasi untuk mencegah dinding sel bakteri rusak yang diakibatkan oleh perubahan suhu.
- 5) Pindahkan kotak penyimpanan dalam *deep freezer* bersuhu -80°C.

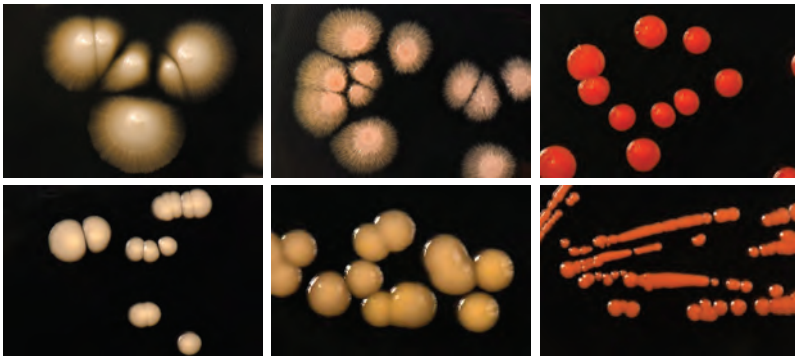


Gambar 3.14 Isolat yang Disimpan dalam *Cryotube* dengan Metode *Freezing*

- 6) Simpanlah dua *cryotube* sebagai *seed* dan *permanent stock* pada *deep freezer* yang sudah ditentukan (Gambar 3.14).
- 7) Satu *cryotube* digunakan sebagai stok dalam pendistribusian mikroorganisme.
- 8) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum *cryotube* disimpan pada *deep freezer*.

D. KOLEKSI KHAMIR

Khamir adalah anggota kerajaan fungi yang bersel tunggal. Khamir memiliki kemampuan dalam memanfaatkan berbagai jenis gula sebagai sumber karbonnya. Jenis sumber karbon yang dimanfaatkan



Gambar 3.15 Penampilan Morfologi Koloni Beberapa Isolat Khamir

khamir tersebut dapat dijadikan penciri suatu marga khamir. Saat ini, jumlah koleksi khamir di InaCC mencapai 1.575 nomor, dengan penampilan morfologi koloni yang bervariasi (Gambar 3.15). Sumber koleksi khamir sebagian besar berasal dari kegiatan eksplorasi yang dilakukan di berbagai wilayah di Indonesia. Sebagian isolat khamir yang terdeposit di InaCC tersebut memiliki potensi dalam usaha pengembangan energi alternatif.

Berikut ini disajikan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan koleksi mikroorganisme khamir di InaCC.

1. Prosedur Penyimpanan *L-drying* Isolat Khamir

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni khamir
- 2) Media protektif dan media tumbuh yang steril
- 3) Tabung ampul steril yang telah disumbat kapuk
- 4) Vorteks
- 5) Label + tinta label
- 6) Rak tabung ampul
- 7) Pipet pasteur
- 8) Pembakar bunsen
- 9) Ose steril
- 10) Tisu
- 11) Alkohol
- 12) Sarung tangan
- 13) Mesin vakum *L-drying*
- 14) *Gas burner* untuk memotong ampul

b. Persiapan

- 1) Pembuatan media

Media protektif: terdiri atas **Media A** dengan komposisi *Polyvinylpyrrolidone* (K.90) 6 g, laktosa 5 g, akuades 75.

Media B: Na-glutamat monohidrat 3 g, 1 M *buffer* kalium

mL fosfat (pH 7,0) 10 mL, akuades 15 mL. Sterilisasi media A menggunakan autoklaf pada kondisi 121°C, 1 atm, 15 menit, sedangkan sterilisasi media B menggunakan filter steril.

Media pertumbuhan khamir: menggunakan *potato dextrose agar* (PDA, OXOID, CM0139) dan atau *yeast malt extract agar* (YMA). PDA dibuat mengikuti petunjuk pada merk bahan yaitu sebanyak 39 g dilarutkan dalam 1 L akuades, sedangkan YMA dibuat dengan komposisi *yeast extract* 3 g, *malt extract* 3 g, pepton 5 g, glukosa 10 g, dan agar 20 g yang dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian, tiap-tiap media yang telah dilarutkan tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf. Selanjutnya, media PDA atau YMA yang telah steril dibuat dalam bentuk agar miring dan agar cawan.

2) Menumbuhkan khamir

Isolat khamir ditumbuhkan pada media PDA atau YMA menggunakan ose secara aseptik. Kemudian, diinkubasi pada suhu ruang sekitar tiga hari sampai isolat tumbuh dengan baik.

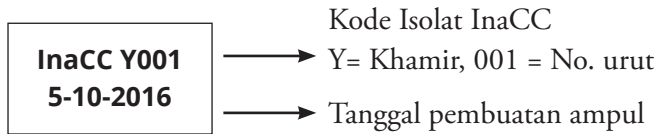
3) Persiapan tabung ampul dan tabung reaksi steril

Tabung ampul yang sudah ditutup dengan sumbat kapuk dan tabung reaksi kosong disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, selama 15 menit.

c. Pelaksanaan

1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.

2) Siapkan ampul dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.16).



Gambar 3.16 Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Khamir

- 3) Tambahkan medium protektif sebanyak 1 mL ke dalam agar miring yang telah ditumbuhi khamir.
- 4) Kerok perlahan sel khamir dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.
- 5) Pindahkan suspensi sel khamir ke tabung reaksi kosong yang telah disterilisasi menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Sebanyak 0,1 mL disebar pada agar cawan untuk melakukan ALT dan hitung jumlah koloni khamir.
- 7) Pastikan bahwa jumlah koloni yang akan dipreservasi mencapai kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL menggunakan metode ALT.
- 8) Ambil sisa suspensi sel khamir menggunakan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 9) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pada pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh medium yang telah berisi suspensi sel isolat.
- 10) Susunlah tiap tabung ampul dalam mesin vakum *L-drying*, kemudian operasikan mesin hingga suspensi sel kering dan vakum selama ± 3 jam.
- 11) Potong ampul dari mesin menggunakan *gas burner* dengan teknik khusus supaya tabung tetap dalam kondisi hampa udara.

- 12) Pastikan bahwa tabung dalam kondisi vakum dengan memeriksa ampul menggunakan alat penguji kevakuman (*spark tester*) setelah disimpan selama 24 jam dalam pendingin pada suhu 4°C. Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 13) Simpan ampul yang mempunyai kondisi vakum yang baik dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.
- 14) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas khamir yang disimpan dengan metode *L-drying*.

2. Prosedur Penyimpanan *Freeze-drying* Isolat Khamir

Metode *freeze-drying* hampir sama dengan *L-drying* dari segi alat dan bahan proses pengerjaannya.

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni khamir
- 2) Medium protektif 20% (w/v) susu skim
- 3) Tabung ampul steril yang telah disumbat kapuk
- 4) Vorteks
- 5) Label + tinta label
- 6) Rak tabung ampul
- 7) Pipet pasteur
- 8) Pembakar bunsen
- 9) Ose steril
- 10) Tisu
- 11) Alkohol
- 12) Sarung tangan
- 13) Mesin vakum *freeze-drying*
- 14) *Freezer* -80°C
- 15) *Gas burner* untuk memotong ampul

b. Persiapan

- 1) Siapkan media protektif khamir dengan komposisi 20 g susu skim dilarutkan ke dalam 80 mL akuades (disterilisasi).
- 2) Siapkan media *potato dextrose agar* (PDA) atau *yeast malt extract agar* (YMA) sebagai media tumbuh khamir (lihat metode *L-drying*).
- 3) Siapkan tabung ampul yang sudah ditutup kapuk dan tabung reaksi kosong yang telah disterilisasi (lihat metode *L-drying*).
- 4) Tumbuhkan khamir pada media agar cawan PDA atau agar cawan YMA dan inkubasi isolat pada suhu kamar selama tiga hari.

c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan.
- 3) Tambahkan media protektif sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang telah ditumbuhi khamir.
- 4) Kerok perlahan sel khamir dengan jarum ose dan suspensikan dengan pipet pasteur.
- 5) Pindahkan suspensi sel khamir ke tabung reaksi yang baru menggunakan pipet pasteur dan homogenkan dengan vorteks.
- 6) Sebanyak 0,1 mL disebar pada agar cawan untuk melakukan ALT dan hitung jumlah koloni khamir.
- 7) Pastikan bahwa jumlah sel yang akan dipreservasi mencapai kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL dengan menggunakan metode ALT.
- 8) Ambil sisa suspensi sel khamir menggunakan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan



Gambar 3.17 Tabung Ampul Hasil Penyimpanan Isolat Khamir dengan Metode *L-drying*

- volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat (Gambar 3.17).
- 9) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi suspensi sel isolat.
 - 10) Masukkan ampul dalam *freezer* -80°C selama 12 jam.
 - 11) Pasang dan susunlah tiap tabung ampul dalam mesin *freeze-drying*, kemudian operasikan mesin hingga kering dan ampul vakum selama ± 3 jam.
 - 12) Potong ampul dari mesin menggunakan *gas burner* dengan teknik khusus supaya tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
 - 13) Pastikan bahwa tabung dalam kondisi vakum dengan memeriksa tabung menggunakan alat penguji kevakuman (*spark tester*) setelah disimpan selama 24 jam dalam pendingin pada suhu 4°C . Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
 - 14) Simpan ampul yang mempunyai kondisi vakum yang baik dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .

- 15) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas khamir yang disimpan dengan metode *freeze-drying*.

3. Prosedur Penyimpanan *Freezing* Isolat Khamir

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni khamir
- 2) *Deep freezer* -80°C
- 3) Gliserol
- 4) Trehalosa
- 5) Cawan petri steril
- 6) Pembakar bunsen
- 7) *Cryotube* 2 mL
- 8) *Cryo* label + tinta printer
- 9) Ose plastik
- 10) Tisu
- 11) Alkohol
- 12) Sarung tangan
- 13) Vorteks

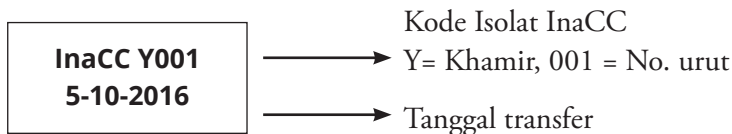
b. Persiapan

- 1) Siapkan media *potato dextrose agar* (PDA) atau *yeast malt extract agar* (YMA) sebagai media tumbuh khamir.
- 2) Siapkan media *cryoprotectant* gliserol 10% dengan cara melarutkan gliserol 10 mL dan trehalosa 5 g dalam akuades.
- 3) Tumbuhkan khamir pada media agar cawan PDA 90 mL atau agar cawan YMA.
- 4) Inkubasi isolat pada suhu 30°C selama tiga hari hingga isolat khamir tumbuh dengan baik.

c. Pelaksanaan

Metode penyimpanan isolat khamir dalam media *cryoprotectant* gliserol 10% pada suhu -80°C dapat dilakukan melalui langkah-langkah sebagai berikut.

- 1) Siapkan *cryotube* yang diberi label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.18).



Gambar 3.18 Tata Cara Pelabelan *Cryotube* Isolat Khamir

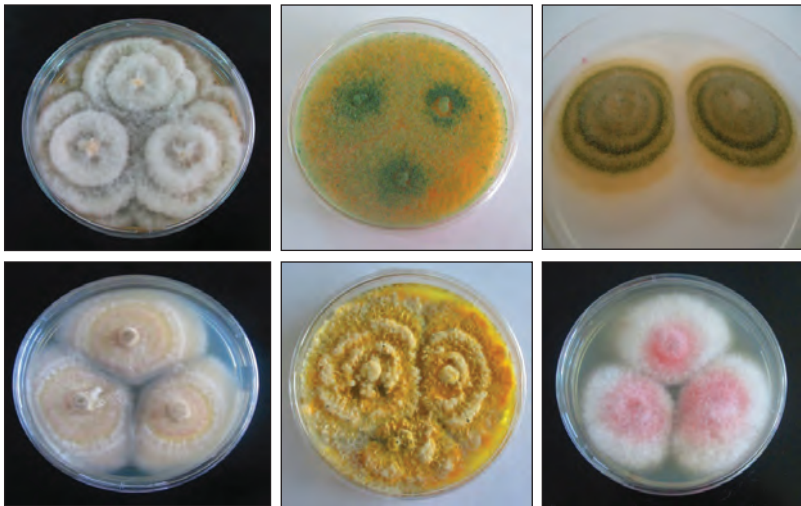
- 2) Transfer koloni khamir secara aseptik menggunakan ose dan masukkan ke dalam *cryotube* yang telah berisi 1,5 mL *cryoprotectant* 10% gliserol. Untuk tiap isolat, dibuat sebanyak tiga buah tabung.
- 3) Homogenkan *cryotube* yang telah berisi suspensi sel khamir menggunakan vorteks.
- 4) Masukkan *cryotube* dalam kotak penyimpanan dan simpan dalam pendingin bersuhu 4°C dengan minimal waktu penyimpanan empat jam dan maksimal waktu penyimpanan 24 jam. Proses ini merupakan tahap aklimatisasi untuk mencegah rusaknya protoplasma dan dinding sel khamir yang diakibatkan oleh perubahan suhu.
- 5) Pindahkan kotak penyimpanan dalam *deep freezer* bersuhu -80°C .
- 6) Simpan dua *cryotube* sebagai *seed* dan *permanent stock* pada *deep freezer* yang sudah ditentukan.
- 7) Satu *cryotube* digunakan sebagai stok dalam pendistribusian mikroorganisme.
- 8) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum *cryotube* disimpan pada *deep freezer*.

E. KOLEKSI KAPANG

Kapang (*mold/filamentous fungi*) adalah kelompok taksa mikroorganisme eukariotik yang termasuk ke dalam *Regnum Fungi* dengan ciri khas morfologi berbentuk filamen yang disebut hifa dan selanjutnya membentuk massa yang disebut miselium (Gambar 3.19). Penggunaan istilah kapang mengacu pada bentuk penampakan morfologi dan bukan merupakan kelompok taksonomi yang resmi sehingga anggota-anggota kapang tersebar ke dalam Filum Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, dan Basidiomycota.

Koleksi kapang di InaCC mencapai 789 nomor koleksi dan tersimpan dalam kondisi metabolisme inaktif di mana koleksi tersebut disimpan dengan metode preservasi *L-drying* dan *freezing* -80°C . Serangkaian prosedur pemeliharaan dan penyimpanan yang terstandar diperlukan untuk mempertahankan viabilitas dan stabilitas koleksi kapang InaCC.

Berikut ini disajikan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan koleksi mikroorganisme kapang di InaCC.



Gambar 3.19 Penampakan Morfologi Koloni Isolat Kapang

1. Prosedur Penyimpanan *L-drying* Isolat Kapang

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni kapang (*L-drying* hanya dapat diterapkan pada isolat kapang yang memiliki ukuran spora kecil ($<5 \mu\text{m}$) dan dapat bersporulasi pada media kultur)
- 2) Media protektif steril untuk kapang
- 3) Tabung ampul yang telah disumbat kapuk
- 4) Tabung reaksi kosong + sumbat
- 5) Vorteks
- 6) Label + tinta label
- 7) Rak tabung ampul
- 8) Pipet pasteur
- 9) Pembakar bunsen
- 10) Ose steril
- 11) Tisu
- 12) Alkohol
- 13) Sarung tangan
- 14) Mesin vakum *L-drying*
- 15) *Gas burner* untuk memotong ampul

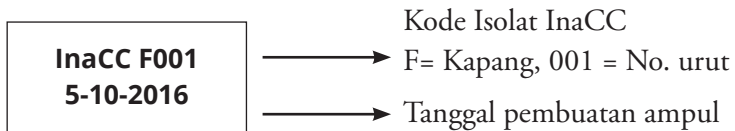
b. Persiapan

- 1) Siapkan media protektif untuk kapang.
- 2) Komposisi media protektif kapang adalah sebagai berikut: Na- glutamat 3 g, *Buffer* Fosfat pH 7,0 (K_2HPO_4 1,74 g, KH_2PO_4 1,34 g, H_2O 100 mL). Selanjutnya, media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C , 1 atm, 15 menit.
- 3) Siapkan media PDA dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada kondisi 121°C , 1 atm, 15 menit.
- 4) Siapkan media YMA dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada kondisi 121°C , 1 atm, 15 menit.

- 5) Siapkan tabung ampul yang sudah ditutup dengan sumbat kapuk dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, selama 15 menit.
- 6) Tumbuhkan isolat kapang pada tabung reaksi berisi media PDA atau YMA.
- 7) Inkubasi isolat pada suhu ruang selama paling tidak tujuh hari sampai isolat tumbuh dengan baik dan matang spora.

c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.20).



Gambar 3.20 Tata Cara Pelabelan Ampul Isolat Kapang

- 3) Masukkan media protektif sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi kapang secara aseptik.
- 4) Lakukan pemanenan spora kapang pada tabung reaksi dengan menggunakan ose steril.
- 5) Tuang suspensi spora ke dalam tabung reaksi kosong steril secara aseptik, lalu homogenkan suspensi spora menggunakan vorteks.
- 6) Hitung jumlah koloni kapang menggunakan metode ALT untuk mengetahui jumlah awal spora yang akan dipreservasi.
- 7) Pastikan bahwa jumlah spora yang akan dipreservasi mencapai kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL dengan menggunakan metode ALT.

- 8) Ambil suspensi spora kapang dengan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 9) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi spora kapang.
- 10) Pasang dan susun tiap tabung ampul dalam mesin *L-drying*, kemudian operasikan mesin hingga suspensi spora kering dan vakum selama ± 3 jam.
- 11) Potong ampul dari mesin dengan *gas burner* menggunakan teknik khusus supaya tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
- 12) Pastikan bahwa tabung dalam kondisi vakum dengan memeriksa ampul menggunakan alat penguji kevakuman (*spark tester*) setelah disimpan selama 24 jam dalam pendingin pada suhu 4°C . Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 13) Simpan ampul yang mempunyai kondisi vakum yang baik dalam lemari pendingin pada suhu 4°C .
- 14) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas isolat kapang yang disimpan dengan metode *L-drying*.

2. Prosedur Penyimpanan *Freeze-drying* Isolat Kapang

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni kapang (*Freeze-drying* hanya dapat diterapkan pada isolat kapang yang memiliki ukuran spora kecil ($< 5 \mu\text{m}$) dan dapat bersporulasi pada media kultur)

- 2) Media protektif 20% (w/v) susu skim
- 3) Tabung ampul yang telah disumbat kapuk
- 4) Tabung reaksi kosong + sumbat
- 5) Vorteks
- 6) Label + tinta label
- 7) Rak tabung ampul
- 8) Pipet pasteur
- 9) Pembakar bunsen
- 10) Ose steril
- 11) Tisu
- 12) Alkohol
- 13) Sarung tangan
- 14) Mesin vakum *freeze-drying*
- 15) *Freezer* -80°C
- 16) *Gas burner* untuk memotong ampul

b. Persiapan

- 1) Siapkan media protektif kapang.
- 2) Komposisi media protektif kapang adalah sebagai berikut:
20 g susu skim dilarutkan ke dalam 80 mL akuades. Media selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, 15 menit.
- 3) Siapkan media PDA dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada kondisi 121°C, 1 atm, 15 menit.
- 4) Siapkan media YMA dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada kondisi 121°C, 1 atm, 15 menit.
- 5) Siapkan tabung ampul yang sudah ditutup dengan sumbat kapuk dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm, selama 15 menit.
- 6) Tumbuhkan isolat kapang pada tabung reaksi berisi media PDA atau YMA.

- 7) Inkubasi isolat pada suhu ruang selama paling tidak tujuh hari sampai isolat tumbuh dengan baik dan matang spora.

c. Pelaksanaan

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan ampul dan beri label sesuai dengan tata cara pelabelan yang telah ditentukan.
- 3) Masukkan 5 mL media protektif susu skim ke dalam tabung reaksi yang berisi kapang secara aseptik.
- 4) Lakukan pemanenan spora kapang pada tabung reaksi dengan menggunakan ose steril.
- 5) Tuang suspensi spora ke dalam tabung reaksi kosong steril secara aseptik, lalu homogenkan suspensi spora menggunakan vorteks.
- 6) Hitung jumlah koloni kapang menggunakan metode ALT untuk mengetahui jumlah awal spora yang akan dipreservasi.
- 7) Pastikan bahwa jumlah spora yang akan dipreservasi mencapai kepadatan sekurang-kurangnya 10^8 CFU/mL dengan menggunakan metode ALT.
- 8) Ambil suspensi spora kapang dengan pipet pasteur steril dan masukkan secara perlahan (tidak menyentuh dinding tabung ampul) ke dalam tabung ampul dengan volume $\pm 0,1$ mL. Jumlah ampul sekurang-kurangnya lima buah untuk tiap isolat.
- 9) Tutup ampul dengan sumbat kapuk dan dorong sumbat sampai pada pertengahan tabung, tetapi jangan menyentuh media yang telah berisi spora kapang.
- 10) Masukkan ampul ke dalam *freezer* -80°C selama 12 jam.
- 11) Pasang dan susun tiap tabung ampul dalam mesin *freeze-drying*, kemudian operasikan mesin hingga spora kering dan ampul vakum selama ± 3 jam.

- 12) Potong ampul dari mesin dengan *gas burner* menggunakan teknik khusus agar tabung tetap dalam kondisi hampa udara.
- 13) Pastikan bahwa tabung dalam kondisi vakum dengan memeriksa tabung menggunakan alat penguji kevakuman (*spark tester*) setelah disimpan selama 24 jam dalam pendingin pada suhu 4°C. Pada pengujian *spark tester*, ampul yang vakum akan menghasilkan cahaya berwarna biru muda atau ungu muda, sedangkan yang tidak vakum tidak menghasilkan cahaya sama sekali (Gambar 3.6).
- 14) Simpan ampul yang mempunyai kondisi vakum yang baik dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.
- 15) Lakukan uji *Accelerated Rate Test* (ART) dengan menggunakan metode ART untuk mengetahui kualitas isolat kapang yang disimpan dengan metode *freeze-drying*.

3. Prosedur Penyimpanan *Freezing* Isolat Kapang

a. Alat dan Bahan

- 1) Isolat murni kapang
- 2) *Deep freezer* -80°C
- 3) Gliserol
- 4) Trehalosa
- 5) Sedotan plastik steril
- 6) Cawan petri steril
- 7) Tusuk gigi/tusuk sate steril
- 8) Pembakar bunsen
- 9) *Cryotube* 2 mL
- 10) *Cryo* label + tinta printer
- 11) Tisu
- 12) Alkohol
- 13) Sarung tangan

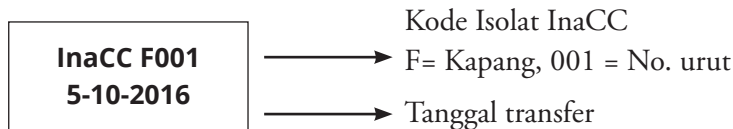
b. Persiapan

- 1) Siapkan media *potato dextrose agar* (PDA).
- 2) Siapkan media gliserol 10% (v/v) dan trehalosa 5% (w/v) sebagai *cryoprotectant*.
- 3) Tumbuhkan isolat kapang pada cawan petri yang berisi media PDA.

c. Pelaksanaan

Metode penyimpanan isolat kapang dalam 10% gliserol dan 5% trehalosa pada suhu -80°C dapat dilakukan melalui langkah-langkah sebagai berikut.

- 1) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- 2) Siapkan *cryotube* yang diberi label sesuai dengan tata cara pelabelan yang telah ditentukan (Gambar 3.21).

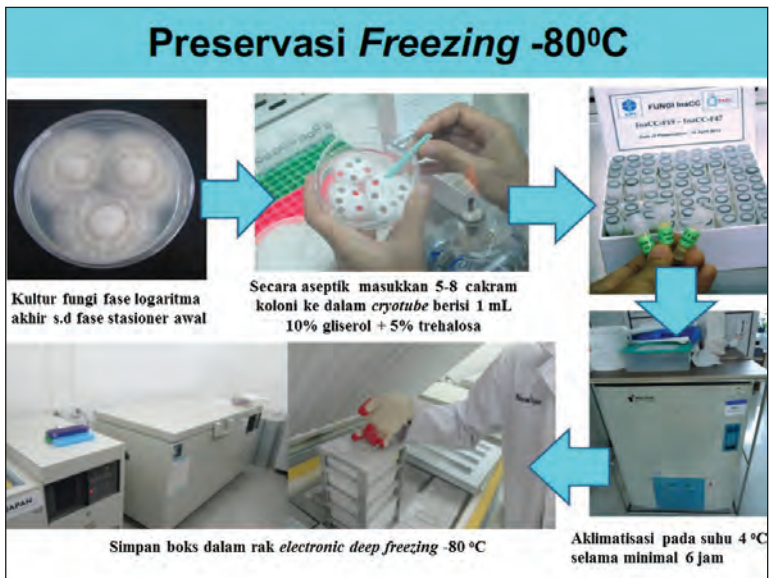


Gambar 3.21 Tata Cara Pelabelan *Cryotube* Isolat Kapang

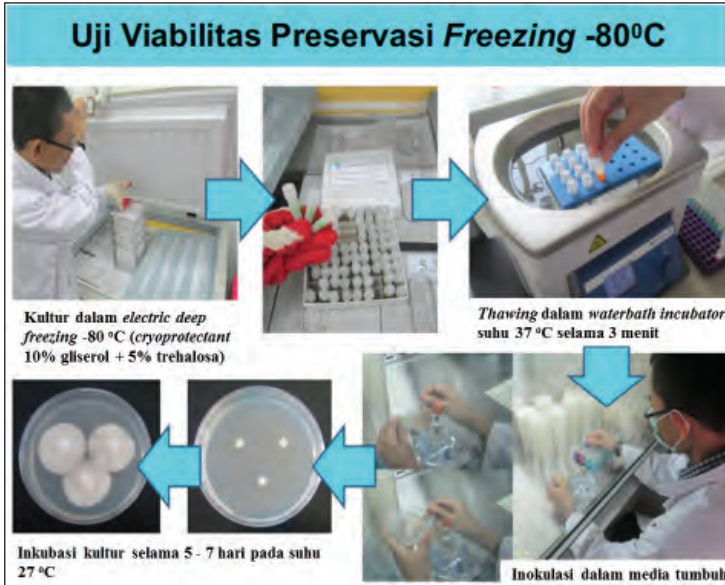
- 3) Pilihlah koloni kapang dengan pertumbuhan terbaik dan matang spora, kemudian dipotong membentuk cakram menggunakan sedotan plastik steril.
- 4) Transfer koloni kapang berbentuk cakram (5–8 cakram) secara aseptik ke dalam *cryotube* yang telah berisi 0,5 mL *cryoprotectant*. Untuk tiap isolat, dibuat sebanyak tiga buah tabung (Gambar 3.22).
- 5) Masukkan *cryotube* ke dalam kotak penyimpanan dan simpan dalam pendingin bersuhu 4°C dengan rentang waktu penyimpanan minimal enam jam dan maksimal waktu penyim-

panan 24 jam. Proses ini merupakan tahap aklimatisasi untuk mencegah protoplasma dan dinding sel kapang rusak yang diakibatkan oleh perubahan suhu selama proses *freezing* berlangsung (Gambar 3.22).

- 6) Pindahkan kotak penyimpanan dalam *deep freezer* bersuhu -80°C
- 7) Simpan dua *cryotube* sebagai *seed stock* dan *permanent stock* pada *deep freezer* yang sudah ditentukan.
- 8) Satu *cryotube* digunakan sebagai *distribution stock*.
- 9) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum *cryotube* disimpan pada *deep freezer*.
- 10) Uji viabilitas isolat hasil preservasi *freezing*. Prosedur pengujian viabilitas isolat fungi hasil preservasi *freezing* ditampilkan dalam Gambar 3.23.



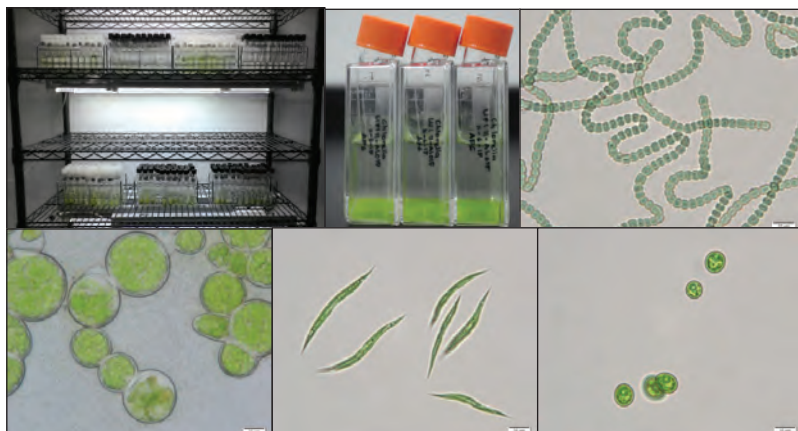
Gambar 3.22 Penyimpanan Beku Isolat Fungi dengan Metode *Freezing* -80°C



Gambar 3.23 Uji Viabilitas Isolat Fungi dengan Metode *Freezing* -80°C

F. KOLEKSI MIKROALGA

Mikroalga merupakan mikroorganisme uniseluler atau multiseluler sederhana yang mampu memenuhi kebutuhan energi secara mandiri dengan melakukan fotosintesis. Habitat hidup mikroalga adalah perairan tawar, laut, dan tempat-tempat lembap, yang tersedia cukup cahaya, kelembapan dan unsur hara sederhana untuk memperpanjang hidupnya. Kelompok organisme ini sangat heterogen dengan karakteristik yang berbeda-beda, di antaranya perbedaan pada tipe jaringan sel, ukuran sel, morfologi sel (umumnya uniseluler), dan warna sel (Gambar 3.24). InaCC menyimpan koleksi mikroalga sebanyak 105 nomor yang diperoleh melalui kegiatan eksplorasi. Teknik penyimpanan koleksi mikroalga InaCC saat ini menggunakan teknik *subculturing* (serial transfer setiap bulan) dan *freezing* -80°C dengan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan yang terstandar untuk mempertahankan viabilitas dan stabilitas koleksi mikroalga InaCC.



Gambar 3.24 Koleksi Mikroalga dan Penampilan Morfologi Beberapa Isolat Mikroalga yang Diamati Menggunakan Mikroskop Cahaya

Berikut ini disajikan prosedur pemeliharaan dan penyimpanan koleksi mikroalga di InaCC.

1. Prosedur Penyimpanan *Subculturing* dan *Freezing* Isolat Mikroalga

a. Alat dan Bahan

- 1) Kultur murni mikroalga
- 2) Bahan kimia untuk media kultur sesuai kelompok taksa mikroalga
- 3) *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 6% (v/v), 10% (v/v)
- 4) Gliserol
- 5) Mikropipet 20% dan tip steril
- 6) Pipet pasteur steril + karet pengisap
- 7) Pembakar bunsen
- 8) Tisu
- 9) Alkohol
- 10) Sarung tangan
- 11) *Cryotube* 2 mL

- 12) Label + tinta label
- 13) Tabung reaksi ulir + tutup
- 14) *Deep freezer* -80°C
- 15) *Growth chamber*
- 16) Vorteks

b. Persiapan

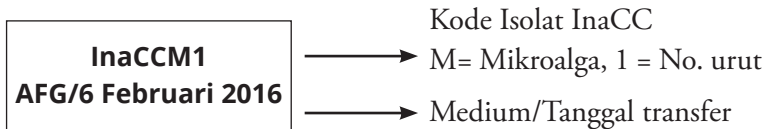
- 1) Pembuatan berbagai media tumbuh sesuai dengan kelompok taksa mikroalga.
- 2) Persiapan transfer dan kultivasi mikroalga.
- 3) Pembuatan *cryoprotectant* 10% (v/v) gliserol.
- 4) Pembuatan *cryoprotectant* DMSO 6% (v/v) dan 10% (v/v).
- 5) Siapkan tabung reaksi ulir yang telah diisi 5 mL media kultur mikroalga baru. Media cair untuk setiap isolat mikroalga dibuat minimal sebanyak dua ulangan (duplo). Tutup tabung reaksi sedikit longgar dan sterilisasi media dengan autoklaf pada 121°C, 1 atm, selama 20 menit.
- 6) Sterilisasi pipet pasteur dengan ujung atas yang telah diberi kapas sebagai filter.

c. Pelaksanaan

1) Penyimpanan isolat mikroalga dengan subculturing

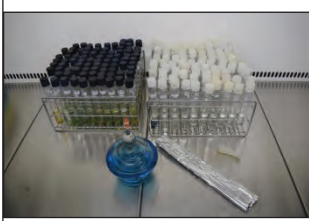
Penyimpanan mikroalga dengan metode *subculturing* atau peremajaan kultur dilakukan untuk meregenerasi isolat mikroalga ke media baru. Peremajaan kultur dilakukan setiap bulan dengan serial transfer dari media cair berisi kultur mikroalga ke media cair yang baru. Maksimum penyimpanan dengan metode ini adalah selama enam bulan dan kultur tertua yang telah diinkubasi selama enam bulan selanjutnya didestruksi. Prosedur *subculturing* mikroalga adalah sebagai berikut.

- a) Isi formulir *Preservation Sheet (Record of Preserved Material)* sebelum memulai pekerjaan.
- b) Tempel label pada tabung reaksi sesuai dengan pelabelan yang telah ditentukan (lihat Gambar 3.25 dan Gambar 3.26)

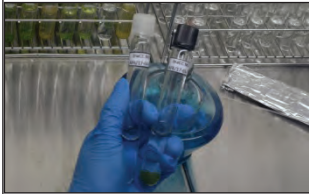


Gambar 3.25 Tata Cara Pelabelan Tabung Ullir dan *Cryotube* Isolat Mikroalga

- c) Transfer secara aseptik ± 1 mL isolat mikroalga yang telah berumur satu bulan ke media kultur yang baru dengan menggunakan pipet Pasteur steril (lihat Gambar 3.26).
- d) Tutup kedua tabung kultur setelah mulut tabung dibakar/dilewatkan di atas api bunsen (lihat Gambar 3.26).
- e) Inkubasi kultur baru dan kultur lama pada ruang inkubasi.
- f) Selama inkubasi, pertumbuhan mikroalga dicek menggunakan mikroskop cahaya, yaitu dengan melihat penampakan sel mikroalga yang tumbuh di dalam tabung reaksi di bawah mikroskop.
- g) Simpan kultur mikroalga yang tumbuh dengan baik dan tidak terkontaminasi dalam *growth chamber*.
- h) Cek secara berkala kultur mikroalga dalam *growth chamber*. Kultur mikroalga yang telah mencapai enam bulan dikeluarkan dari *growth chamber* untuk didestruksi.



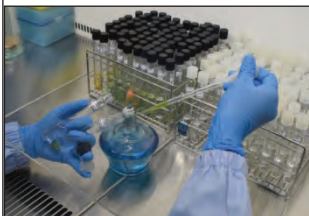
Tabung kultur bulan sebelumnya dan tabung kultur berisi media baru yang telah diberi label disiapkan secara berurutan sesuai dengan nomor isolat. Siapkan pula pipet Pasteur steril dan karet pengisap.



Cocokkan label nomor isolat dan media yang digunakan antara tabung kultur bulan sebelumnya dan tabung kultur berisi media baru.



Panaskan lingkaran mulut tabung sebelum dan setelah tutup tabung dibuka. Panaskan pipet Pasteur menggunakan api Bunsen dan dinginkan secara *pipetting* dalam media baru.



Transfer secara aseptik ± 1 mL isolat mikroalga yang telah berumur satu bulan ke media kultur yang baru dengan menggunakan pipet Pasteur steril.



Cek secara berkala pertumbuhan kultur mikroalga dalam *growth chamber* dengan melihat penampakan sel mikroalga yang tumbuh di dalam tabung reaksi di bawah mikroskop.

Gambar 3.26 Prosedur *Subculturing* Isolat Mikroalga

2) Penyimpanan *freezing* isolat mikroalga dengan *cryoprotectant* DMSO

- a) Siapkan *cryotube* yang diberi label sesuai dengan tata cara pelabelan yang telah ditentukan (lihat Gambar 3.25).
- b) Transfer dan tumbuhkan mikroalga dalam media cair baru hingga mencapai fase logaritma atau awal stasioner.
- c) Siapkan *cryoprotectant* sesuai dengan kelompok taksa mikroalga, untuk mikroalga prokariot (*cyanophyta*) adalah 6% (v/v) DMSO dan untuk mikroalga eukariot adalah 10% (v/v) DMSO. DMSO disterilisasi menggunakan teknik filtrasi (*millex-G*).
- d) Encerkan *cryoprotectant* DMSO dengan medium hingga volumenya 2 kali lipat (1:1), kemudian dinginkan dengan menggunakan es.
- e) Ambil 0,5 mL kultur mikroalga yang telah disiapkan menggunakan mikropipet secara aseptik dan masukkan ke dalam tabung *cryotube*.
- f) Tambahkan 0,5 mL *cryoprotectant* DMSO yang sudah diencerkan ke dalam *cryotube* berisi 0,5 mL kultur mikroalga, lalu kocok kedua suspensi hingga homogen dengan vorteks.
- g) Diamkan tabung dalam temperatur ruang selama 15 menit.
- h) Masukkan tabung ke dalam *freezer* lemari es selama tiga jam hingga beku, selanjutnya tabung dicelupkan ke dalam nitrogen cair.
- i) Simpan tabung yang sudah didinginkan ke dalam *deep freezer* -80°C.
- j) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum *cryotube* disimpan pada *deep freezer*.

3) Penyimpanan *freezing* isolat mikroalga dengan *cryoprotectant* gliserol

- a) Siapkan *cryotube* yang diberi label sesuai tata cara pelabelan yang telah ditentukan (lihat Gambar 3.25).
- b) Transfer dan tumbuhkan mikroalga dalam media cair baru hingga mencapai fase logaritma atau awal stasioner.
- c) Siapkan *cryoprotectant* gliserol 20% (v/v). Larutan gliserol disterilisasi menggunakan autoklaf 121°C, 1 atm, 20 menit.
- d) Ambil 0,5 mL kultur mikroalga yang telah disiapkan menggunakan mikropipet secara aseptik dan masukkan ke dalam tabung *cryotube*.
- e) Tambahkan 0,5 mL *cryoprotectant* gliserol ke dalam *cryotube* berisi 0,5 mL kultur mikroalga, kocok kedua suspensi hingga homogen dengan vorteks.
- f) Masukkan tabung ke dalam kotak *cryotube*, kemudian masukkan kotak *cryotube* dalam pendingin bersuhu 4°C minimal selama tiga jam.
- g) Simpan tabung yang sudah didinginkan ke dalam *deep freezer* -80°C.
- h) Isi formulir *Freezer Stock Position* sebelum *cryotube* disimpan pada *deep freeze*.



BAB IV

MANAJEMEN MUTU

Manajemen mutu dilakukan untuk menguji identitas, autentitas, dan validitas isolat mikroorganisme koleksi InaCC. Pada manajemen mutu, uji viabilitas dilakukan terhadap isolat yang disimpan dalam kondisi metabolisme tidak aktif, yaitu ampul *L-drying/freeze-drying* dan penyimpanan beku *freezing* -80°C . Viabilitas sel yang disimpan diuji melalui *Accelerated Rate Test* (ART). Uji ART dilakukan dengan membuka dan menumbuhkan kembali sel/spora kering mikroorganisme yang telah dipreservasi dalam ampul *L-drying/freeze-drying*. Sebelum dibuka untuk uji ART, ampul disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C . Untuk mikroorganisme prokariotik (arkea, bakteri, dan aktinomisetes), lama penyimpanan pada suhu 37°C adalah selama dua minggu, sedangkan untuk mikroorganisme eukariotik (khamir dan kapang) selama satu bulan. Selanjutnya, isolat hasil ART dihitung kuantitasnya dengan enumerasi ALT dan diidentifikasi ulang secara molekuler untuk menguji kemurnian dan validitas isolat yang disimpan.

A. MANAJEMEN MUTU MIKROORGANISME PROKARIOTIK

Mikroorganisme yang dikelompokkan dalam organisme prokariotik tidak memiliki organel yang dilapisi membran, inti selnya juga tidak dilapisi membran, dan umumnya memiliki satu kromosom. Koleksi

mikroorganisme prokariot InaCC dibagi ke dalam taksa bakteri dan aktinomisetes. Beberapa prosedur kegiatan dalam manajemen mutu koleksi mikroorganisme yang tergolong prokariot tersebut adalah sebagai berikut.

1. Uji Viabilitas (*Accelerated Rate Test*) Isolat Mikroorganisme Prokariotik (Bakteri dan Aktinomisetes)

a. Perlengkapan (bahan kimia, bahan habis pakai)

- 1) Media *Nutrient Agar* (NA)
- 2) Media *Yeast Starch* (YS) atau *International Streptomyces Project 2* (ISP2)
- 3) Ampul *L-drying/freeze-drying* isolat bakteri dan aktinomisetes
- 4) Pemotong ampul (*diamond ampoule cutter*)
- 5) *Kim wipes*/kain kasa
- 6) Larutan rehidrasi (*Nutrient broth* atau *Yeast Starch broth*)
- 7) Rak tabung ampul
- 8) Pipet pasteur
- 9) Pembakar bunsen
- 10) Cawan petri steril
- 11) Segitiga penyebar steril
- 12) Tisu
- 13) Alkohol
- 14) Sarung tangan

b. Persiapan

- 1) Sterilisasi alat dan bahan aus yang diperlukan.
- 2) Siapkan media tumbuh isolat bakteri atau aktinomisetes (media NA, YS, atau ISP2).

c. Pelaksanaan

Accelerated Rate Test dilakukan dengan membuka ampul *L-drying/freeze-drying* berisi sel/endospora kering isolat bakteri

atau aktinomisetes yang telah disimpan selama dua minggu pada suhu 37°C.

1) Cara Membuka Ampul

Sebelum ampul dibuka, perhatikan hal-hal berikut.

- a) Catat kode/nomor ampul (kode/nomor koleksi isolat mikroorganisme).
- b) Periksa tingkat kevakuman ampul dengan menggunakan alat periksa kevakuman berfrekuensi tinggi (*spark tester*).

2) Proses Pembukaan Ampul

- a) Lakukan pembukaan ampul di dalam laboratorium.
- b) Lakukan pembukaan ampul dalam ruang steril (*Biosafety cabinet*)
- c) Buat keratan melingkar dengan alat pemotong ampul, kikir kaca ampul tepat di bagian tengah sumbat kapuk ampul dengan sekali keratan.
- d) Balut ampul dengan kain kasa (*Kim wipes*) di bagian yang dikerat tadi, lalu ampul dipatahkan.
- e) Sebelum patahan ujung ampul yang runcing dilepaskan, tunggu sebentar dan biarkan udara dari luar masuk perlahan-lahan ke dalam ampul melewati penyaringan sumbat kapuk. Dengan cara ini, akan diperoleh dua keuntungan:
 - Sumbat kapuk tidak akan terdorong ke dasar ampul.
 - Partikel-partikel halus isolat kering mikroorganisme tidak akan bertebaran ke dalam ruang laboratorium.
- f) Panaskan bagian ampul yang terbuka dengan nyala api, kemudian tutup dengan sumbat kapuk.

Catatan: Sumbat kapuk di dalam ampul (berbahaya apabila terhirup karena mengandung partikel kering sel/spora mikroorganisme) diambil dengan pinset steril

dan bersama dengan patahan ujung ampul, dimasukkan ke dalam bejana berisi disinfektan atau direbus.

3) Cara *Reviving Isolat*

Sebelum isolat kering-beku di dalam ampul dihidupkan kembali, siapkan terlebih dahulu media, suhu, dan persyaratan gas (jika ada) yang sesuai dengan jenis mikroorganisme agar diperoleh pertumbuhan yang optimal.

- a) Bubuhkan secara aseptik 0,1 mL larutan rehidrasi ke dalam ampul yang telah dibuka menggunakan pipet pasteur steril.
- b) Aduk dengan teknik memipet hingga terbentuk suspensi sel mikroorganisme yang homogen dan usahakan tidak terbentuk gelembung udara.
- c) Lakukan pengenceran menggunakan metode analisis ALT (Gambar 4.1).
- d) Masukkan 0,1 mL suspensi sel dari ampul ke dalam tabung reaksi yang berisi 4,9 mL larutan NaCl 0,85% (Pengenceran 10^{-0}), kemudian larutkan menggunakan vorteks hingga homogen.
- e) Masukkan 0,5 mL larutan hasil pengenceran 10^{-0} ke dalam tabung reaksi berisi 4,5 mL larutan NaCl 0,85% (Pengenceran 10^{-1}), vorteks hingga homogen.
- f) Lanjutkan langkah pengenceran sampel di atas hingga diperoleh pengenceran sampai 10^{-5} .
- g) Ambil sebanyak 100 μ L hasil pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} menggunakan mikropipet, kemudian tuang dan ratakan dengan segitiga penyebar pada media NA sebanyak dua kali (duplo).

- h) Inkubasi isolat prokariotik tersebut (dalam keadaan normal, isolat akan tumbuh dalam beberapa hari). Beberapa isolat tertentu cenderung tumbuh lama dan perlu diperpanjang waktu inkubasinya, yaitu dua kali waktu inkubasi normal sebelum isolat dinyatakan kehilangan viabilitasnya atau dianggap mati.
- i) Hitung jumlah minimum sel hidup dalam ampul dengan rumus perhitungan sebagai berikut.

Jumlah sel hidup dalam ampul = Jumlah koloni \times 1/0,1 \times faktor pengenceran
--

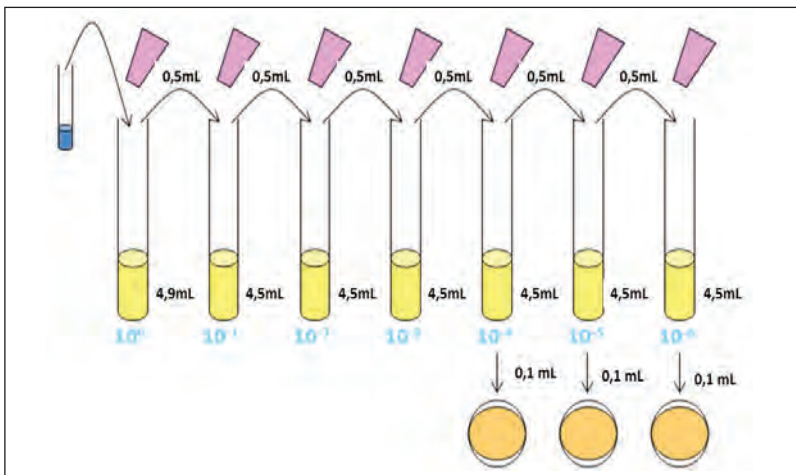
- j) Jumlah koloni dalam notasi = Jumlah koloni/mL atau CFU/mL (Gambar 4.2).
- k) Khusus untuk penilaian jumlah koloni sebelum proses *L-drying* atau *freezing* setidaknya-tidaknya memiliki kerapatan sel 10^8 koloni/mL. Jumlah koloni setelah proses *L-drying* setidaknya-tidaknya memiliki 10^6 koloni/mL.
- l) Sertakan data minimum berupa; kode/nomor isolat, tanggal pengering-bekuan (terdapat pada kertas nomor pada ampul), berikut rincian jenis media tumbuh yang digunakan, pH media, temperatur dan lama inkubasi serta persyaratan gas (bila ada) yang dibutuhkan sebagai kelengkapan data pada kegiatan *Accelerated Rate Test*.

2. Identifikasi Isolat Bakteri

Proses identifikasi koleksi bakteri InaCC dilakukan melalui pendekatan morfologi dan molekuler. Identifikasi secara morfologi meliputi pengamatan bentuk koloni dan sel bakteri dengan teknik pewarnaan Gram. Identifikasi secara molekuler dilakukan berdasarkan analisis sekuen 16S rDNA.



Gambar 4.1 Prosedur Metode ART pada Isolat Bakteri yang Disimpan dengan Cara *L-drying*



Gambar 4.2 Skema Metode Penghitungan Jumlah Koloni dengan Metode Angka Lempeng Total (ALT)

a. Identifikasi Bakteri Secara Morfologi

1) Alat dan bahan:

- a) Larutan pewarnaan Gram A (kristal violet, alkohol 96%, ammonium oksalat)
- b) Larutan pewarnaan Gram B (iodium, kalium iodida, akuades)
- c) Larutan pewarnaan Gram C (aseton, alkohol)
- d) Larutan pewarnaan Gram D (safranin, alkohol 96%, akuades)
- e) Mikroskop
- f) Kaca preparat dan kaca penutup
- g) Ose
- h) Pembakar bunsen
- i) Karet pengisap dan pipet Pasteur
- j) Akuades

2) Persiapan

Persiapkan isolat murni bakteri yang akan diidentifikasi pada media padat atau cair yang telah diinkubasi selama 24 jam sesuai dengan media dan suhu pertumbuhannya.

3) Pelaksanaan

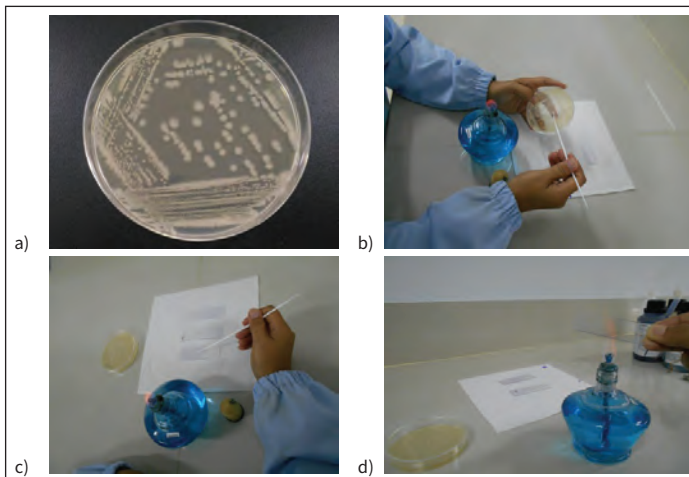
a) Morfologi koloni bakteri

- 1) Letakkan isolat bakteri dalam cawan petri di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x sampai 100x.
- 2) Fokuskan pada bidang pandang lensa mikroskop.
- 3) Amati dan gambar penampakan koloni bakteri, meliputi bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, tekstur koloni, dan warna koloni.

b) Morfologi sel bakteri dengan teknik pewarnaan Gram

- 1) Sediakan kaca preparat yang bersih, lalu lewatkan di atas nyala api bunsen.
- 2) Teteskan akuades steril di atas kaca preparat tersebut.

- 3) Ambil inokulum bakteri yang akan diperiksa secara aseptik dengan menempelkan ujung ose pada koloni tunggal, letakkan tepat pada tetesan akuades, kemudian ratakan perlahan-lahan.
- 4) Letakkan kaca preparat dalam posisi tegak sehingga apusan menjadi tipis dan merata. Tunggu sampai kering.
- 5) Fiksasi dengan cara melewatkan apusan tersebut di atas nyala api dengan cepat. Alur pembuatan apusan bakteri untuk pewarnaan Gram ditampilkan pada Gambar 4.3.

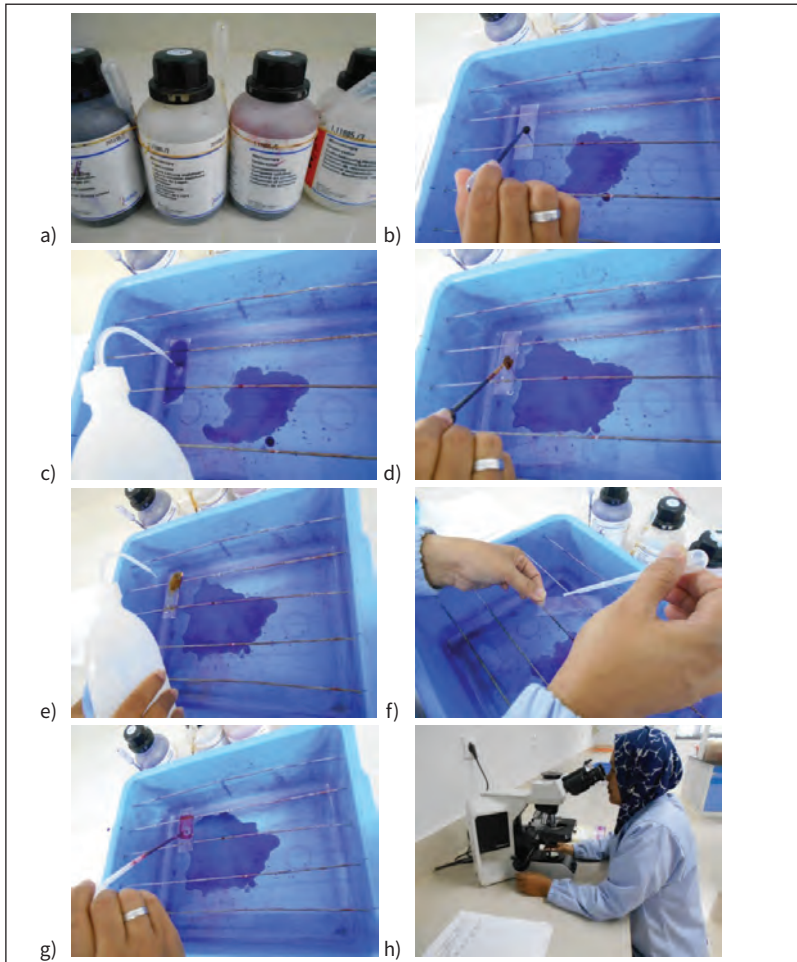


Keterangan: Biakan bakteri segar yang akan dibuat apusan (a), sel bakteri diambil menggunakan bantuan jarum ose (b), sel bakteri tersebut kemudian diulas di atas kaca preparat yang telah ditetesi akuades hingga rata dan tipis (c), apusan bakteri difiksasi dengan melewatkan preparat pada api hingga apusan sel bakteri kering (d).

Gambar 4.3 Pembuatan Apusan Bakteri untuk Pewarnaan Gram (tahap 3–5)

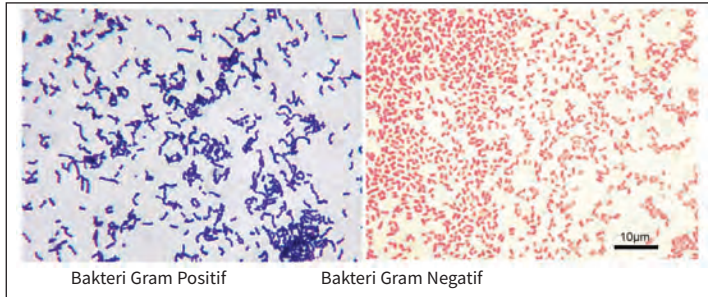
- 6) Letakkan apusan di atas kawat penyangga yang berada di atas bak pewarna, lalu teteskan larutan pewarna Gram A pada apusan dan tunggu selama satu menit.

- 7) Cuci warna dasar dengan air mengalir, letakkan kaca preparat dalam posisi tegak hingga kering.
- 8) Teteskan larutan pewarna Gram B pada apusan, tunggu selama satu menit.
- 9) Cuci larutan pewarna Gram B dengan air mengalir, keringkan dengan meletakkan kaca preparat dalam posisi tegak.
- 10) Basuh dengan meneteskan larutan pewarnaan Gram C selama 30 detik.
- 11) Teteskan larutan D, tunggu selama dua menit.
- 12) Cuci dengan air mengalir, lalu keringkan dengan meletakkan kaca preparat dalam posisi tegak.
- 13) Amati dengan mikroskop perbesaran kuat ($>1.000\times$) dengan bantuan minyak imersi (tahap 6–13 dapat dilihat pada Gambar 4.4).
- 14) Pemberian larutan pewarnaan Gram C yang mengandung aseton/alkohol mendehidrasi dinding sel bakteri Gram positif yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal sehingga menutup pori-pori dinding sel tersebut. Hal ini menyebabkan tertahannya larutan pewarna Gram A dan B sehingga sel akan tampak berwarna ungu gelap di bawah mikroskop. Dinding sel bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan tipis dan lebih banyak lipopolisakarida akan meluruh apabila diberi larutan pewarnaan Gram C, sehingga kompleks larutan pewarnaan A dan B terhapus. Pemberian larutan pewarnaan Gram D menghasilkan warna merah muda pada sel bakteri Gram negatif yang tampak pada pengamatan menggunakan mikroskop (dapat dilihat pada Gambar 4.5)
- 15) Gambarkan bentuk morfologi sel bakteri dan foto penampakan mikroskopis sel bakteri.



Keterangan: Pewarna A, B, C, dan D diperlukan untuk teknik pewarnaan Gram (a), apusan bakteri yang telah difiksasi, ditetaskan dengan pewarna Gram A (b), kemudian dibilas dengan akuades setelah satu menit (c), apusan ditetaskan dengan pewarna Gram B selama satu menit (d), kelebihan pewarna Gram B dibilas dengan akuades (e), apusan bakteri ditetaskan sedikit demi sedikit dengan pewarna Gram C selama 30 detik (f), apusan bakteri kemudian ditetaskan dengan pewarna Gram D selama dua menit, kelebihan pewarna dibilas dengan akuades (g), apusan bakteri yang telah diwarnai selanjutnya diamati menggunakan mikroskop (h).

Gambar 4.4 Prosedur Pewarnaan Gram (Tahap 6–13)



Keterangan: Kelompok bakteri Gram positif akan memperlihatkan warna ungu tua, sedangkan kelompok bakteri Gram negatif akan memperlihatkan warna merah muda ketika diamati di bawah mikroskop cahaya.

Gambar 4.5 Morfologi dan kelompok bakteri dapat ditentukan melalui pewarnaan Gram (Giri, 2016).

b. Identifikasi Bakteri Secara Molekuler Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

1) Alat dan bahan

- a) Mesin Sekuensing (*Nucleotide Analyzer*)
- b) Mesin PCR
- c) Sentrifus
- d) *Water bath*
- e) Elektroforesis
- f) Agarosa dan etidium bromida
- g) TAE *buffer*
- h) Reagen ekstrasi DNA: TE *buffer*, larutan GES, ammonium asetat, etanol 70%, isopropanol, lisozim, kloroform
- i) Reagen reaksi PCR: enzim Taq polimerase, primer, dNTP, PCR *buffer*, $MgCl_2$, air bebas nuklease
- j) Reagen purifikasi produk PCR: *polyethylene glycol* (PEG) 6000, $MgCl_2$, sodium asetat, etanol 70%, air bebas nuklease
- k) Reagen reaksi *cycle sequencing*: *BigDye Terminator Ready Reaction mix*, *5× Seq Buffer*, *Seq Primers*, air Mili-Q

- l) Reagen purifikasi produk *cycle sequencing* dan preparasi sampel *sequencing*: EDTA, Na-asetat, etanol absolut, etanol 70%, *Hi-Di formamide*
- m) Mikropipet beserta tip
- n) Tabung mikro 1,5 mL dan 0,5 mL
- o) *Mili-Q water*
- p) Isolat bakteri dengan umur maksimal 3 hari*

Catatan: Apabila isolat bakteri dengan umur tiga hari belum tumbuh optimal, inkubasi kembali isolat tersebut hingga kondisi pertumbuhannya optimal.

2) Persiapan

- a) Siapkan isolat murni bakteri yang akan dianalisis dengan umur maksimal tiga hari atau sesuai dengan waktu pertumbuhan optimalnya.
- b) Siapkan semua alat sebelum digunakan.
- c) Siapkan semua reagen terlebih dahulu.

3) Pelaksanaan

a) Metode ekstraksi DNA bakteri menggunakan metode GES (Pitcher dkk., 1989, dengan modifikasi)

- (1) Ambil isolat bakteri secukupnya dan masukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang sudah diisi 1× TE *buffer*.
- (2) Sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 15.000 rpm, lalu supernatan dibuang.
- (3) Resuspensi sel dalam 50 µL larutan lisozim (50 µg/mL dalam TE, dihangatkan dan diinkubasi terlebih dahulu selama 10 menit pada 37°C) dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit).
- (4) Tambahkan 250 µL larutan GES dan larutkan dengan ujung tip mikropipet. Diamkan selama 10 menit.

- (5) Tambahkan 125 μL dari 7,5 M amonium asetat dan letakkan di dalam es selama 10 menit.
- (6) Tambahkan 500 μL kloroform dan dibolak-balik sebanyak 50 kali.
- (7) Sentrifugasi pada kecepatan tinggi (10.000 rpm selama 10 menit) untuk memisahkan larutan menjadi dua fase. Transfer fase *liquid* ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang baru.
- (8) Tambahkan setengah volume isopropanol dan bolak-balik untuk membuat benang-benang DNA.
- (9) Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, buang supernatan.
- (10) Tambahkan etanol 70% sebanyak 1 mL, sentrifugasi selama lima menit pada 10.000 rpm, dan buang supernatan.
- (11) Kering-anginkan selama 15 menit dan larutkan dalam $0,2\times$ TE *buffer* ($0,2\times$ TE *buffer* dapat diganti dengan air bebas nuklease). Konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm.

b) Amplifikasi 16S rDNA dengan PCR

Komposisi reaksi PCR dan volume reagen yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen 16S rDNA ditampilkan pada Tabel 4.1. Reagen yang diperlukan terdiri atas dNTP yang merupakan campuran basa nukleotida, primer *forward* (27F) dan *reverse* (1496) yang merupakan salah satu pasangan primer universal untuk kelompok bakteri, enzim Taq Polimerase beserta *buffer*-nya, dan cetakan DNA (*template*) yang merupakan DNA genom bakteri yang ingin diidentifikasi. Air bebas nuklease ditambahkan ke dalam campuran reagen hingga total volumenya sebanyak 25 μL . Setiap reagen tersebut dicampurkan dalam tabung mikro 0,5 mL. Semua langkah harus dilakukan dalam kondisi dingin (dalam *ice box*).

Tabel 4.1 Komposisi PCR untuk Amplifikasi 16S rDNA

	Untuk volume total 25 μ L	Konsentrasi final
10' <i>Taq</i> buffer	2,5 μ L	1'
Campuran dNTP (masing-masing 2,5 mM)	2 μ L	200 μ M untuk tiap-tiap dNTP
Primer <i>forward</i> ¹⁾ (10 μ M)	1 μ L	0,4 μ M
Primer <i>reverse</i> ²⁾ (10 μ M)	1 μ L	0,4 μ M
DNA Template ³⁾	5 ng	70 ng (DNA)/50 μ L total volume
<i>Taq</i> Polimerase	0,25 μ L	2,5U/50 μ L
Air bebas nuclease	Sampai 25 μ L	
27Fmod: 5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3'		
1492Rmod: 5'-TACGGYTACCTTGTAYGACTT-3'		
(dapat menggunakan primer universal/ yang menyandi 16S rDNA)		
Konsentrasi final, 70 ng/50 μ L untuk DNA lingkungan atau 1–10 ng/50 μ L DNA murni (<i>strain</i> tunggal)		

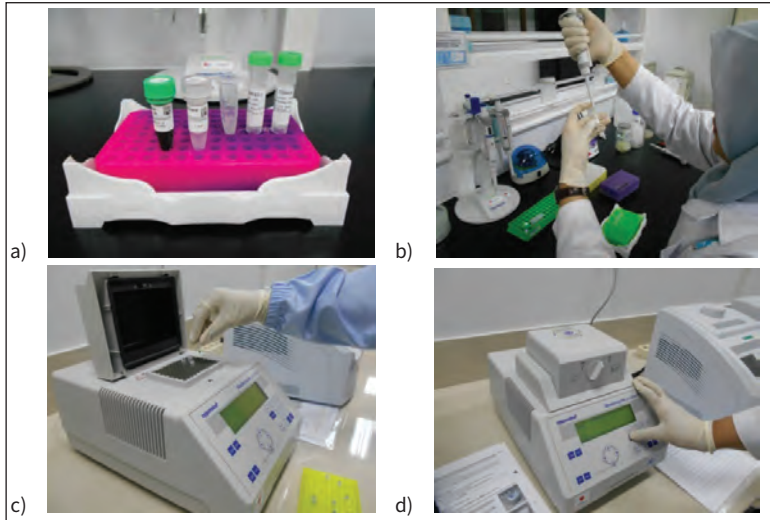
Beberapa perusahaan mengeluarkan produk reagen yang cukup praktis dengan mencampurkan beberapa reagen dalam satu produk, seperti produk *Go Taq green master mix* dari Promega yang sudah mengandung dNTP, DNA polimerase, dan *loading dye*. Komposisi reagen untuk amplifikasi fragmen DNA 16S rDNA yang menggunakan *Go Taq green master mix* disajikan dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Komposisi PCR untuk amplifikasi 16S rDNA menggunakan *Go Taq green master mix* (Promega).

Reagen	Untuk volume 25 μ L
Air bebas nuklease	9,75 μ L
<i>Go Taq Green Master</i>	12,5 μ L
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	0,625 μ L
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	0,625 μ L
DMSO untuk PCR	0,5 μ L
DNA <i>template</i> (10 ng/ μ L)	1 μ L

Catatan: Untuk primer *forward* dan *reverse* sama dengan prosedur di atas.

Tabung PCR yang telah berisi campuran reagen selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan reaksi sebagai berikut: 95°C selama 90 detik; dilanjutkan dengan 30 siklus, 95°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, dan 72°C selama 90 detik, serta dengan *final extension* (pemanjangan akhir) pada 72°C selama 10 menit (Gambar 4.6).



Keterangan: Beberapa reagen yang diperlukan untuk reaksi PCR (a), reagen dicampurkan satu per satu sesuai dengan volume dan konsentrasi yang telah ditentukan ke dalam tabung PCR (b), tabung PCR yang telah berisi reagen dan DNA sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR (c), mesin PCR diprogram sesuai dengan reaksi untuk amplifikasi 16S rDNA bakteri.

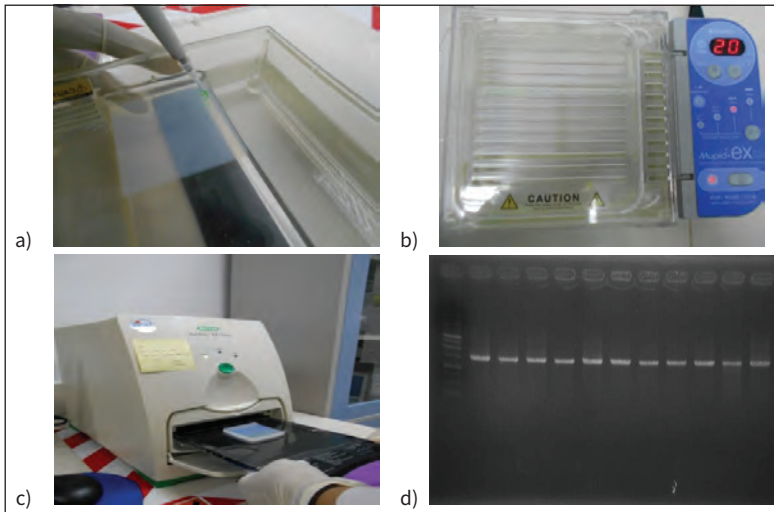
Gambar 4.6 Prosedur Amplifikasi 16S rDNA untuk Mengidentifikasi Isolat Bakteri

c) Fraksinasi DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan gel elektroforesis

Untuk mengukur kualitas DNA, hasil amplifikasi dapat dilihat melalui gel elektroforesis dengan langkah-langkah sebagai berikut (Gambar 4.7).

- 1) Buat gel agarosa dengan konsentrasi 1% (w/v) dengan *buffer* TAE.
- 2) Masukkan 2,5 μL dari DNA amplifikasi hasil PCR ke dalam sumur gel agarosa.

- 3) Masukkan 3 μL dari DNA *ladder* (1 kb) ke dalam sumur gel agarosa.
- 4) Jalankan mesin elektroforesis selama 30 menit, pada 100 Volt.
- 5) Rendam dalam larutan etidium bromida (1 μL /100 mL) selama 30 menit.
- 6) Masukkan agarosa ke dalam *Gel Doc Printgraph*, amati pita DNA di bawah sinar UV dan dokumentasikan pita yang terbentuk.



Keterangan: Sampel DNA hasil amplifikasi 16S rDNA dan DNA *ladder* dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa (a), mesin elektroforesis bekerja dengan tegangan 100 Volt (b), DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke arah kutub bermuatan positif melalui pori-pori gel agarosa. Gel agarosa yang telah direndam dalam larutan pewarna DNA dimasukkan dalam mesin *Gel Doc Printgraph* (c), dan pada layar monitor akan muncul pendaran pita DNA hasil pemisahan sesuai ukuran produk PCR.

Gambar 4.7 Kegiatan fraksinasi DNA menggunakan gel elektroforesis.

d) Purifikasi produk PCR

DNA teramplifikasi dipurifikasi dengan metode presipitasi menggunakan *polyethylene glycol* (PEG) dengan beberapa modifikasi.

- 1) Siapkan amplikon, yaitu 25 μL larutan DNA hasil amplifikasi 16S rDNA.

- 2) Tambahkan 15 μ L larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM $MgCl_2$) dan 6 μ L dari 3M Na-asetat, kemudian kocok perlahan dengan tangan selama 10 menit pada suhu ruang.
- 3) Sentrifugasi pada 17.800 \times g selama 15 menit atau 16.000 rcf selama 25 menit pada suhu ruang.
- 4) Ambil supernatan secara hati-hati menggunakan mikropipet.
- 5) Cuci presipitat DNA dengan etanol 70% sebanyak 2 \times .
- 6) Sentrifugasi pada kecepatan 17.800 \times g, selama lima menit, lalu buang supernatannya.
- 7) Keringkan DNA selama 10 menit.
- 8) Larutkan kembali ke dalam 20 μ L akuades steril.
- 9) Simpan 16S rDNA yang sudah terpurifikasi dalam -20°C sampai digunakan.

e) Siklus sekuensing (*Cycle sequencing*)

Dalam siklus sekuensing hanya digunakan satu macam primer saja. Daftar primer yang digunakan dalam siklus sekuensing 16S rDNA disajikan pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Primer untuk Pengurutan (*Sequencing*) 16S rDNA

Nama primer	Urutan DNA	Penomoran pada <i>E. coli</i>	Mer
27F	5'-agagtttgatcctggctcag-3'	8-27	20 bp
350F	5'-tacgggaggcagcag-3'	343-357	15 bp
350R	5'-ctgtctcctcccgtag-3'	357-342	16 bp
520F	5'-gtgccagcagccgcgg-3'	515-530	16 bp
520R	5'-accgcggctgctggc-3'	531-516	15 bp
780F	5'-gattagataccctgtag-3'	786-803	18 bp
780R	5'-ctaccagggtatctaacc-3'	803-785	19 bp
920R	5'-gtcaattccttgagttt-3'	924-907	18 bp
1100F	5'-gcaacgagcgaaccc-3'	1099-1114	16 bp
1100R	5'-agggttgcgctcgttg-3'	1115-1100	16 bp
1240R	5'-ccattgtagcacgtgt-3'	1242-1227	16 bp
1492R	5'-ggttacctgttacgactt	1510-1492	19 bp

Komposisi siklus sekuensing yang digunakan untuk merunut basa nukleotida disajikan pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 Komposisi Siklus Sekuensing 16S rDNA

Komponen	Pengenceran (μL)					
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
BDT RRmix ¹⁾	4	2	1	0,5	0,25	0,125
5 \times Seq Buffer (μL) ²⁾	-	1	1,5	1,75	1,88	1,875
Seq Primer (3,2 μM)	0,5 μL dari 10 μM stok primer					
DNA template	10–20 ng (atau 10 ng/100 bp)					
Mili-Q water	Sampai 10 μL					

Catatan:

- 1) BDT RRmix: *Big Dye Terminator Ready Reaction mix* adalah 2,5 \times kekuatan.
- 2) Komposisi dari ABI 5 \times Seq Buffer adalah 350 mM Tris-HCl pH 9 dan 2,5 mM MgCl₂.
- 3) 10 \times Buffer untuk *Thermosequenase II* Kit terdiri atas 400 nM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl₂ (2 mL dari 2M Tris-HCl pH 9 + 100 μL dari 1M MgCl₂ + 7,9 mL dari Mili-Q). Autoklaf dan difiltrasi, simpan dalam -20°C juga dapat digunakan sama dengan *ABI Seq Buffer*.

Setelah itu, dimasukkan ke dalam mesin sekuensing. Program yang digunakan untuk sekuensing, yaitu

- 1) **Program cycle untuk BDT v3.1** adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 96°C selama 60 detik, kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 5 detik, dan pemanjangan pada suhu 60°C selama 90 detik. Setelah 40 siklus berakhir, hasilnya dapat disimpan pada suhu 4°C.
- 2) **Program cycle untuk BDT v1.1** adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 96°C selama 60 detik dan dilanjutkan dengan 25

siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 5 detik dan pemanjangan pada suhu 60°C selama 4 menit. Setelah 25 siklus berakhir, hasilnya dapat disimpan pada suhu 4°C.

f) Purifikasi hasil siklus sekuensing

- 1) Siapkan 10 µL produk siklus sekuensing di dalam tabung PCR.
- 2) Tambahkan 1 µL dari 125 mM EDTA dan 1 µL dari 3M Na-asetat (pH 5,2). Penambahan EDTA dan Na-asetat harus terpisah.
- 3) Tambahkan 25 µL etanol absolut (>95%).
- 4) Campurkan hingga larut dengan dibolak-balik dan biarkan pada suhu ruangan selama 15 menit.
- 5) Sentrifugasi pada 20.000×g selama 15 menit atau 16.100 rcf selama 25 menit di suhu 4°C.
- 6) Buang supernatan dengan cara dituang atau menggunakan pipet secara hati-hati.
- 7) Keringkan pada suhu ruang selama 5–10 menit.
- 8) Letakkan dalam ruang gelap dan simpan dalam *freezer* -20°C sampai digunakan (dapat disimpan hingga satu bulan).

g) Injeksi sampel di mesin sekuensing

Sebelum dimasukkan ke dalam mesin sekuensing, sampel DNA harus dipreparasi dengan cara:

- 1) Tambahkan 10–15 µL *Hi-Di formamide*.
- 2) Panaskan pada suhu 95°C dengan mesin PCR.
- 3) Dinginkan segera dalam es.
- 4) Transfer ke ABI 96 *well plate* (tempat sampel untuk mesin sekuensing) dan ditutup dengan *septum*.
- 5) Jalankan sampel ke dalam mesin sekuensing dalam waktu 24 jam.

h) Analisis data hasil sekuensing

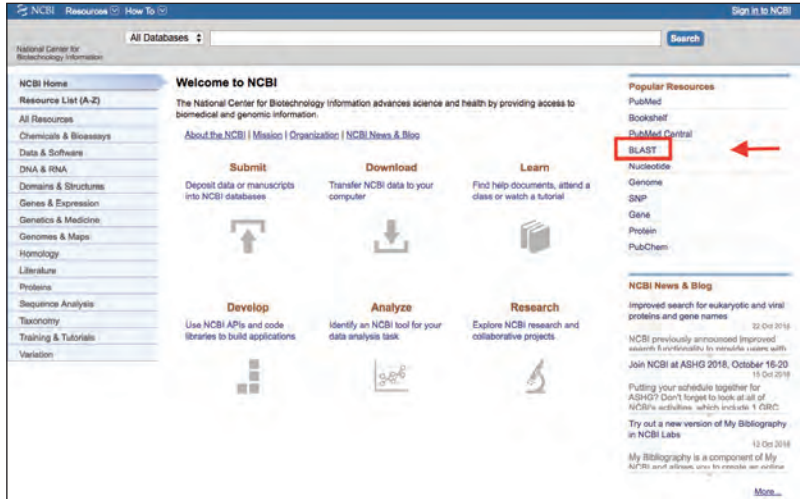
1. *Trimming, assembling*

- (1) Unduh hasil mesin sekuensing berupa kromatogram dengan perangkat lunak “Bioedit”.
- (2) Analisis puncak-puncak grafik yang tergambar. Jika sebagian besar menunjukkan grafik yang bagus, dapat dilanjutkan ke analisis selanjutnya.
- (3) Edit kode-kode urutan DNA hasil sekuensing terlebih dahulu dengan menggunakan program “Bioedit” karena selalu terdapat sekuen yang tidak bagus, terutama pada bagian awal dan akhir sekuensing. Potong bagian sekuen di ujung-ujung kromatogram, yaitu bagian awal/akhir yang menunjukkan grafik kromatogram yang tidak bagus (grafik kromatogram yang baik memiliki satu puncak yang terpisah untuk setiap satu kode basa N). Jika menggunakan lebih dari satu primer, hasil edit sekuen dari beberapa primer harus digabung (*assembling*) menjadi “contig” menggunakan perangkat lunak Bioedit.

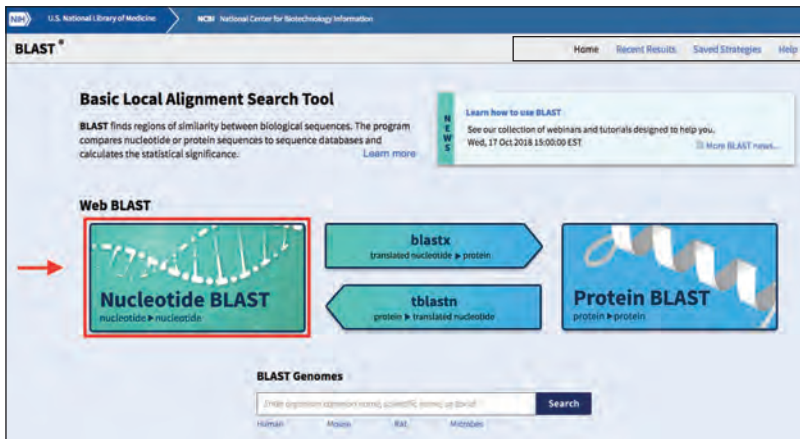
2. Pencarian homologi menggunakan BLAST

Kemudian, hasil urutan DNA yang telah diedit disejajarkan/dibandingkan dengan data urutan DNA di *GenBank* yang terbuka untuk publik melalui internet pada situs web National Center for Biotechnology Information (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov. Perbandingan urutan DNA ini dilakukan dengan analisis *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui mikroorganisme yang mempunyai urutan paling mirip dengan sampel sehingga identitas mikroorganisme tersebut dapat diduga. Tahap analisis menggunakan BLAST adalah sebagai berikut.

- (1) Buka situs www.ncbi.nlm.nih.gov



Gambar 4.8 Tampilan Situs www.ncbi.nlm.nih.gov

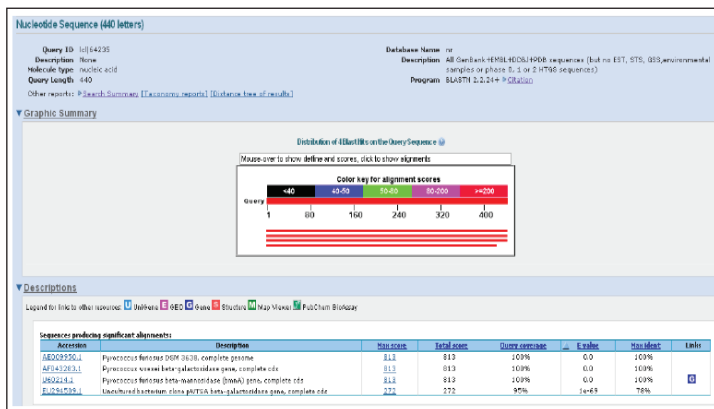


Gambar 4.9 Tampilan Layar Pilihan Menu Program BLAST

- (2) Pilih tool "BLAST", akan muncul tampilan pilihan program BLAST lalu pilih "nucleotide blast" (blastn).
- (3) Setelah tampilan muncul, masukkan sekuen nukleotida (*query*) yang akan dicari; "BLAST" untuk memulai proses pencarian. Misalnya, sekuen nukleotida DNA yang digunakan adalah berikut ini:

ATGTTCCCTGAAAAGTTCCCTTTGGGGTGTGGCA-
 CAATCGGGTTTTTCAGTTTGAAATGGGGGATAAACT-
 CAGGAGGAATATTGACACTAACACTGATTGGTGG-
 CACTGGGTAAGGGATAAGACAAATATAGAGAAAGG-
 CCTCGTTAGTGGAGATCTTCCCGAGGAGGGGATTAA-
 CAATTACGAGCTTTATGAGAAGGACCATGAGATTG-
 CAAGAAAGCTGGGTCTTAATGCTTACAGAATAGG-
 CATAGAGTGGAGCAGAATATTCCCATGGCCAACGA-
 CATTTATTGATGTTGATTATAGCTATAATGAAT-
 CATATAACCTTATAGAAGATGTAAGATCACCAAGGA-
 CACTTTGGAGGAGTTAGATGAGATCGCCAACAAGAGG-
 GAGGTGGCCTACTATAGGTCAGTCATAAACAGCCT-
 GAGGAGCAAGGGGTTAAGGTTATAGTTAATCTAAAT-
 CACTTCACCCTTCCATATTGGTTGCATGATCCCATT-
 GAGGCTAGGGAGAGGGCGTTAACTAATAAGAGGAACG-
 GCTGGGTTAA

(4) Hasil pencarian akan diperoleh tampilan sebagai berikut.



Gambar 4.10 Tampilan Layar Hasil Pencarian Homologi Sampel dengan Sekuen Terdekat

(5) Pilih hasil dengan *score* paling tinggi atau *query coverage* mendekati 100%

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pyrococcus furiosus DSM 3638, complete genome	996	996	100%	0.0	100%	AE009950.1
<input type="checkbox"/> Pyrococcus woesei beta-galactosidase gene, complete cds	996	996	100%	0.0	100%	AF043283.1
<input type="checkbox"/> Pyrococcus furiosus beta-mannosidase (bmnA) gene, complete cds	996	996	100%	0.0	100%	U60214.1
<input type="checkbox"/> Pyrococcus furiosus COM1, complete genome	990	990	100%	0.0	99%	CP003685.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone pWTSA beta-galactosidase gene, complete cds	292	292	99%	7e-75	77%	EU294509.1

Gambar 4.11 Cuplikan Tampilan Layar Hasil Pencarian Homologi dengan BLAST yang Memperlihatkan Score dan Query Coverage pada Penyejajaran Sekuen DNA

Analisis filogenetik menggunakan program *multiple alignment* Clustal X versi 1.83. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *neighbor joining*. Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot.

3. Identifikasi Isolat Aktinomisetes Secara Molekuler Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

a. Alat dan bahan

- 1) Mesin Sekuensing (*Nucleotide Analyzer*)
- 2) Mesin PCR
- 3) Sentrifus
- 4) *Water bath*
- 5) Elektroforesis
- 6) Agarosa dan etidium bromida
- 7) TAE *buffer*
- 8) Reagen ekstrasi DNA: bufer lisis, proteinase K, fenol, kloroform, NaCl, etanol absolut, etanol 70%, lisozim, Reagen reaksi PCR: enzim Taq polimerase, primer, dNTP, PCR *buffer*, MgCl₂, air bebas nuklease
- 9) Reagen purifikasi produk PCR: *polyethylene glycol* (PEG) 6000, MgCl₂, *sodium acetate*, etanol 70%, air bebas nuklease
- 10) Reagen reaksi *Cycle Sequencing*: *BigDye Terminator Ready Reaction mix*, 5× *Seq Buffer*, *Seq Primers*, *Mili-Q water*

- 11) Reagen purifikasi produk *cycle sequencing* dan preparasi sampel *sequencing*: EDTA, Na-asetat, etanol absolut, etanol 70%, *Hi-Di formamide*
- 12) Mikropipet beserta tip
- 13) Tabung mikro 1,5 mL dan 0,5 mL
- 14) *Mili-Q water*
- 15) Isolat aktinomisetes

b. Persiapan

- 1) Siapkan isolat aktinomisetes pada media ISP2 berumur 3–5 hari.
- 2) Siapkan alat dan bahan habis pakai yang sudah disterilisasi.

c. Pelaksanaan

1) Ekstraksi DNA

- a) Koloni aktinomisetes pada permukaan media padat diambil dengan menggunakan tusuk gigi steril dan disuspensikan dengan 400 μ L air bebas nuklease.
- b) Lisis sel pertama dilakukan secara mekanik dengan bantuan *Tissue eruptor*. Kemudian, disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 1.500 rpm.
- c) Supernatan dibuang, selanjutnya untuk mengoptimalkan lisis sel, pelet sel secara bertahap ditambahkan dengan 600 μ L *buffer* lisis (inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit) dan 10 μ L Proteinase K (20 mg/mL) (Inkubasi kembali pada suhu 65°C selama 30 menit).
- d) Untuk proses ekstraksi, tambahkan sebanyak 600 μ L fenol dan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 \times g. Pindahkan supernatan ke dalam tabung mikro baru. Selanjutnya, tambahkan fenol kloroform (perbandingan 1:1) sebanyak volume yang sama dengan supernatan yang dipindahkan.

- e) Pindahkan kembali supernatan ke tabung mikro baru. Selanjutnya tambahkan NaCl (150 mmol) (1× volume) dan etanol 95% dingin (2× volume). Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 ×g.
- f) Buang supernatan. Cuci pelet DNA dengan alkohol 70% dingin. Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 ×g. Buang supernatan.
- g) Keringanginkan pelet DNA di dalam *laminar air flow* selama 15 menit.
- h) Tambahkan 50 µL TE.
- i) DNA hasil ekstraksi selanjutnya disimpan pada -20°C sebelum digunakan.

2) Amplifikasi PCR

Amplifikasi fragmen 16S rDNA menggunakan *GoTaq* (Promega) dengan primer 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

- a) Siapkan komponen PCR yang akan digunakan. Total volume sebanyak 25 µL dengan komponen PCR sebagai berikut: Air bebas nuklease 10 µL, *Go Taq Green Master* 12,5 µL, Primer *forward* (10 µM) 0,5 µL, Primer *reverse* (10 µM) 0,5 µL, DMSO untuk PCR 0,5 µL, dan DNA template (10 ng/µL) 1 µL.
- b) Masukkan dengan mikropipet komponen PCR satu per satu ke dalam tabung PCR.
- c) Homogenkan dengan cara di *spin down*.
- d) Masukkan tabung PCR dalam mesin PCR dengan program seperti disajikan dalam Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Program Reaksi PCR 16S rDNA Isolat Aktinomisetes

No	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
1	Predenaturasi	94	90 detik	1
2	Denaturasi	95	30 detik	35
3	<i>Annealing</i>	55	30 detik	
4	<i>Extension</i>	72	90 detik	
5	<i>Final extension</i>	72	10 menit	1
6	<i>Hold</i>	4	∞	1

3) Tahap visualisasi dengan elektroforesis

- a) Siapkan TAE *buffer* 1×.
- b) Timbang agarosa 1% (w/v) dari volume gel agarosa yang akan dibuat.
- c) Tambahkan TAE *buffer* 1× dan agarosa ke dalam gelas *beaker*.
- d) Larutkan agarosa hingga homogen.
- e) Biarkan hingga hangat kuku.
- f) Tuang ke dalam cetakan gel agarosa dan diamkan hingga agarosa membeku.
- g) Setelah beku, agarosa siap digunakan.
- h) Masukkan gel agarosa ke dalam perangkat elektroforesis.
- i) Masukkan sampel sebanyak 2,5 µL ke dalam sumur yang tersedia.
- j) Letakkan 0,5 µL *loading dye* (apabila *ladder* tidak berwarna) ke atas parafilm. Kemudian, tambahkan 2,5 µL *ladder*, lalu homogenkan hingga rata dan masukkan ke dalam sumur gel agarosa.
- k) Fraksinasi hasil amplifikasi secara elektroforesis menggunakan *Mupid Mini Cell (exu)* pada gel agarosa 1%

dalam *Tris Acetat-EDTA* (TAE) *buffer* selama 25 menit pada 100 V.

- l) Rendam gel hasil elektroforesis dalam larutan etidium bromida dengan konsentrasi 1 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ selama 20 menit.
- m) Bilas gel agarosa menggunakan TAE *buffer* 1 \times atau akuades.
- n) Visualisasikan hasil pemisahan pada *Gel Doc Printgraph* (*Bioinstrument*, ATTO) menggunakan UV *transiluminator* dengan menggunakan standar 1 kb DNA *ladder* (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi. Hasil positif (+) ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada agar sesuai dengan urutan basa yang merujuk pada *ladder*.

4) Purifikasi PCR produk dengan metode presipitasi menggunakan *polyethylene glycol* (PEG)

- a) Tambahkan 15 μL larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM MgCl_2) dan 6 μL 3 M sodium asetat ke dalam 25 μL sampel produk PCR.
- b) Bolak-balik selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 16.100 g selama 25 menit.
- c) Buang supernatan dengan cara dipipet. Pelet DNA dicuci dengan 50 μL etanol 70% sebanyak dua kali.
- d) Larutkan pelet dengan 20 μL dH_2O *ultra pure*. Sampel 16S rDNA murni disimpan pada suhu -20°C .

5) Siklus sekuensing

Setelah purifikasi, tahap selanjutnya adalah siklus sekuensing. Komposisi yang digunakan untuk tiap tabung adalah 0,5 μL primer 10 pmol, 1 μL DNA hasil purifikasi, 0,5 μL *BigDye Terminator sequen premix kit* (Applied Biosystems Inc.,

Warrington, UK), lima kali sekuen *buffer* 1,5 μL dan *deionized water* sampai volume 10 μL . Selanjutnya, dilakukan amplifikasi dengan PCR sebanyak 40 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 96°C selama 60 detik diikuti dengan siklus yang terdiri atas denaturasi 10 detik pada suhu 96°C, *annealing* lima detik pada suhu 50°C, dan 1,5 menit *extension* pada suhu 60°C.

6) Purifikasi produk siklus sekuensing dan sekuensing

- a) Campurkan 10 μL produk siklus sekuensing dengan 1 μL 3M Na-asetat, 1 μL 125 mM EDTA (pH 8), dan 25 μL etanol absolut, kemudian divorteks dan didiamkan selama 15 menit.
- b) Lakukan sentrifugasi 16.000 $\times g$ selama 25 menit pada suhu 4°C.
- c) Buang supernatan dan cuci pelet dengan 70% etanol untuk kemudian disentrifugasi ulang 16.000 $\times g$ selama 10 menit.
- d) Buang supernatan dan kering-anginkan pelet selama 10 menit.
- e) Tambahkan pelet DNA yang sudah kering dengan 10 μL *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK), kemudian divorteks.
- f) Panaskan sampel pada suhu 95°C selama dua menit dan segera dinginkan dalam es. Tahap selanjutnya sampel diinjeksi dengan mesin sekuensing model ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster, California).

7) Analisis data hasil sekuensing

- a) Analisis hasil urutan DNA menggunakan ChromasPro
 - (1) Buka program ChromasPro.
 - (2) Klik *file*
 - (3) Klik *new*, pilih *sequencing project*.

- (4) Klik *add file*. Pilih *file* yang akan dianalisis. Pilih urutan *forward* dan *reverse*.
- (5) Jika menggunakan lebih dari satu primer, hasil sekuen dari beberapa primer harus digabung (*assembling*) menjadi “contig” dengan cara klik *assemble all*.
- (6) Analisis puncak-puncak grafik yang tergambar. Jika sebagian besar menunjukkan grafik yang bagus, dapat dilanjutkan ke analisis selanjutnya (grafik kromatogram yang baik memiliki satu puncak yang terpisah untuk setiap satu kode basa N).
- (7) Perhatikan grafik kromatogram yang terbentuk, biasanya pada bagian awal dan akhir sekuensing terdapat grafik kromatogram yang tidak bagus.
- (8) Potong bagian grafik yang tidak bagus, yaitu bagian awal/akhir.
- (9) Klik *edit*.
- (10) Pilih *select all*.
- (11) Klik *edit* pilih *copy in Fasta format*, kemudian simpan.
- (12) Selanjutnya, sekuen hasil analisis disejajarkan dengan sekuen lainnya di dalam pangkalan data pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov (Gambar 4.8 sampai Gambar 4.11)

B. MANAJEMEN MUTU MIKROORGANISME EUKARIOTIK

Mikroorganisme yang dikelompokkan dalam eukariot memiliki inti sel yang dilapisi membran (karioteka), memiliki berbagai organel yang juga dilapisi membran, jumlah kromosomnya lebih dari satu, dan DNA-nya dikelilingi oleh protein histon. Kegiatan manajemen mutu koleksi mikroorganisme InaCC yang tergolong eukariotik, yakni taksa khamir, kapang, dan sebagian mikroalga, meliputi uji

viabilitas dan validitas isolat. Berikut ini disajikan prosedur manajemen mutu mikroorganisme eukariotik.

1. Uji Viabilitas (*Accelerated Rate Test*) Isolat Mikroorganisme Eukariotik (Khamir dan Kapang)

a. Perlengkapan (bahan kimia, bahan habis pakai)

- 1) Media *potato dextrose agar* (PDA)
- 2) Ampul *L-drying/freeze-drying* isolat khamir atau kapang
- 3) Pemotong ampul (*diamond ampoule cutter*)
- 4) Kain kasa
- 5) Larutan rehidrasi
- 6) Rak tabung ampul
- 7) Pipet Pasteur
- 8) Pembakar bunsen
- 9) Cawan petri steril
- 10) Segitiga penyebar steril
- 11) Tisu
- 12) Alkohol
- 13) Sarung tangan

b. Persiapan

- 1) Sterilisasi alat dan bahan aus yang diperlukan.
- 2) Siapkan media pertumbuhan khamir atau kapang (PDA).

c. Pelaksanaan

Accelerated Rate Test dilakukan dengan membuka ampul *L-drying/freeze-drying* berisi sel/spora kering khamir atau kapang yang telah disimpan selama empat minggu pada suhu 37°C.

1) Cara Membuka Ampul

Sebelum ampul dibuka, hendaknya diperhatikan hal-hal berikut.

- a) Catat kode/nomor ampul (kode/nomor koleksi isolat mikroorganisme).
- b) Periksa tingkat kevakuman ampul dengan menggunakan alat periksa kevakuman berfrekuensi tinggi (*spark tester*).

2) Proses Pembukaan Ampul

- a) Lakukan pembukaan ampul dalam ruang steril (*Biosafety cabinet*).
- b) Lakukan pembukaan ampul secara berhati-hati di dalam ruang laboratorium.
- c) Buat keratan melingkar dengan alat pemotong ampul, kikir kaca ampul tepat di bagian tengah sumbat kapas ampul.
- d) Balut ampul dengan kain kasa pada bagian yang dikerat tadi, lalu ampul dipatahkan.
- e) Sebelum patahan ujung ampul yang runcing dilepaskan, tunggu sebentar dan biarkan udara luar masuk perlahan-lahan ke dalam ampul melewati penyaringan sumbat kapas. Dengan cara ini, akan diperoleh dua keuntungan.
 - (1) Sumbat kapas tidak akan terdorong ke dasar ampul.
 - (2) Partikel-partikel halus isolat kering mikroorganisme tidak akan bertebaran ke dalam ruang laboratorium.
- f) Panaskan bagian ampul yang terbuka dengan nyala api, kemudian tutup dengan sumbat kapuk.

Catatan: Sumbat kapas di dalam ampul (berbahaya apabila terhirup karena mengandung partikel kering sel/spora mikroorganisme) diambil dengan pinset steril dan bersama dengan patahan ujung ampul, dimasukkan ke dalam bejana berdisinfektan atau direbus.

3) Cara *Reviving* Isolat

Sebelum isolat kering-beku di dalam ampul dihidupkan kembali (*reviving*), siapkan terlebih dahulu media, suhu, dan persyaratan gas (jika ada) yang sesuai dengan jenis mikroorganisme agar diperoleh pertumbuhan yang optimal.

- a) Bubuhkan secara aseptik 0,3–0,4 mL larutan rehidrasi atau media cair lain (jika perlu) ke dalam ampul yang telah dibuka menggunakan pipet Pasteur steril.
- b) Aduk dengan teknik memipet hingga terbentuk suspensi sel mikroorganisme yang homogen dan usahakan tidak terbentuk gelembung udara.
- c) Lakukan pengenceran menggunakan metode analisis ALT.
- d) Tuang dan tumbuhkan isolat hasil pengenceran pada media tumbuh yang sesuai.
- e) Inkubasi isolat eukariot tersebut (dalam keadaan normal, isolat akan tumbuh dalam beberapa hari). Beberapa isolat tertentu cenderung tumbuh lama dan perlu diinkubasi lebih lama dua kali waktu inkubasi normal sebelum isolat dinyatakan kehilangan viabilitasnya atau dianggap mati.
- f) Hitunglah jumlah minimum sel hidup dalam ampul dengan rumus perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Jumlah sel hidup dalam ampul} = Y \times 1 \text{ mL} / 0,1 \text{ mL} \times \text{faktor pengenceran}$$

- g) Jumlah koloni dalam notasi = Jumlah koloni/mL atau CFU/mL.
- h) Khusus untuk penilaian jumlah koloni sebelum proses *L-drying* atau *freezing*, setidaknya-tidaknya memiliki kerapat-

an sel 10^8 koloni/mL. Jumlah koloni setelah proses *L-drying* setidaknya-tidaknya memiliki 10^6 koloni/mL.

- i) Sertakan data minimum berupa kode/nomor isolat, tanggal pengering-bekuan (terdapat pada kertas nomor pada ampul), berikut rincian jenis media tumbuh yang digunakan, pH media, temperatur, dan lama inkubasi serta persyaratan gas (bila ada) yang dibutuhkan sebagai kelengkapan data pada kegiatan *Accelerated Rate Test*.

2. Identifikasi Isolat Khamir secara Molekuler Berdasarkan 26S rDNA

Proses identifikasi khamir dilakukan secara molekuler karena lebih cepat, akurat, dan murah dibandingkan teknik identifikasi lain (identifikasi morfologis/fisiologis/kimiawi). Seperti identifikasi kelompok mikroorganisme lain, identifikasi molekuler khamir pada umumnya dilakukan pada daerah terkonservasi, yakni D1/D2 gen subunit besar ribosomal RNA (*D1/D2 region of 26S LSU rRNA gene*). Daerah terkonservasi tersebut sudah mampu memetakan dan mengidentifikasi suatu isolat sampai tingkat jenis. Oleh karena itu, pemetaan daerah tersebut dilakukan dengan menggunakan primer NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') dan NL4 (5'-GGTC-CGTGTTTCAAGACGG-3'). Panjang basa yang akan teramplifikasi sekitar 600 bp dan dapat dianalisis homologinya dengan pangkalan data daring yang telah terdokumentasi secara global.

a) Alat dan bahan

- 1) *Ice box*
- 2) *Laminar air flow*
- 3) Pembakar bunsen
- 4) Mikropipet + tip
- 5) Vorteks

- 6) Mesin *spin down*
- 7) Mesin PCR
- 8) Mesin sekuensing
- 9) *Hot plate* dan *magnetic stirrer*
- 10) Elektroforesis
- 11) UV *transilluminator*

b) Persiapan

- 1) Siapkan isolat khamir pada media PDA yang berusia tiga hari.
- 2) Siapkan bahan yang sudah disterilisasi.

c) Pelaksanaan

1) Tahap isolasi DNA

- (a) Ambil isolat khamir yang sudah siap menggunakan ose steril.
- (b) Masukkan isolat tersebut ke dalam tabung PCR yang berisi 50 μL air bebas nuklease.
- (c) Homogenkan dengan vorteks hingga larut.
- (d) Panaskan dengan alat PCR pada suhu 98°C selama 10 menit.
- (e) Setelah selesai, sentrifugasi sebentar menggunakan mesin *spin down* hingga terbentuk dua lapisan (atas= sebagai DNA *template*, bawah= pelet).

2) Tahap amplifikasi DNA dengan PCR

Daerah terkonservasi D1/D2 subunit besar 26S rDNA di-amplifikasi dengan teknik PCR. Adapun cara untuk melakukan amplifikasinya sebagai berikut.

Siapkan komponen PCR yang akan digunakan.

- (a) Komponen PCR khamir adalah sebagai berikut: Air bebas nuklease 10 μL , *Go Taq green master mix* 12,5 μL ,

primer *forward* (NL 1) 0,5 µL, primer *reverse* (NL 4) 0,5 µL, DMSO 0,5 µL, dan DNA *template* 1 µL.

- (b) Masukkan komponen PCR ke dalam tabung PCR satu per satu.
- (c) Gunakan kontrol negatif (-) sebagai pembanding.
- (d) Homogenkan volume komponen dengan mesin *spin down*.
- (e) Masukkan campuran PCR ke dalam mesin PCR.

Program PCR untuk khamir disajikan dalam Tabel 4.6:

Tabel 4.6 Program Reaksi PCR 26S rDNA Isolat Khamir

No.	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
1.	Predenaturasi	95	1,5 menit	1
2.	Denaturasi	95	30 detik	
3.	Annealing	50–55	30 detik	35
4.	Extension	72	1 menit	
5.	Final extension	72	15 menit	1
6.	Hold	10	10 menit	1
7.	Store	15	∞	1

3) Tahap visualisasi dengan elektroforesis

- a) Siapkan TAE *buffer* 1×.
- b) Timbang agarosa 1% (w/v) dari volume agarosa yang akan dibuat.
- c) Tambahkan TAE *buffer* 1× dan agarosa ke dalam gelas *beaker*.
- d) Panaskan agar hingga homogen.
- e) Biarkan hingga hangat kuku.
- f) Tuang ke cetakan untuk agarosa, diamkan hingga agarosa membeku.
- g) Setelah beku, agarosa siap digunakan.
- h) Masukkan agar ke dalam alat elektroforesis.

- i) Masukkan sampel sebanyak 2,5 μL ke dalam sumur gel agarosa yang tersedia.
 - j) Letakkan 0,5 μL *loading dye* (apabila *ladder* tidak berwarna) ke atas parafilm. Kemudian, tambahkan 2,5 μL *ladder*, homogenkan hingga rata dan masukkan ke dalam sumur gel agarosa.
 - k) Fraksinasi hasil amplifikasi secara elektroforesis menggunakan *Mupid Mini Cell (exu)* pada gel agarosa 1% dalam *Tris Acetat-EDTA (TAE) buffer* selama 25 menit pada 100 V.
 - l) Rendam gel hasil elektroforesis dalam larutan etidium bromida dengan konsentrasi 1 $\mu\text{L}/100$ mL selama 20 menit.
 - m) Bilas gel agarosa menggunakan *TAE buffer* 1 \times atau akuades.
 - n) Visualisasi hasil pemisahan pada *Gel Doc Printgraph (Bioinstrument, ATTO)* menggunakan *UV transiluminator* dengan standar 1 kb DNA *ladder* (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi.
 - o) Hasil positif (+) ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada agar sesuai dengan urutan basa yang merujuk pada *ladder*.
- 4) **Purifikasi PCR produk dengan metode presipitasi menggunakan *polyethylene glycol* (PEG)**
- a) Tambahkan 15 μL larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM MgCl_2) dan 6 μL 3 M Na-asetat ke dalam 25 μL sampel produk PCR.
 - b) Bolak-balik selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 16.100 g selama 25 menit.

- c) Buang supernatan dengan cara dipipet. Pelet DNA ducuci dengan 50 μL etanol 70% sebanyak dua kali.
- d) Larutkan pelet DNA dengan 20 μL dH_2O *ultra pure*. Selanjutnya, sampel DNA murni disimpan pada -20°C hingga siap digunakan.

5) Siklus sekuensing

Tahap selanjutnya adalah siklus sekuensing. Komposisi yang digunakan untuk tiap tabung adalah 0,5 μL primer 10 pmol, 1 μL DNA hasil purifikasi, 0,5 μL *BigDye Terminator sequen premix kit* (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK), 5 kali *seq buffer* 1,5 μL , dan *deionized water* sampai volume 10 μL . Selanjutnya, dilakukan amplifikasi dengan PCR sebanyak 40 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 96°C selama 60 detik, diikuti dengan siklus yang terdiri atas denaturasi 10 detik pada suhu 96°C , *annealing* lima detik pada suhu 50°C , dan 1,5 menit *extension* pada suhu 60°C .

6) Purifikasi produk siklus sekuensing dan sekuensing

- a) Campurkan 10 μL produk siklus sekuensing dengan 1 μL 3M Na-asetat, 1 μL 125 mM EDTA (pH 8), dan 25 μL etanol absolut, kemudian divorteks dan didiamkan selama 15 menit.
- b) Lakukan sentrifugasi 16.000 $\times g$ selama 25 menit pada suhu 4°C .
- c) Buang supernatan dan cuci pelet dengan etanol 70% untuk kemudian disentrifugasi ulang 16.000 $\times g$ selama 10 menit.
- d) Buang supernatan dan kering-anginkan pelet selama 10 menit.

- e) Tambahkan 10 μ L *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK) ke dalam pelet DNA yang sudah kering dan divorteks.
- f) Panaskan sampel pada suhu 95°C selama dua menit dan segera dinginkan dalam es. Tahap selanjutnya sampel diinjeksi dengan mesin sekuensing model ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster, California).

7) Analisis data hasil sekuensing

a) Analisis hasil urutan DNA menggunakan ChromasPro

- (1) Buka program ChromasPro
- (2) Klik *file*
- (3) Klik *new*, pilih *sequencing project*
- (4) Klik *add file*
- (5) Pilih urutan *forward* dan *reverse*
- (6) Klik *assemble all*
- (7) Klik *contig*
- (8) Potong bagian yang grafiknya tidak bagus dari kanan dan kiri
- (9) Klik *edit*
- (10) pilih *select all*
- (11) Klik *edit* pilih *copy in Fasta format*
- (12) Sekuen hasil analisis, kemudian sejajarkan dengan sekuen DNA lain dalam pangkalan data pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Tahap pencarian homologi menggunakan BLAST dapat dilihat pada Gambar 4.8 sampai Gambar 4.11.
- (13) Analisis filogenetik melalui *multiple allignment* pada program Clustal W/MAFFT/MUSCLE dan selanjutnya melakukan konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode

neighbor-joining. Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program MEGA 7.0.

3. Identifikasi Isolat Kapang Secara Molekuler Berdasarkan Sekuen ITS

a. Alat dan bahan

- 1) Mesin Sekuensing (*Nucleotide Analyzer*)
- 2) Mesin PCR
- 3) Sentrifus
- 4) *Water bath*
- 5) Elektroforesis
- 6) Agarosa dan etidium bromida
- 7) TAE *buffer*
- 8) Reagen ekstraksi DNA: *Nucleon PhytoPure kit*, enzim RNase, etanol 70%, isopropanol, lisozim, kloroform
- 9) Reagen reaksi PCR: enzim Taq polimerase, primer, dNTP, PCR *buffer*, MgCl₂, air bebas nuklease
- 10) Reagen purifikasi produk PCR: *polyethylene glycol* (PEG) 6000, MgCl₂, Na-asetat, etanol 70%, air bebas nuklease
- 11) Reagen reaksi *cycle sequencing*: *BigDye Terminator Ready Reaction mix*, *5× Seq Buffer*, *Seq Primers*, *Mili-Q*
- 12) Reagen purifikasi produk *cycle sequencing* dan preparasi sampel *sequencing*: EDTA, Na-asetat, etanolabsolut, etanol 70%, *Hi-Di formamide*
- 13) Mikropipet beserta tip
- 14) Tabung mikro 1,5 mL dan 0,5 mL
- 15) *Mili-Q water*
- 16) Pastel *homogenizer*
- 17) Media *potato dextrose broth* (PDB) dalam tabung reaksi
- 18) Isolat kapang umur 3–5 hari (ketika miselia sudah berkembang, tetapi kapang belum bersporulasi)

b. Persiapan

- 1) Tumbuhkan isolat kapang pada media PDB, inkubasi kultur selama 3–5 hari (hingga miselia tumbuh optimal, tetapi spora belum berkembang).
- 2) Sterilisasi alat dan bahan habis pakai.

c. Pelaksanaan

1) Ekstraksi DNA genom

- a) Transfer $\pm 0,5$ g miselia kapang yang ditanam di dalam media PDB umur 3–5 hari ke dalam tabung mikro 1,5 mL.
- b) Bilas miselia dua kali dengan akuades untuk membuang sisa media PDB.
- c) Hancurkan miselia secara mekanis dengan digerus menggunakan *homogenizer* (pastel) sampai halus.
- d) Tambahkan 300 μL reagent 1 *PhytoPure*, aduk dengan pipet.
- e) Tambahkan RNAse 3 μL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aduk dengan pipet.
- f) Inkubasi di *water bath* selama 30 menit pada suhu 37°C.
- g) Tambahkan 200 μL reagent 2 *PhytoPure*.
- h) Kocok sampel selama 10 menit.
- i) Inkubasi pada suhu ruang 10 menit.
- j) Inkubasi dalam es selama 20 menit.
- k) Ambil sampel dari es, kemudian tambahkan 250 μL kloroform dingin dan 250 μL fenol dingin.
- l) Kocok sampel selama 10 menit.
- m) Sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 10 menit, suhu 4 °C.

- n) Ambil supernatan yang terbentuk (lapisan bagian paling atas), lalu pindahkan supernatan ke tabung mikro 1,5 mL baru.
- o) Tambahkan setengah volume isopropanol dingin.
- f) Aduk perlahan sampai larutan homogen selama 10 menit.
- g) Sentrifugasi pada 10.000 rpm, 10 menit, suhu 4 °C.
- h) Terbentuk pelet DNA di dasar tabung mikro, pisahkan pelet DNA dari supernatan dengan membuang supernatan secara perlahan.
- i) Tambahkan 50 µL alkohol 80% dingin untuk membersihkan pelet DNA.
- j) Sentrifugasi pada 10.000 rpm, 10 menit, suhu 4 °C.
- k) Buang alkohol dan kering-anginkan pelet DNA selama minimal 30 menit.
- l) Larutkan pelet DNA dengan menambahkan 1× TE *buffer* (pH8) 50 µL–100 µL.
- m) Simpan DNA genom dalam *freezer* -20°C hingga siap digunakan.

2) Amplifikasi DNA dengan PCR

- a) Siapkan komponen PCR yang digunakan.
- b) Komponen PCR kapang adalah sebagai berikut: Air bebas nuklease 10 µL, *Go Taq green master mix* 12,5 µL, primer *forward* (*ITS 5*) 0,5 µL, primer *reverse* (*ITS 4*) 0,5 µL, *DMSO* 0,5 µL, dan *DNA template* 1 µL.
- c) Masukkan komponen PCR ke dalam tabung PCR satu per satu.
- d) Gunakan kontrol negatif (-) sebagai pembanding.
- e) Homogenkan volume komponen dengan mesin *spin down*.

Tabel 4.7 Program Reaksi PCR untuk Isolat Kapang

No.	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
1.	Predenaturasi	95	1,5 menit	1
2.	Denaturasi	95	30 detik	
3.	<i>Annealing</i>	50–55	30 detik	40
4.	<i>Extension</i>	72	1 menit	
5.	<i>Final extension</i>	72	15 menit	1
6.	<i>Hold</i>	10	10 menit	1
7.	<i>Store</i>	15	∞	1

f) Masukkan campuran reagen ke dalam mesin PCR.

Program amplifikasi sekuen ITS dengan teknik PCR untuk isolat kapang disajikan dalam Tabel 4.7.

3) Tahap visualisasi dengan elektroforesis

- a) Timbang agarosa 1% (w/v) dari volume agarosa yang akan dibuat.
- b) Tambahkan TAE *buffer* 1× dan *agarose* ke dalam gelas *beaker*.
- c) Larutkan agarosa hingga homogen.
- d) Biarkan hingga hangat kuku.
- f) Tuang ke cetakan untuk agarosa, lalu diamkan hingga agarosa membeku.
- g) Setelah beku, agarosa siap digunakan.
- h) Masukkan agar ke dalam alat elektroforesis.
- i) Masukkan sampel sebanyak 2,5 µL ke dalam sumur yang tersedia.
- j) Letakkan 0,5 µL *loading dye* (apabila *ladder* tidak berwarna) ke atas parafilm. Kemudian, tambahkan 2,5 µL *ladder*, lalu homogenkan hingga rata dan masukkan ke dalam sumur agarosa.
- k) Fraksinasi hasil amplifikasi secara elektroforesis menggunakan *Mupid Mini Cell (exu)* pada *gel* agarosa 1%

dalam *Tris Acetat-EDTA* (TAE) *buffer* selama 25 menit pada 100 V.

- l) Rendam gel hasil elektroforesis dalam larutan etidium bromida dengan konsentrasi 1 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ selama 20 menit.
- m) Bilas agarosa menggunakan TAE *buffer* satu kali atau akuades.
- n) Visualisasi hasil pemisahan pada *Gel Doc Printgraph* (*Bioinstrument*, ATTO) menggunakan UV *transiluminator* dengan menggunakan standar 1 kb *DNA ladder* (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi. Hasil positif (+) ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada agar sesuai dengan urutan basa yang merujuk pada *ladder*.

4) Purifikasi PCR produk dengan metode presipitasi menggunakan *polyethylene glycol* (PEG)

- a) Tambahkan 15 μL larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM MgCl_2) dan 6 μL 3 M Na-asetat ke dalam 25 μL sampel produk PCR.
- b) Bolak-balik selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 16.100 g selama 25 menit.
- c) Buang supernatan dengan cara dipipet. Pelet DNA dicuci dengan 50 μL etanol 70% sebanyak dua kali.
- d) Larutkan pelet DNA dengan 20 μL dH_2O *ultra pure*. Sampel rDNA murni selanjutnya disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

5) Siklus sekuensing

Setelah purifikasi, tahap selanjutnya adalah siklus sekuensing. Komposisi yang digunakan untuk tiap tabung adalah 0,5

μL primer 10 pmol, 1 μL DNA hasil purifikasi, 0,5 μL *BigDye Terminator sequen premix kit* (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK), 5 kali sekuen *buffer* 1,5 μL , dan *de-ionized water* sampai volume 10 μL . Selanjutnya, dilakukan amplifikasi dengan PCR sebanyak 40 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 96°C selama 60 detik, diikuti dengan siklus yang terdiri atas denaturasi 10 detik pada suhu 96°C, *annealing* 5 detik pada suhu 50°C, dan 1,5 menit *extension* pada suhu 60°C.

6) Purifikasi produk siklus sekuensing dan sekuensing

- a) Campurkan 10 μL produk siklus sekuensing dengan 1 μL 3M Na-asetat, 1 μL 125 mM EDTA (pH 8), dan 25 μL etanol absolut, kemudian divorteks dan didiamkan selama 15 menit.
- b) Lakukan sentrifugasi 16.000 $\times g$ selama 25 menit pada suhu 4°C.
- c) Buang supernatan dan cuci pelet dengan 70% etanol untuk kemudian disentrifugasi ulang 16.000 $\times g$ selama 10 menit.
- d) Buang supernatan dan kering-anginkan pelet selama 10 menit.
- e) Tambahkan 10 μL *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK) ke dalam pelet DNA yang sudah kering kemudian divorteks.
- f) Panaskan sampel pada suhu 95°C selama dua menit dan segera dinginkan dalam es. Selanjutnya, tahap sampel diinjeksi dengan mesin sekuensing model ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster, California).

7) Analisis data hasil sekuensing

a) Analisis hasil *sequence* menggunakan ChromasPro

- (1) Buka program ChromasPro
- (2) Klik *file*
- (3) Klik *new*, pilih *sequencing project*
- (4) Klik *add file*
- (5) Pilih urutan *forward* dan *reverse*
- (6) Klik *assemble all*
- (7) Klik *contig*
- (8) Potong bagian yang grafiknya tidak bagus dari kanan dan kiri
- (9) Klik *edit*
- (10) Pilih *select all*
- (11) Klik *edit* pilih *copy in Fasta format*
- (12) Kemudian, sekuen hasil analisis disejajarkan dengan sekuen DNA lain dalam pangkalan data pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Tahap pencarian homologi menggunakan BLAST dapat dilihat pada Gambar 4.8 sampai Gambar 4.11
- (13) Analisis filogenetik menggunakan program *multiple allignment* Clustal X versi 1.83. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *neighbor joining*. Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot.

Catatan: Pada analisis filogenetik kapang, tersedianya sekuen tipe (*type*) atau tipe acuan sangat penting untuk proses identifikasi. Nama final spesies atau taksa lain dengan tingkat validitas yang bisa dipercaya jika pada pohon filogenetik terdapat tipe. Jika belum tersedia, akan sangat diragukan nama hasil identifikasi kapang terse-

but. Selain itu, ditakutkan akan terjadi kesalahan dalam proses identifikasi (*wrongly identified taxa name*).

4. Identifikasi Isolat Mikroalga secara Morfologi dan Molekuler

Proses identifikasi mikroalga dilakukan melalui pendekatan morfologi di bawah mikroskop cahaya dan molekuler berdasarkan sekuen 16S rDNA untuk mikroalga prokariotik (Cyanophyta) dan 18S rDNA untuk mikroalga eukariotik. Ada empat karakteristik morfologi yang digunakan untuk membedakan divisi mikroalga, yaitu tipe jaringan sel, ada tidaknya flagela, tipe komponen fotosintesis, dan jenis pigmen sel. Selain itu, morfologi sel dan bagaimana sifat sel yang menempel berbentuk koloni/filamen merupakan informasi penting dalam membedakan tiap-tiap kelompok. Namun, karakterisasi secara konvensional ini memiliki kemungkinan bahwa mikroalga yang memiliki fenotip sama teridentifikasi menjadi spesies yang sama, padahal keduanya belum tentu secara genetik memiliki kesamaan. Oleh sebab itu, diperlukan karakterisasi dan identifikasi lebih lanjut menggunakan analisis secara molekuler. Karakteristik molekuler yang digunakan adalah dengan melakukan analisis homologi basa DNA hasil sekuensing. Analisis homologi merupakan suatu teknik untuk melihat persamaan atau kekerabatan organisme di tingkat basa dan asam amino. Urutan basa juga digunakan untuk melakukan identifikasi atau determinasi terhadap suatu organisme yang belum diketahui atau baru ditemukan. Berikut adalah alat dan bahan yang diperlukan, langkah persiapan serta pelaksanaan dalam melakukan identifikasi mikroalga.

a. Alat dan bahan

- 1) Mesin Sekuensing (*Nucleotide Analyzer*)
- 2) Mesin PCR

- 3) Sentrifus
- 4) *Water bath*
- 5) Vorteks
- 6) Elektroforesis
- 7) Pastel *homogenizer*
- 8) Agarosa dan etidium bromida
- 9) TAE *buffer*
- 10) Reagen ekstraksi DNA: *Geneaid plant kit*, enzim RNase, etanol 70%
- 11) Reagen reaksi PCR: enzim Taq polimerase, primer, DMSO, PCR *buffer* air bebas nuklease
- 12) Tabung mikro 1,5 mL dan 0,5 mL
- 13) Isolat mikroalga umur 10–14 hari (pada fase logaritma atau awal stasioner)
- 14) Media tumbuh mikroalga sesuai kelompok taksa
- 15) Minyak imersi
- 16) Mikropipet dan tip steril
- 17) Tisu
- 18) Alkohol
- 19) Sarung tangan
- 20) *Spreader*
- 21) Erlenmeyer
- 22) Mikroskop

b. Persiapan

- 1) Persiapan pembuatan media tumbuh mikroalga sesuai taksa dengan komposisi media terlampir (Lampiran 17: Komposisi Media Mikroalga) dan sterilkan menggunakan autoklaf (121°C, 1 atm, 15 menit).
- 2) Kultivasi mikroalga.
- 3) Sterilisasi alat dan bahan habis pakai.

c. Pelaksanaan

- 1) **Identifikasi mikroalga prokariotik (Cyanophyta) secara morfologi**
 - a) Siapkan 10 mL stok kultur yang telah dicek kemurniannya (harus aksenik).
 - b) Siapkan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40–100×.
 - c) Siapkan pipet pasteur steril, gelas objek dan penutupnya, minyak imersi, dan kertas tisu untuk membersihkan mikroskop.
 - d) Teteskan kultur mikroalga pada gelas objek, kemudian tutup dengan *cover glass* dan amati di bawah mikroskop, dimulai dari perbesaran kecil hingga perbesaran 100×. Apabila menggunakan perbesaran 100×, harus ditetaskan minyak imersi sebelumnya untuk mencegah gesekan lensa mikroskop dan tutup gelas objek.
 - e) Objek yang diamati adalah sel mikroalga yang tidak mempunyai dinding sel sebenarnya dan organel sel terlihat tersebar atau tidak beraturan di dalam selnya.
 - f) Bentuk atau arsitektur sel diamati dengan mengamati karakter morfologi, yaitu ukuran dan bentuk sel (bulat, memanjang, tidak beraturan, berkoloni atau tunggal, berlendir atau tidak).
 - g) Untuk sel yang berbentuk bulat (*Chroococcales*, *Chamaesiphonales*, *Pleurocapsales*, *Stigonematales*), akan dilanjutkan dengan prosedur analisis molekuler.
 - h) Untuk sel yang berbentuk memanjang dan berfilamen diperlukan observasi bentuk ujung sel, membulat, meruncing, ada seludang (penutup) atau tidak. Apakah mempunyai sel generatif/hormogonia (sel yang terlihat

lebih besar dari rangkaiannya, membulat, dan berisi di dalamnya) atau hanya mempunyai heterosista yang berbentuk membulat besar, tetapi tidak berisi (*Nostocales*).

- i) Setelah identifikasi morfologi selesai, dilanjutkan identifikasi menggunakan pendekatan molekuler.

2) Identifikasi mikroalga eukariotik secara morfologi

- a) Siapkan 10 mL stok kultur yang telah dicek kemurniannya (aksenik atau nonaksenik).
- b) Siapkan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40–100×.
- c) Siapkan pipet pasteur steril, gelas objek berikut penutupnya, minyak imersi, dan tisu untuk membersihkan mikroskop.
- d) Teteskan mikroalga di atas kaca objek dan tutup dengan *cover glass*, kemudian amati di bawah mikroskop, dimulai dari perbesaran kecil hingga perbesaran 100×. Apabila menggunakan perbesaran 100×, harus ditetaskan minyak imersi sebelumnya untuk mencegah gesekan antara lensa mikroskop dan *cover glass*.
- e) Objek yang diamati adalah sel mikroalga yang ber dinding sel sebenarnya, mempunyai inti sel, dan mempunyai kloroplas.
- f) Pengamatan morfologi luar/bentuk sel mikroalga: bulat, memanjang, tidak beraturan, berkoloni atau tunggal, berlendir atau tidak.
- g) Pengamatan kloroplas. Kloroplas diamati dengan mencirikan warna, bentuk, jumlah, dan letak kloroplas. Kloroplas adalah organel yang mengandung pigmen

warna fotosintetik. Apabila kloroplas berwarna hijau terang, kemungkinan adalah Chlorophyta; apabila hijau kekuningan, kemungkinan adalah Euglenophyta, Cryptophyta, Diatom, Glaucophyta, atau Dinophyta; apabila berwarna kuning kecokelatan, kemungkinan Glaucophyta atau Phaeophyta; dan kloroplas berwarna kemerahan adalah Rhodophyta atau Phaeophyta.

- h) Pengamatan alat gerak, yakni flagela. Karakter flagela yang diamati meliputi ukuran, jumlah, dan cara menggerakkannya, atau bergerak dengan kontraksi selnya.
- i) Pengamatan sitologi/organel sel yang ada, meliputi kloroplas, inti sel, dinokarion, vakuola, dan pati.
- j) Carilah referensi/monograf setelah semua ciri morfologi diamati dan dicatat.
- k) Pengamatan cara reproduksi, membelah atau konjugasi atau membentuk organ khusus.
- l) Penentuan nama takson mikroalga. Pertelaan secara morfologi bersifat tentatif dan perlu disandingkan dengan hasil analisis molekuler.

3) Identifikasi mikroalga secara molekuler

- a) Ekstraksi DNA genom
 - (1) Siapkan sel mikroalga dengan menyentrifugasi 1,5 mL kultur mikroalga dalam tabung mikro pada kecepatan 3.000 rpm selama 4 menit dan suhu di bawah 10°C.
 - (2) Buang supernatan, hancurkan dinding sel secara mekanis dengan digerus menggunakan *homogenizer* (pastel) sampai halus.

- (3) Tambahkan 400 μL GPI *buffer* dan 5 μL . Inkubasi sampel pada suhu 60°C selama 10 menit.
- (4) Tambahkan 100 μL GP2 *buffer*, homogenkan dengan divorteks, simpan sampel dalam es selama tiga menit.
- (5) *Filter column* ditempatkan ke dalam 2 mL *collection tube*, masukan sampel ke dalam filter. Sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama satu menit.
- (6) Filter dibuang, lalu supernatan ditransfer dari 2 mL *collection tube* ke 1,5 mL tabung mikro.
- (7) Tambahkan $1,5 \times$ volume GP3 *buffer* (contoh 500 μL sampel, ditambah 750 μL GP3 *buffer*).
- (8) GD *column* ditempatkan ke dalam 2 mL *collection tube*.
- (9) Sebanyak 700 μL sampel ditransfer ke GD *column*. Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama dua menit.
- (10) Supernatan dibuang, GD *column* ditempatkan kembali ke dalam 2 mL *collection tube*.
- (11) Transfer sisa sampel ke GD *column*. Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama dua menit.
- (12) Supernatan dibuang, GD *column* ditempatkan kembali ke dalam 2 mL *collection tube*.
- (13) Tambahkan 400 μL W1 *buffer* ke dalam GD *column*.
- (14) Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik.
- (15) Supernatan dibuang, GD *column* ditempatkan kembali ke dalam 2 mL *collection tube*.
- (16) Tambahkan 600 μL *Washbuffer* ke dalam GD *column*.
- (17) Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik.
- (18) Supernatan dibuang, GD *column* ditempatkan kembali ke dalam 2 mL *collection tube*.

- (19) Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan.
- (20) GD *column* dipindahkan ke 1,5 mL tabung mikro.
- (21) Tambahkan 100 μ L *Elution buffer* (yang telah diinkubasi pada suhu 60°C).
- (22) Simpan sampel pada suhu ruang selama 3–5 menit.
- (23) Sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik.
- (24) Pindahkan *template* DNA ke tabung PCR (mikro).
- (25) Simpan DNA genom dalam *freezer* -20°C hingga siap digunakan.

b) Amplifikasi rDNA dengan PCR

- (1) Siapkan komponen PCR yang digunakan.
- (2) Komponen PCR mikroalga adalah sebagai berikut:
Air bebas nuklease 10 μ L, *Go Taq green master mix* 12.5 μ L, Primer *forward* 0,5 μ L, Primer *reverse* 0,5 μ L, *DMSO* 0,5 μ L, dan *DNA template* 1 μ L.
- (3) Primer spesifik mikroalga yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen 16S rDNA dan 18S rDNA berturut-turut ditampilkan dalam Tabel 4.8 dan Tabel 4.9.
- (4) Masukkan komponen PCR ke dalam tabung PCR satu per satu.
- (5) Gunakan kontrol negatif (-) sebagai pembanding.

Tabel 4.8 Primer Spesifik Mikroalga yang Digunakan untuk Mengamplifikasi 16S rDNA

Nama	Urutan DNA
A8F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
A1492R	5' TACGGCTACCTDTTACGACTT 3'
27F Algae	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1510R Algae	5' GGCTACCTTGTTACGACTT 3'

Tabel 4.9 Primer Spesifik Mikroalga yang Digunakan untuk Mengamplifikasi 18S rDNA

Nama	Urutan DNA
Univ-F1131	5' AAACYAAAGRAATTGACGG 3'
Univ-R1629	5' GACGGCGGTGTGTRC 3'
2F	5' TACCTGGTTGATCCTGCCAG 3'
634R	5' ACTACGAGCTTTTAACTGC 3'
571F	5' AGGGCAAGTCGTGTGCCAG 3'
1314R	5' AACTAAGAACGGCCATGCAC 3'
1271F	5' GGATTGACAGATTGAGACAGCT 3'
1846R	5' CCTCCGCAGTTCACCTAC 3'

- (6) Homogenkan komponen PCR dengan mesin *spin down*.
- (7) Masukkan campuran PCR ke dalam mesin PCR.

Program PCR untuk Mikroalga disajikan pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Program PCR untuk Isolat Mikroalga

No.	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
1.	Predenaturasi	94	3 menit	1
2.	Denaturasi	94	30 detik	35
3.	Annealing	50-55	30 detik	
4.	Extension	72	1,5 menit	
5.	Final extension	72	7 menit	1
6.	Hold	4	∞	1

c) Tahap visualisasi dengan elektroforesis

- (1) Timbang agarosa 1% (w/v) dari volume agarosa yang akan dibuat.
- (2) Tambahkan TAE *buffer* 1× dan agarosa ke dalam gelas *beaker*.
- (3) Larutkan agarosa hingga homogen.
- (4) Biarkan hingga hangat kuku.

- (5) Tuang ke cetakan untuk agarosa, lalu diamkan hingga agarosa membeku.
- (6) Setelah beku, agarosa siap digunakan.
- (7) Masukkan agar ke dalam alat elektroforesis.
- (8) Masukkan sampel sebanyak 2,5 μL ke dalam sumur yang tersedia.
- (9) Letakkan 0,5 μL *loading dye* (apabila *ladder* tidak berwarna) ke atas parafilm. Kemudian, tambahkan 2,5 μL *ladder*, lalu homogenkan hingga rata dan masukkan ke dalam sumur agarosa.
- (10) Fraksinasi hasil amplifikasi secara elektroforesis dengan menggunakan *Mupid Mini Cell (exu)* pada gel agarosa 1% dalam *Tris Acetat-EDTA (TAE) buffer* selama 25 menit pada 100 V.
- (11) Rendam gel hasil elektroforesis dalam larutan etidium bromida dengan konsentrasi 1 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ selama 20 menit.
- (12) Bilas agarosa menggunakan *TAE buffer* 1 \times atau akuades.
- (13) Visualisasi hasil pemisahan pada *Gel Doc Printgraph (Bioinstrument, ATTO)* menggunakan *UV transilluminator* dengan menggunakan standar 100 bp *DNA ladder* (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi. Hasil positif (+) ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada agar sesuai dengan urutan basa yang merujuk pada *ladder*.
- (14) Purifikasi PCR produk.
- (15) Siklus sekuensing dan sekuensing.
- (16) Purifikasi produk siklus sekuensing dan sekuensing.
- (17) Analisis data hasil sekuensing menggunakan *ChromasPro* dan pencarian homologi menggunakan *BLAST*.

- (18) Sandingkan hasil analisis molekuler dengan data identifikasi secara morfologi.

C. MANAJEMEN MUTU ARKEA

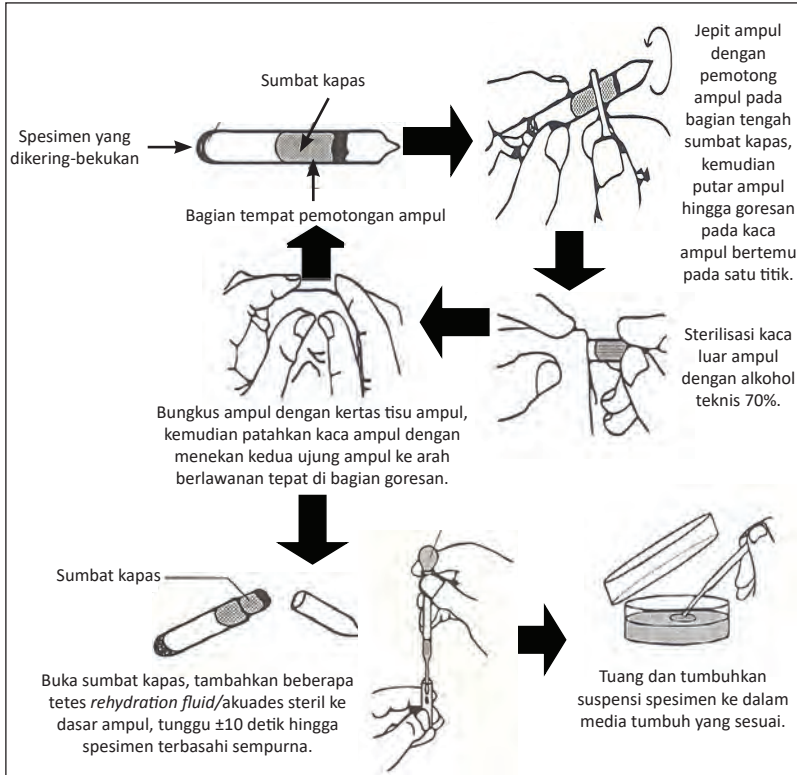
Prosedur uji viabilitas untuk koleksi mikroorganisme arkea InaCC sama dengan prosedur untuk uji viabilitas prokariotik. Media pertumbuhan yang digunakan untuk kegiatan penjaminan mutu koleksi arkea InaCC disesuaikan dengan karakter genetik dan fisiologis isolat arkea tersebut. Berikut ini disajikan prosedur untuk kegiatan enumerasi dan identifikasi isolat arkea InaCC.

1. Uji Viabilitas (*Accelerated Rate Test*) Isolat Arkea

Tahapan uji viabilitas isolat arkea yang meliputi cara pembukaan ampul dan teknik pencawanan ditampilkan pada Gambar 4.12.

a. Perlengkapan (bahan kimia, bahan habis pakai)

- 1) Media pertumbuhan arkea (d disesuaikan dengan media tumbuh optimal tiap-tiap *strain*, misalnya media Halo2a untuk arkea halofilik)
- 2) Ampul *L-drying/freeze-drying* isolat arkea
- 3) Pemotong ampul (*diamond ampoule cutter*)
- 4) *Kim wipes*/kain kasa
- 5) Larutan rehidrasi
- 6) Rak tabung ampul
- 7) Pipet pasteur
- 8) Pembakar bunsen
- 9) Cawan petri steril
- 10) Segitiga penyebar steril
- 11) Tisu
- 12) Alkohol
- 13) Sarung tangan



Gambar 4.12 Prosedur Uji Viabilitas Preservasi dalam Ampul *L-drying/Freeze-drying* (NITE, 2008)

b. Persiapan

- 1) Sterilisasi alat dan bahan aus yang diperlukan.
- 2) Siapkan media pertumbuhan isolat arkea (d disesuaikan dengan media tumbuh optimal tiap-tiap *strain*).

c. Pelaksanaan

ART dilakukan dengan membuka ampul *L-drying/Freeze-drying* berisi sel kering isolat arkea yang telah disimpan selama dua minggu pada suhu 37°C.

1) Cara Membuka Ampul

Sebelum ampul dibuka, hendaknya diperhatikan hal-hal berikut.

- a) Catat kode/nomor ampul (kode/nomor koleksi isolat mikroorganisme).
- b) Periksa tingkat kevakuman ampul dengan menggunakan alat periksa kevakuman berfrekuensi tinggi (*spark tester*).

2) Proses Pembukaan Ampul

- a) Lakukan pembukaan ampul di dalam laboratorium.
- b) Lakukan pembukaan ampul dalam ruang steril (*Biosafety cabinet*).
- c) Buat keratan melingkar dengan alat pemotong ampul, kikir kaca ampul tepat di bagian tengah sumbat kapuk ampul dengan sekali keratan (Gambar 4.12).
- d) Balut ampul dengan *Kim wipes*/kain kasa di bagian yang dikerat tadi, lalu ampul dipatahkan.
- e) Sebelum patahan ujung ampul yang runcing dilepaskan, tunggu sebentar dan biarkan udara dari luar masuk perlahan-lahan ke dalam ampul melewati penyaringan sumbat kapuk. Dengan cara ini, akan diperoleh dua keuntungan, yaitu
 - (1) Sumbat kapuk tidak akan terdorong ke dasar ampul.
 - (2) Partikel-partikel halus isolat kering mikroorganisme tidak akan bertebaran ke dalam ruang laboratorium.
- f) Panaskan bagian ampul yang terbuka dengan nyala api, kemudian tutup dengan sumbat kapuk.

Catatan: Sumbat kapuk di dalam ampul (berbahaya apabila terhirup karena mengandung partikel kering sel/spora mikroorganisme) diambil dengan pinset steril

dan bersama dengan patahan ujung ampul, dimasukkan ke dalam bejana berisi disinfektan atau direbus.

3) Cara *Reviving* Isolat

Sebelum isolat kering-beku di dalam ampul dihidupkan kembali (*reviving*), siapkan terlebih dahulu media, suhu, dan persyaratan gas (jika ada) yang sesuai dengan jenis mikroorganisme agar diperoleh pertumbuhan yang optimal.

- a) Bubuhkan secara aseptik 0,1 mL larutan rehidrasi ke dalam ampul yang telah dibuka menggunakan pipet pasteur steril.
- b) Aduk dengan teknik memipet hingga terbentuk suspensi sel mikroorganisme yang homogen dan usahakan tidak terbentuk gelembung udara.
- c) Lakukan pengenceran menggunakan metode analisis ALT. Pengenceran dilakukan hingga faktor pengenceran 10^{-5} menggunakan larutan NaCl 0,85%.
- d) Ambil sebanyak 100 μ L hasil pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} menggunakan mikropipet, kemudian tuang dan ratakan dengan segitiga penyebar pada media pertumbuhan arkea sebanyak dua kali (duplo).
- e) Inkubasi isolat arkea tersebut sesuai dengan suhu dan waktu pertumbuhan optimalnya. Beberapa isolat tertentu cenderung tumbuh lama dan perlu diperpanjang waktu inkubasinya, yaitu dua kali waktu inkubasi normal sebelum isolat dinyatakan kehilangan viabilitasnya atau dianggap mati.
- f) Hitung jumlah minimum sel hidup dalam ampul dengan rumus perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Jumlah sel hidup dalam ampul} = \text{Jumlah koloni} \times 1/0,1 \times \text{faktor pengenceran}$$

- g) Jumlah koloni dalam notasi = Jumlah koloni/mL atau CFU/mL.
- h) Khusus untuk penilaian jumlah koloni sebelum proses *L-drying* atau *freezing* setidaknya-tidaknya memiliki kerapatan sel 10^8 koloni/mL. Jumlah koloni setelah proses *L-drying* setidaknya-tidaknya memiliki 10^6 koloni/mL.
- i) Sertakan data minimum berupa kode/nomor isolat, tanggal pengering-bekuan (terdapat pada kertas nomor pada ampul), berikut rincian jenis media tumbuh yang digunakan, pH media, temperatur dan lama inkubasi serta persyaratan gas (bila ada) yang dibutuhkan sebagai kelengkapan data pada kegiatan *Accelerated Rate Test*.

2. Identifikasi Isolat Arkea Secara Molekuler Berdasarkan 16S rDNA

a. Alat dan bahan

- 1) Mesin sekuensing (*Genetic Analyzer*)
- 2) Mesin PCR
- 3) *Heat block*
- 4) Mesin *spin down*
- 5) Vorteks
- 6) Elektroforesis
- 7) Agarosa dan etidium bromida
- 8) TAE *buffer*
- 9) Air bebas nuklease/*Mili-Q*
- 10) Reagen purifikasi produk PCR: *polyethylene glycol* (PEG) 6000, MgCl_2 , Sodium asetat (Na-asetat), etanol 70%, akuades steril

- 11) Reagen reaksi *cycle sequencing*: *BigDye Terminator Ready Reaction mix*, *5× Seq Buffer*, primer spesifik 16S rDNA untuk arkea, air bebas nuklease/*Mili-Q*.
- 12) Reagen reaksi *Cycle Sequencing* dan preparasi sampel *sequencing*: EDTA, Na-asetat, Etanol absolut, Etanol 70%, *Hi-Di formamide*.
- 13) Reagen reaksi PCR: enzim Taq polimerase, primer spesifik 16S rDNA untuk arkea, dNTP, *buffer*, $MgCl_2$, air bebas nuklease, DMSO,
- 14) Mikropipet beserta tip
- 15) Tabung mikro 1,5 mL untuk penggunaan molekuler
- 16) Tabung PCR
- 17) Sentrifus
- 18) Isolat arkea dengan umur minimal satu bulan

Catatan: Apabila isolat arkea dengan umur satu bulan belum tumbuh optimal, inkubasi kembali isolat tersebut hingga kondisi pertumbuhannya optimal.

b. Persiapan

- 1) Persiapkan isolat yang akan dianalisis dengan umur minimal satu bulan yang merupakan kultur tunggal (murni).
- 2) Persiapkan semua alat sebelum digunakan.
- 3) Persiapkan semua reagen.

c. Pelaksanaan

1) Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode *heat shock* dengan tahapan kerja sebagai berikut.

- a) Ambil isolat arkea secukupnya dan masukkan ke dalam tabung PCR dan sudah diisi $0,2 \times TE$ *buffer*.

- b) Vorteks selama 30 detik.
 - c) Panaskan pada suhu 98°C selama 10 menit dengan menggunakan *heat block*.
 - d) *Spin down* selama 30 detik.
 - e) Supernatan sudah siap digunakan sebagai *DNA template*.
- Catatan: 0,2× TE *buffer* dapat diganti dengan air bebas nuklease.

2) Amplifikasi 16S rDNA dengan PCR

Dengan menggunakan mikropipet, masukkan komponen PCR satu per satu ke dalam tabung PCR. Semua langkah harus dilakukan dalam *es/cold rack* hingga campuran PCR siap direaksikan di mesin PCR. Komposisi PCR untuk amplifikasi 16S rDNA adalah sebagai berikut: 2,5 µL 10× *Taq buffer*; 2 µL campuran dNTP; 1 µL primer *forward* 10 µM (Ar 109 F: 5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'); 1 µL primer *reverse* 10 µM (Ar 915 R: 5'-GTGCTCCCCCGC-CAATTCC-3'); 5 µL DNA *Template*; 2,5 µL Taq Polimerase (10 unit/µL) dan air bebas nuklease hingga volume campuran 25 µL. Konsentrasi akhir dari 10× *Taq buffer*, campuran dNTP, primer *forward*, primer *reverse*, DNA *template* dan Taq polimerase berturut-turut adalah 1×; 200 µM; 0,4 µM; 0,4 µM; 0,02–0,2 ng dan 0,05 unit. Primer Ar 109 F dan Ar 915 R dapat diganti dengan primer spesifik arkea lain yang menyandi 16S rDNA arkea. Kemudian, tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan program seperti disajikan dalam Tabel 4.11.

Tabel 4.11 Program Reaksi PCR untuk Amplifikasi 16S rDNA Arkea

No.	Keterangan	Suhu (°C)	Waktu	Pengulangan
1.	Predenaturasi	95	10 menit	
2.	Denaturasi	95	30 detik	
3.	<i>Annealing</i>	50	30 detik	30 kali
4.	<i>Extention</i>	72	90 detik	
5.	<i>Final Extention</i>	72	10 menit	
6.	<i>Cold</i>	4	10 menit	
7.	<i>Hold</i>	15	~	

3) Fraksinasi DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan gel elektroforesis

Untuk mengukur kualitas DNA, hasil amplifikasi dapat dilihat melalui gel elektroforesis dengan langkah-langkah sebagai berikut.

- Buatlah gel agarosa dengan konsentrasi 1% (w/v) dengan $1\times$ TAE *buffer* sebagai pelarut.
- Masukkan 2,5 μ L amplikon (produk PCR) ke dalam sumur gel agarosa.
- Ulangi langkah kedua pada amplikon lain, sisakan minimal satu sumur gel agarosa untuk penanda/*marker* DNA *ladder*.
- Masukkan 2 μ L dari DNA *ladder* (1 kb) ke dalam sumur gel agarosa. Apabila *ladder* tidak berwarna, campurkan terlebih dahulu dengan *loading dye* sebanyak 0,5 μ L.
- Jalankan mesin elektroforesis selama 30 menit pada tegangan 100 volt.
- Rendam gel agarosa dalam larutan etidium bromida (1 mL/1.000 mL) selama 30 menit.
- Lihat di bawah sinar UV dan dokumentasikan (menggunakan alat *transiluminator*).

4) Purifikasi produk PCR

DNA yang telah diamplifikasi selanjutnya dipurifikasi dengan metode presipitasi PEG (Hiraishi, Kamagata, dan Nakamura, 1995) dengan beberapa modifikasi sebagai berikut.

- a) Masukkan 25 μL larutan amplicon 16S rDNA ke dalam tabung PCR.
- b) Tambahkan 15 μL larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM MgCl_2) dan 6 μL dari 3M Na-asetat.
- c) Homogenkan dengan digoyang pelan selama 10 menit pada suhu ruang.
- d) Sentrifugasi pada kecepatan 17.800 $\times g$ selama 15 menit atau 16.000 rcf selama 25 menit pada suhu ruang.
- e) Ambil supernatan secara hati-hati dengan menggunakan mikropipet.
- f) Cuci presipitat DNA dengan 70% etanol sebanyak dua kali.
- g) Sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama lima menit, lalu buang supernatan yang dihasilkan.
- h) Keringkan selama 10 menit.
- i) Larutkan kembali ke dalam 20 μL akuades steril.
- j) 16S rDNA yang sudah terpurifikasi disimpan dalam mesin pendingin -20°C sampai digunakan.

5) Siklus sekuensing (*Cycle sequencing*)

Dalam siklus sekuensing, DNA utas ganda diubah menjadi utas tunggal linear dan untuk selanjutnya diurutkan pada tahap sekuensing. Daftar primer spesifik yang digunakan dalam pengurutan 16S rDNA isolat arkea dan komposisi siklus pelabelan DNA dalam kegiatan pengurutan basa nukleotida berturut-turut disajikan dalam Tabel 4.12 dan Tabel 4.13

Tabel 4.12 Primer Spesifik Arkea untuk Pengurutan 16S rDNA

Nama	Urutan basa N	Mer
Aro010F	5'-TCYGGTTGATCCYGCCRG-3'	18 bp
Aro023mLF	5'-TcYgGtTKATCCTG-3'	14 bp
Aro025F	5'-CTGGTTTATCCTGCCAG-3'	17 bp
Aro109F(0109F)	5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'	17 bp
Aro334F	5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3'	17 bp
Aro340F(0340F)	5'-CCCAGGCCCTACGGG-3'	15 bp
Aro500F(0500F)	5'-CCAGCMGCCGCGTAACAC-3'	19 bp
Aro500R(0500R)	5'-GTGTTACCGCGGCKGCTGG-3'	19 bp
Aro800F(0800F)	5'-GATTAGATACCCGGGTAG-3'	18 bp
Aro800R(0800R)	5'-ACTACCCGGGTATCTAATC-3'	19 bp
Aro915F(0915F)	5'-GGAATTGGCGGGGAGCAC-3'	19 bp
Aro915R(0915R)	5'-GTGCTCCCCGCCAATTC-3'	19 bp
Aro958R	5'-YCCGCGGTTGAMTCCAATT-3'	19 bp
Ar1000F(1000F)	5'-AGTCAGGCAACGAGCGAGA-3'	19 bp
Ar1000R(1000R)	5'-TCTCGCTCGTTGCCTGACT-3'	19 bp
Ar1407R(1407R)	5'-GACGGGCGGTGTGTGC-3'	16 bp
Ar1521R	5'-AGGTGATTCAGCCGAGTT-3'	20 bp
Ar1530R	5'-GGAGGTGATCCAGCCG-3'	16 bp
Uv0530F	5'-GTGNCAGCMGCCGCGG-3'	16 bp
Uv1400R	5'-ACGGGCGGTGTGTRCAAG-3'	18 bp
Uv1500mR(1500R)	5'-GGYTACCTTGTACGAC-3'	17 bp

Tabel 4.13 Komposisi Siklus Pelabelan DNA dalam Kegiatan Pengurutan Basa Nukleotida

	Pengenceran					
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
BDT RRmix ¹⁾	4 µL	2 µL	1 µL	0,5 µL	0,25 µL	0,125 µL
5× Seq Buffer ²⁾	-	1 µL	1,5 µL	1,75 µL	1,88 µL	1,875 µL
Seq Primer (3,2 µM)	0,5 µL dari 10 µM primer stok					
DNA template	10–20 ng (atau 10 ng/100 bp)					
Mili-Q water	Sampai 10 µL					

Catatan:

- 1) *BDT RR mix: BigDye Terminator Ready Reaction mix* adalah 2,5× kekuatan.
 - 2) Komposisi dari *ABI 5× Seq Buffer* adalah 350 mM Tris-HCl pH 9 dan 2,5 mM MgCl₂.
 - 3) *10× Buffer* untuk *Thermosequenase II Kit* terdiri atas 400 nM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl₂ (2 mL dari 2M Tris-HCl pH 9 + 100 µL dari 1M MgCl₂ + 7,9 mL dari Mili-Q. Sterilisasi dengan autoklaf dan difiltrasi, kemudian simpan dalam -20°C, juga dapat digunakan sama dengan *ABI Seq Buffer*. Setelah itu, masukkan ke dalam mesin sekuensing. Program yang digunakan untuk sekuensing, yaitu
 - a) **Program cycle untuk BDT v3.1** sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 96°C selama 60 detik, kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama lima detik dan pemanjangan pada suhu 60°C selama 90 detik. Setelah 40 siklus berakhir, hasilnya dapat disimpan pada suhu 4°C.
 - b) **Program cycle untuk BDT v1.1** sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 96°C selama 60 detik dan dilanjutkan dengan 25 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama lima detik dan pemanjangan pada suhu 60°C selama lima menit. Setelah 25 siklus berakhir, hasilnya dapat disimpan pada suhu 4°C.
- 6) Purifikasi hasil siklus sekuensing dengan etanol
- a) Siapkan 10 µL DNA produk siklus sekuensing dalam tabung PCR.

- b) Tambahkan 1 μL dari 125 mM EDTA dan 1 μL dari 3M Na-asetat (pH 5,2). Penambahan EDTA dan Na-asetat harus terpisah.
- c) Tambahkan 25 μL etanol absolut (>95%).
- d) Campurkan hingga larut dengan dibolak-balik dan biarkan pada suhu ruang selama 15 menit.
- e) Sentrifugasi pada kecepatan 20.000 $\times g$ selama 15 menit atau 16.100 rcf selama 25 menit pada suhu 4°C.
- f) Buang supernatan dengan cara dituang atau menggunakan pipet secara hati-hati.
- g) Keringkan pada suhu ruang selama 5–10 menit.
- h) Letakkan dalam ruang gelap dan simpan dalam *freezer* -20°C sampai digunakan (dapat disimpan hingga satu bulan).

7) Injeksi sampel di mesin sekuensing

Sebelum dimasukkan ke dalam mesin sekuensing, sampel DNA harus dipreparasi dengan cara:

- a) Tambahkan 10–15 μL *Hi-Di formamide*.
- b) Panaskan pada suhu 95°C dengan mesin PCR.
- c) Secepatnya dinginkan dengan es.
- d) Transfer ke ABI 96 *well plate* (tempat sampel untuk mesin sekuensing) dan tutup dengan *septum*.
- e) Jalankan sampel ke dalam mesin sekuensing dalam waktu 24 jam.

8) Analisis data hasil sekuensing

a) *Trimming, assembling*

- (1) Unduh hasil mesin sekuensing berupa kromatogram dengan perangkat lunak “Bioedit”.

- (2) Analisis puncak-puncak grafik yang tergambar. Jika sebagian besar menunjukkan grafik yang bagus, dapat dilanjutkan ke analisis selanjutnya.
- (3) Edit kode-kode urutan DNA hasil sekuensing terlebih dahulu menggunakan program “Bioedit” karena selalu terdapat sekuen yang tidak bagus, terutama pada bagian awal dan akhir sekuensing. Potong bagian sekuen di ujung-ujung kromatogram, yaitu bagian awal/akhir yang menunjukkan grafik kromatogram yang tidak bagus (grafik kromatogram yang baik memiliki satu puncak yang terpisah untuk setiap satu kode basa N). Jika menggunakan lebih dari satu primer, hasil edit sekuen dari beberapa primer harus digabung (*assembling*) menjadi ”*contig*” menggunakan perangkat lunak “Bioedit”.

b) Pencarian homologi dengan BLAST

Hasil urutan DNA yang telah diedit kemudian disajjarkan/dibandingkan data urutan DNA di *GenBank* yang terbuka untuk umum melalui internet, yaitu pada situs web www.ncbi.nlm.nih.gov. Perbandingan urutan DNA ini dilakukan dengan analisis BLAST untuk mengetahui mikroorganisme yang mempunyai urutan paling mirip dengan sampel sehingga identitas mikroorganisme tersebut dapat diduga (Gambar 4.8 sampai Gambar 4.11).

BAB V

PEMANFAATAN KOLEKSI MIKROORGANISME SECARA BERKELANJUTAN

Mikroorganisme, berbeda dengan tanaman dan hewan, bersifat kosmopolitan, yaitu terdapat atau ada di mana-mana. Pada 1 g tanah dengan kondisi suhu, pH, kelembapan dan jenis ekosistem yang sama, biasanya akan terdapat jenis mikroorganisme yang sama. Namun, jika kondisi lingkungan berbeda, jenis mikroorganisme yang diisolasi akan berbeda juga. Perbedaan ekosistem yang tidak sangat mencolok, tidak akan membuat perbedaan jenis mikroorganisme dapat ditemukan. Konsep konservasi mikroorganisme perlu dibedakan dengan konsep konservasi tanaman dan hewan yang sangat berhubungan dengan habitatnya. Pertumbuhan mikroorganisme sangat bergantung pada suhu, pH, kelembapan, dan jenis ekosistem.

Penemuan mikroorganisme di alam sangat berkaitan erat dengan jenis medium pertumbuhan yang digunakan dalam proses isolasi. Riset telah banyak membuktikan bahwa dengan sumber sampel yang sama, akan diperoleh jenis mikroorganisme yang berlainan. Metode isolasi dengan dikayakannya suatu sampel di medium pengayaan akan mendapatkan jenis mikroorganisme yang berbeda pula (Lisdiyanti dkk., 2000, 2001, 2002). Saat ini, jenis mikroorganisme yang dapat ditumbuhkan pada medium agar baru sekitar 10% saja. Selebihnya, belum dapat ditumbuhkan pada medium agar (*unculturable microbes*).

Selain itu, perlu diketahui bahwa saat ini mikroorganisme dari jenis bakteri yang telah ditemukan baru sekitar 10.000 dari perkiraan total keseluruhannya adalah lima juta jenis. Untuk jenis fungi, saat ini baru dideskripsikan sekitar 100.000 dari 1,5 juta jenis yang diperkirakan ada. Diperkirakan bahwa keanekaragaman hayati mikroorganisme lebih tinggi daripada serangga, burung, protozoa, tanaman, atau hewan (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Perkiraan Jumlah Mikroorganisme

Mikroorganisme juga sangat erat kaitannya dengan kehidupan manusia. Banyak mikroorganisme dimanfaatkan di bidang pertanian, pangan, industri, kesehatan, lingkungan, dan lain-lain (Gambar 5.2). Oleh karena itu, konservasi mikroorganisme Indonesia perlu dihubungkan dengan pemanfaatan mikroorganisme tersebut pada kehidupan manusia. Dengan demikian, konservasi mikroorganisme Indonesia akan berkembang dengan pesat.

Tidak dapat dimungkiri bahwa setelah adanya *Nagoya Protocol, culture collection* di seluruh dunia mendapatkan dampak yang signifikan dalam hal distribusi mikroorganisme yang sesuai dengan protokol ini.

Mikroorganisme sebagai Komponen Penting Biodiversitas

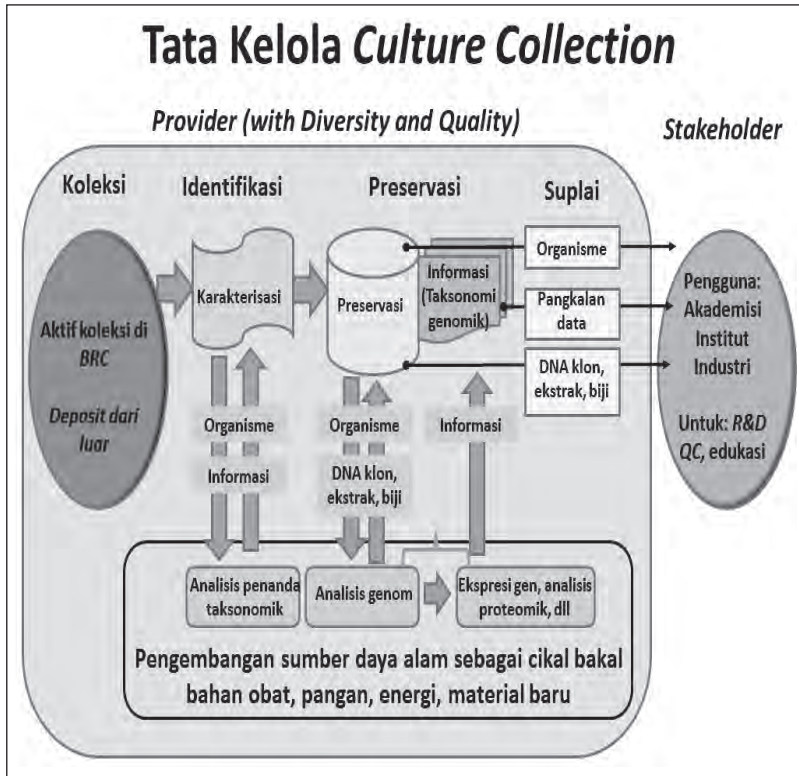
 <p>Asam amino Enzim</p>	 <p>Agronomi Biomassa Bioremediasi</p>	 <p>Biorecovery Bioproses Produksi energi</p>
 <p>Makanan hasil rekayasa genetik & aditif</p>	 <p>Makanan fermentasi Bumbu buatan Pangan fungsional</p>	 <p>Farmasi Penemuan obat</p>

Gambar 5.2 Pemanfaatan Mikroorganisme dalam Kehidupan Manusia

Buku *Panduan Pengelolaan Koleksi Mikroorganisme InaCC* adalah buku dasar yang direkomendasikan untuk mahasiswa atau peneliti yang akan melakukan penyimpanan atau deposit kultur mikroorganisme dengan standar internasional. Dengan buku ini, mahasiswa atau peneliti diharapkan mengetahui alur dan tata cara penyimpanan mikroorganisme dan pengetahuan yang berhubungan. Sangat diharapkan adanya saran atau komentar untuk penyempurnaan buku ini pada masa yang akan datang.

Keberadaan suatu koleksi biakan mikroorganisme yang tepercaya sangat penting bagi bangsa ini agar dapat memfasilitasi kerja sama global berdasarkan asas kesetaraan (*Article 15 CBD, Bonn Guideline, TRIPP, MOSSAIC, Budapest Treaty, dan Nagoya Protocol*). Koleksi biakan mikroorganisme bertaraf internasional merupakan bagian yang tidak terpisahkan dan agenda riset nasional. Koleksi biakan mikroorganisme juga dapat dikembangkan sebagai bahan atau sumber untuk berbagai kepentingan pembangunan berkesinambungan, baik di sektor pertanian, kesehatan, industri maupun lingkungan.

Dalam pengelolaannya, koleksi biakan mikroorganisme tidak hanya menjadi kolektor pasif atau museum, tetapi harus mampu menyimpan dan menggali nilai tambah material genetik yang dimiliki mikroorganisme sehingga dapat menjadi pangkalan data yang kemudian dapat dimanfaatkan/diakses semua pihak. Ditunjukkan pada Gambar 5.3, koleksi biakan mikroorganisme harus menjadi *provider*/penyedia dengan kegiatan di dalamnya meliputi Koleksi, Identifikasi, Preservasi, dan Suplai mikroorganisme yang terjamin absah dan dapat diakses *stakeholder* atau pihak ketiga untuk penelitian/kegiatan/program selanjutnya, seperti pemantauan mikroorganisme penyebab hama dan penyakit sebagai antisipasi pasar bebas agro-industri; penapisan mikroorganisme untuk produksi antibiotik,



Gambar 5.3 Tata Kelola Koleksi Kultur Mikroorganisme/*Culture Collection*

senyawa bioaktif, enzim, protein; dan pengendalian pencemaran lingkungan. Secara kelembagaan, koleksi biakan mikroorganisme harus dipegang sepenuhnya oleh lembaga pemerintah/negara yang mempunyai wewenang dan kendali sebagai otoritas ilmiah untuk bidang keanekaragaman hayati di Indonesia karena koleksi ini merupakan aset bangsa. Pusat Koleksi Sumber Daya Mikroorganisme yang akan menjadi referensi nasional ini harus dimiliki oleh Indonesia.

Berbeda dengan sumber daya alam tumbuhan dan hewan yang dapat dikonservasi secara *in situ*, pemanfaatan biakan mikroorganisme untuk keperluan penelitian ataupun pemanfaatannya memerlukan

biakan hidup. Koleksi biakan mikroorganisme mensyaratkan bahwa mikroorganisme harus dalam keadaan hidup, murni, dan tersedia untuk penelitian berikutnya, baik penelitian lanjutan maupun penelitian baru. Validitas dan viabilitas dari koleksi mikroorganisme yang tersimpan pada *culture collection* harus diikuti dengan adanya informasi akurat yang tersimpan dalam bentuk katalog, pangkalan data, ataupun informasi lain.



DAFTAR PUSTAKA

- Atschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Bappenas. (2003). Strategi dan rencana aksi keanekaragaman hayati Indonesia 2003–2020. Dalam Dokumen Indonesian Biodiversity Strategy and Action Plan (IBSAP) 2003–2020. Bappenas, Jakarta.
- Day, J. G., Watanabe, M. M., Morris, G. J., Fleck, R. A., & McLellan, M. R. (1997). Long-term viability of preserved eukaryotic algae. *J. Appl. Phycol.* 9, 121–127.
- Davis, L. G., Kuehl, W. M., & Battey, J. F. (1994). *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange.
- Emmert, E. A. (2013). Biosafety guidelines for handling microorganisms in the teaching laboratory: Development and rationale. *J. Microb. Biol. Educ.* 14(1), 78–83.
- Erlich, H. A. (1989). *PCR technology: Principle and applications for DNA amplification*. London: Stockton Press.
- Flink, J. M., & Knudsen, H. (1983). *An introduction to freeze drying*. Denmark: Strandberg Bogtryk Offset.
- Giri, D. (2016). Gram staining: Principle, procedure, interpretation, and animation. Diakses pada 28 Juli 2017 dari <http://laboratoryinfo.com/gram-staining-principle-procedure-interpretation-and-animation/>.
- Grima, E. M., Perez, J. A. S., Camacho, F. G., Fernandez, F. G. A., Alonso, D. L., & del Castillo, C. I. S. (1994). Preservation of the marine microalgae, *Isochrysis galbana*: Influence on the fatty acid profile. *Aquaculture* 123, 377–385.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser* 41, 95–98.
- Hamada, M., Shibata, C., Nurkanto, A., Ratnakomala, S., Lisdiyanti, P., Tamura, T., & Suzuki, K. I. (2015). *Tropicihabitans flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Cellulomonadaceae. *Anton van Lee* 107, 1299–1306.
- Hamada, M., Shibata, C., Nurkanto, A., Ratnakomala, S., Lisdiyanti, P., Tamura, T., & Suzuki, K. I. (2015). *Serinibacter tropicus* sp. nov., an actinobacterium isolated from the rhizosphere of a mangrove, and emended description of the genus *Serinibacter*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 65, 1151–1154.
- Hamada, M., Shibata, C., Tamura, T., Nurkanto, A., Ratnakomala, S., Lisdiyanti, P., Suzuki, K. I. (2016). *Cellulosimicrobium marinum* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment. *Arch. Microbiol.* 198, 439–444.
- Hidayat, I., Meeboon, J., & To-Anun, C. (2007). *Anthostomella* and *Fasciatispora* species (Xylariaceae) from palms including *F. ujungkulonensis* sp. nov. *Mycotaxon.* 102, 347–354.
- Hiraishi, A., Kamagata, Y., & Nakamura, N. (1995). Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 523–529.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205–229.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kobayashi, R., Kanti, A., & Kawasaki, H. (2016). *Pichia chibodasensis* sp. nov., a novel *Pichia* species isolated in Indonesia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1024–1027.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Env. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lo-*

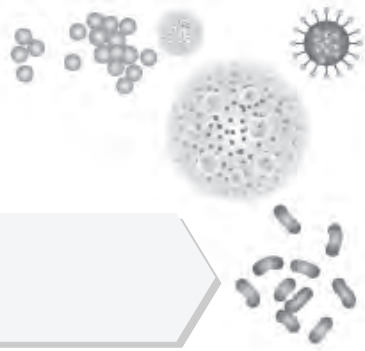
- vaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46, 147–165.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47, 119–131.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 813–818.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R. R., Uchimura, T., & Komagata, K. (2006). Re-classification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2101–2111.
- Lisdiyanti, P., Otoguro, M., Ratnakomala, S., Lestari, Y., Hastuti, R. D., Triana, E., Katsuhiko, A., & Widyastuti, Y. (2010). *Actinokineospora baliensis* sp. nov., *Actinokineospora cibodasensis* sp. nov. and *Actinokineospora cianjurensis* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2331–2335.
- Malik, K. A. (1991). Maintenance of microorganisms by simple methods. Dalam B. E. Kirshop & A. Doyle (eds.), *Maintenance of microorganisms and cultured cells: A Manual of laboratory methods*. 2nd ed. London: Academic Press.
- Meeboon, J., Hidayat, I., Nakashima, C., & To-anum, C. (2007). *Cercospora habenariicola* sp. nov. and some new records of cercosporoid fungi from Thailand. *Mycotaxon* 99, 117–121.
- Meeboon, J., Hidayat, I., To-anun, C., & Nakashima, C. (2008). Cercosporoid fungi from Thailand II. New species of *Cercospora* and *Passalora*. *Sydowia* 60, 253–260.
- Meeboon, J., Hidayat, I., Takamatsu, S. (2012). *Erysiphe javanica* sp. nov., a new tropical powdery mildew from Indonesia. *Mycotaxon* 120, 189–194.
- Meeboon, J., Hidayat, I., Takamatsu, S. (2013a). *Pseudoidium javanicum*, a new species of powdery mildew on *Acalypha* spp. from Indonesia. *Mycoscience* 54 : 183–187.
- Meeboon, J., Hidayat, I., Takamatsu, S. (2013b). *Setoidium castanopsisidis*, a new species of anamorphic Cystotheca (Ascomycota, Erysiphales) from Indonesia. *Mycoscience* 54, 274–278.

- Mikata, K. (1999). Preservation of yeast culture by L-drying: Viability after 15 years storage at 5° C. *IFO Research Communications* 19, 71–82.
- Mitic, S., Otekhačmer, I., & Damjanovic, V. (1974). Predicting the stabilities of freeze-dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test. *Cryobiology* 11, 116–120.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., & Nakahara, T. (2006). Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology* 52, 27–32.
- Moore, D., & Frazer, L. N. (2002). *Essential fungal genetics*. New York: Springer-Verlag.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying: A review. *J. Microbiol. Meth.* 66, 183–193.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schaffer, A. A. (2008). Database indexing for producing MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24, 1757–1764.
- Mori, K., Nurcahyanto, D. A., Kawasaki, H., Lisdiyanti, P., Suzuki, K. I. (2016a). *Haloarchaeobius baliensis* sp. nov., Isolated from a solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 38–43.
- Mori, K., Nurcahyanto, D. A., Kawasaki, H., Lisdiyanti, P., Suzuki, K. I. (2016b). *Halobium palmae* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 3799–3804.
- Myers, E. W., & Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11–17.
- Nagai, T., Tomoika, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., & Sato, T. (2005). Evaluation of preservation techniques of microorganisms resources in the MAAF Genebank. *JARQ* 39, 19–27.
- Nakagiri, A. (2005). Preservation of fungi and freezing methods. Dalam *Workshop on preservation of microorganisms*. Biotechnology Center-NITE & Research and Development Center for Biotechnology LIPI. Cibinong: 17–18 Oktober 2005.
- National Institute of Technology and Evaluation [NITE]. (2008). Methods for recovering the frozen and thawed fungal culture (Cryotube)/ Opening of ampules and revival of L-dried specimens. Diakses pada 28 Juli 2017 dari www.nite.go.jp/data/000003154.pdf.

- Nurkanto, A., Lisdiyanti, P., Hamada, M., Ratnakomala, S., Shibata, C., & Tamura, T. (2015a). *Actinoplanes tropicalis* sp. nov. and *Actinoplanes cibodasensis* sp. nov., Isolated from leaf litter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3824–3829.
- Nurkanto, A., Lisdiyanti, P., Hamada, M., Ratnakomala, S., Shibata, C., & Tamura, T. (2015b). *Cryptosporangium cibodasense* sp. nov., isolated from leaf litter in Indonesia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4632–4637.
- Nurkanto, A., Lisdiyanti, P., Hamada, M., Ratnakomala, S., Shibata, C., & Tamura, T. (2016). *Actinoplanes bogoriensis* sp. nov., a novel Actinomyceete isolated from leaf litter. *J. Antibiotics* 69, 26–30.
- O'Donnell, K. (1993). Fusarium and its near relatives. Dalam D. R. Reynolds & J.W. Taylor (eds), *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic, and pleomorphic specification in fungal systematics*. Wallingford: CAB International.
- OECD. (2007). OECD best practice guidelines for biological resource centres. Diakses pada 28 Juli 2017 dari <https://www.oecd.org/sti/biotech/38777417.pdf>.
- Otero, M. C., Espeche, M. C., & Nader-Macias, M. E. (2007). Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry* 42, 1406–1411.
- Otoguro, M., Ratnakomala, S., Lestari, Y., Hastuti, R. D., Triana, E., Widyastuti, Y., & Ando, K. (2009). *Streptomyces baliensis* sp. nov., isolated from Balinese soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2158–2161.
- Otoguro, M., Yamamura, H., Tamura, T., Irzaldi, R., Ratnakomala, S., Ridwan, R., ... & Ando, K. (2011). *Actinophytocola timorensis* sp. nov. and *Actinophytocola corallina* sp. nov., isolated from soil. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 834–838.
- Pitcher, D. G., Saunders, A., & Owe, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Let. Appl. Microbiol.* 8, 151–156.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2012). Practice and prospect of microbial preservation. *FEMS Microbiol. Lett* 339, 1–9.
- Ryan, M. J., Jeffries, P., Bridge, P. D., & Smith, D. (2001). Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. *Cryo-Letters* 22, 115–124.

- Sakane, T., & Kuroshima, K. (1997). Viabilities of dried cultures of various bacteria after preservation for over 20 years and their prediction by the accelerated storage test. *Microbiol. Cult. Coll.* 1–7.
- Sato, H. (2007). Workshop on molecular approaches for the identification of microorganisms. NITE & Research Center for Biotechnology LIPI, Cibinong: 11–13 July 2007.
- Siahaan, S. A., Hidayat, I., Kramadibrata, K., Meeboon, J., & Takamatsu, S. (2015). *Phyllactinia poinsettiae* sp. nov.: A new species of powdery mildew on poinsettia from Indonesia. *Mycoscience* 56, 580–583.
- Siahaan, S. A., Kramadibrata, K., Hidayat, I., Meeboon, J., Takamatsu, S. (2016). *Erysiphe baliensis* and *E. sidae*, two new species of anamorphic *Erysiphe* (powdery mildew) from Indonesia. *Mycoscience* 57, 35–41.
- Sjamsuridzal, W., Oetari, A., Nakashima, C., Kanti, A., Saraswati, R., Widyastuti, Y., & Ando, K. (2013). New species of the genus *Metschnikowia* isolated from flowers in Indonesia, *Metschnikowia cibodasensis* sp. nov. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 905–912.
- Sjamsuridzal W., Lisdiyanti, P., Kusmiyati, Rachmatmulya, A., Pratiwi, E., ..., Sujaya, I. N. (2008). *FORKOMIKRO catalogue of cultures of Indonesian microorganisms*. 1st Ed. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Smith, D. (1991). Maintenance of filamentous fungi. Dalam B. E. Kirshop & A. Doyle (eds.), *Maintenance of microorganisms and cultured cells: A manual of laboratory methods*. 2nd ed. London: Academic Press.
- Smith, D. (1993). Tolerance to freezing and thawing. D. H. Jennings (ed.), *Stress tolerance in fungi* (145–171). New York: Marcel Dekker.
- Smith, D. (2003). Culture collections over the world. *Int. Microbiol.* 6, 95–100.
- Smith, D., & Ryan, M. (2012). Review article: Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *The Scientific World Journal.* 9. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/805659>.
- Sukara, E. & Lisdiyanti, P. (ed.). (2016). *Exploring Indonesian microbial genetic resources for industrial application*. Jakarta: LIPI Press.
- Sukarno, N., Kurihara, Y., Park, J. Y., Inaba, S., Ando, K., Harayama, S., ... & Yuniarti, E. (2009). *Lecanicillium* and *Verticillium* species from Indonesia and Japan including three new species. *Mycoscience* 50, 369–379.

- Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Ac. Res.* 25, 4876–4882.
- Tommerup, I. C., & Kirby, D. K. (1979). Preservation of spores vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 831–835.
- Tsuru, S. (1973). Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. *Cryobiology* 10, 445–452.
- Yamamura, H., Lisdiyanti, P., Ridwan, R., Ratnakomala, S., Sarawati, R., Lestari, Y., ... & Ando, K. (2010). *Dietzia timorensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 451–454.
- Viljoen, G. J., Nei, L. H., & Crowther, J. R. (2005). *Molecular diagnostic PCR handbook*. Springer: The Netherlands.
- Watanabe, M. M., Kawachi, M., Hiroki, M., & Kasai, F. (2000). *NIES Collection list of strains*. 6th Ed. Japan: NIES.
- Wessman, P., Hakansson, S., Leifer, K., & Rubino, S. (2013). Formulations for freeze-drying of bacteria and their influence on cell survival. *Journal of Visualized Experiments* 78, 1–5.
- WFCC Executive Board. (2010). World federation for culture collections (WFCC) guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, 3rd ed. 19 pp. Diakses pada 7 Maret 2018 dari http://www.wfcc.info/pdf/Guidelines_e.pdf.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. Dalam M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (eds), *PCR protocols*. San Diego: Academic.
- WIPO. (2018). Guide to the deposit of microorganisms under the Budapest Treaty. Diakses pada 7 Maret 2018 dari <http://www.wipo.int/treaties/en/registration/budapest/guide/>.
- Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry* 39, 1081–1086.



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

Formulir 1. Deposition Data Sheet (1/3)

DEPOSITION DATA SHEET For a Microorganism in The Open Collection	
*Column to be filled by InaCC	
Date Culture Received :	<input type="text"/>
Date Culture Revived :	<input type="text"/>
Date Accepted :	<input type="text"/>
Type of microbe :	<input type="text"/>
Curator :	<input type="text"/>
InaCC No. :	<input type="text"/>
<p>We ask the depositor to supply strain data on the following form. Data supplied on this form will be recorded in the InaCC database and be cited in part in the InaCC Online Catalog of Strains. The depositor's signature and the date are mandatory.</p>	
DEPOSITOR	
Name (title) :	<input type="text"/>
Organization :	<input type="text"/>
Address :	<input type="text"/>
Phone/Fax/Email :	<input type="text"/>
I. STRAIN DESIGNATION/SCIENTIFIC NAME	
1. Microbe:	
<input type="checkbox"/> fungus <input type="checkbox"/> yeast <input type="checkbox"/> bacterium <input type="checkbox"/> actinomycete <input type="checkbox"/> archaeon	
<input type="checkbox"/> microalgae <input type="checkbox"/> bacteriophage	
2. Scientific name, author(s) and year of publication:	

3. Principal synonyms / name change, author(s) and year of publication:	

4. Scientific name(s) of other morph(s) (i.e., teleomorph / anamorph / synanamorph):	

5. Type (or ex type) strain:	
<input type="checkbox"/> Yes (<input type="checkbox"/> holotype , <input type="checkbox"/> neotype , <input type="checkbox"/> isotype , <input type="checkbox"/> paratype , <input type="checkbox"/> lectotype)	
<input type="checkbox"/> No	
6. Herbarium specimen's number and location:	

Formulir 1. Deposition Data Sheet (2/3)

II. ORIGIN OF STRAIN

1. Source of sample (Substrate /Host of Organisms):

2. Sample Collector:

3. Collection date (dd/mm/yyyy):

4. Isolated by (name and institution) and date (dd/mm/yyyy):

5. Identified by (name and institution):

6. Strain number in your laboratory (Isolate number):

7. Is this strain known to be or likely to be pathogenic?
 Yes (human, animal, Plant) No Unknown
If yes, please specify the host organism(s) (Reference):
-

8. Biosafety Level (Risk Group): 1 2
9. Other strain and/or collection numbers:

10. History since isolation
(If you did not isolate this strain, please indicate from whom you received it):
InaCC ← Depositor (Strain No.) ← _____

III. GEOGRAPHICAL AREA OF SAMPLING/COUNTRY OF ORIGIN:

If the country of origin of this microorganism is not Indonesia, please give detail information about the material transfer agreement about it with the country and the date it was moved from the country to Indonesia. (*No organism can be accepted without the information of the country of origin).

1. Country* :

2. Locality (address) :

3. GPS Data (Latitude, Longitude, Altitude):

Formulir 1. Deposition Data Sheet (3/3)

IV. ADDITIONAL DATA

(Please supply strain specific data or attach reprints describing strain properties):

1. Please provide the rRNA gene sequence of microorganisms to deposit (include accession number when known).
2. Specific uses of the strain: e.g. testing of antimicrobial agents, biological assays, quality control, teaching, etc.
3. Properties of the strain: morphological, biochemical, genetic, serological, chemotaxonomic characteristics, etc. e.g. genotype, mol %, G + C, cell wall structure, plasmid pattern etc.
4. References

V. RECOMMENDED MEDIUM AND GROWTH CONDITION

1. Medium (please attach detailed formula):

2. Cultivation condition:

pH: _____

Temperature (°C): _____

Incubation time (specify: h or d): _____

Growth: aerobic anaerobic (method): _____

Special requirements (light, gas phases, etc.):

VI. RECOMMENDED METHOD (S) FOR LONG-TERM PRESERVATION:

- Freezing Freeze-drying L-drying Serial transfer Other (special attention)

VII. WHEN DO YOU WISH THE STRAIN TO BE RELEASED TO THE PUBLIC?

- Immediately after completion of the process for accessioning and distribution of the strain at InaCC.
- After a paper describing the strain is published (including a paper in press appearing online).

I, _____, hereby certify that all the answers and information provided above have been written by myself or under my direction, and are true to my own knowledge. In addition, I confirm that I have read the attached AGREEMENT FOR DEPOSITORY OF BIOLOGICAL RESOURCES carefully. I understand that the deposited strain will be listed online and made available for distribution by InaCC (for a reasonable fee to cover actual expenses).

Signatures,

Manager InaCC
Date:

Curator
Date:

Depositor
Date:

LAMPIRAN 2

Formulir 2. MTA for Deposition (1/3)

MATERIAL TRANSFER AGREEMENT **(For DEPOSITION With InaCC)**

DEPOSITOR,

Name of Depositor : _____

Depositor Organization : _____

(hereinafter referred to as the 'DEPOSITOR') and Indonesian Culture Collection (hereinafter referred to as 'InaCC') agree as follows with regard to the deposit of the material(s) by the DEPOSITOR with the InaCC.

1. The InaCC, a culture collection under The Indonesian Institute of Sciences, is engaged in collection, maintenance, storage, propagation, quality control and distribution of the biological resources, in order to contribute to the Indonesian and international scientific community in the field of the life sciences.

The DEPOSITOR is intend to deposit the following biological material, which was obtained by the DEPOSITOR in compliance with the relevant laws and regulations (name and/or strain number of the material):

(hereinafter referred to as the 'BIOLOGICAL RESOURCE') with InaCC.

This Material Transfer Agreement (hereinafter referred to as the 'MTA') sets forth the terms and conditions agreed by the DEPOSITOR and the InaCC on the deposit of the BIOLOGICAL RESOURCE.

2. The DEPOSITOR agrees to deposit free of charge the BIOLOGICAL RESOURCE with the InaCC. The InaCC may maintain, store, multiply, and conduct quality control and improvement of the BIOLOGICAL RESOURCE and may distribute it to public under the terms and conditions described in this MTA.
3. In compliance with the relevant laws and regulations of the country of origin of the BIOLOGICAL RESOURCE, the country of DEPOSITOR as well as those of Indonesia, the DEPOSITOR shall, upon the deposit hereunder, notify and provide with the InaCC the accurate information (including patent information, if any) about the origin, process of access, quality and characteristics of the BIOLOGICAL RESOURCE.
4. The InaCC may update the information accompanying with the BIOLOGICAL RESOURCE and respond to the change of legal environment for handling and transfer of BIOLOGICAL RESOURCE when necessary and may make it available to the public through the InaCC Catalog, website and other media.

Formulir 2. MTA for Deposition (2/3)

5. The origin of the BIOLOGICAL RESOURCE is as follows:
(Check an appropriate box)

- The DEPOSITOR isolated the BIOLOGICAL RESOURCE.
- The DEPOSITOR obtained the BIOLOGICAL RESOURCE developed by others with consent to deposit it with the InaCC.
- The DEPOSITOR purchased the BIOLOGICAL RESOURCE with no restriction for transfer and deposit.
- Others. (Please describe) : _____

6. The InaCC may distribute the BIOLOGICAL RESOURCE to RECIPIENTS pursuant to the following terms and conditions set forth by the DEPOSITOR:
(Check an appropriate box(es) of required terms and conditions)

- No specific terms and conditions.
- Use of BIOLOGICAL RESOURCE is research purpose only.
In case for commercialization purpose, RECIPIENT of the BIOLOGICAL RESOURCE shall obtain Prior Informed Consent (PIC) from DEPOSITOR and InaCC.
- In publishing the results obtained by use of the BIOLOGICAL RESOURCE, the following(s) are requested:
 - Acknowledgment to the country of origin
 - Citation of the following reference(s):
(Please describe in detail)_____

7. The InaCC shall not be held liable to the DEPOSITOR for any damage or loss to the BIOLOGICAL RESOURCE due to any events caused during maintenance or storage of the BIOLOGICAL RESOURCE.

8. Both parties shall discuss to enable amicable resolution of accidents during shipment of the BIOLOGICAL RESOURCE.

9. The BIOLOGICAL RESOURCE shall be shipped, deposited and otherwise treated in accordance with all *applicable* laws, regulations and guidelines. The DEPOSITOR and the InaCC shall, if necessary, take all steps and procedures to comply with legal requirements for handling of the BIOLOGICAL RESOURCE.

10. Both parties shall discuss in good faith to enable the amicable resolution of matters, arising in connection with the interpretation and performance hereof, as well as the matters which are not expressly set forth in this AGREEMENT.

Formulir 2. MTA for Deposition (3/3)

The DEPOSITOR and the InaCC do hereby sign two original copies of this MTA and each party holds one signed copy.

DEPOSITOR

Organization : _____

Address : _____

Name of Authorized
representative : _____

Job Title : _____

Signature : _____ Date : _____

Name of Scientist : _____

Job Title : _____

Signature : _____ Date : _____

RECIPIENT

**InaCC (Indonesian Culture Collection)
Indonesian Institute of Sciences**

Jl. Raya Jakarta – Bogor Km. 46, Cibinong 16911, Indonesia

Director,

Signature : _____

Date : _____

LAMPIRAN 3

Formulir 4. Preservation Sheet

<u>RECORD OF PRESERVED MATERIAL</u>									
					InaCC No :				
					Lot No :				
1. Receipt									
Species / Strain No ¹									
Received date									
Curator									
2. Registration									
InaCC No.									
Registered date ¹									
3. Cultivation									
Cultivated by									
Purpose ²									
Seed lot no. ³									
Cultivation medium									
Cultivation temp.									
Cultivation term.									
4. Preparation of preserved materials									
Method ²		<input type="radio"/> Continous Cultures <input type="radio"/> L-drying <input type="radio"/> -80° C freezing <input type="radio"/> LN ₂							
Prepared by									
Amount . Date									
Sealed by ⁴									
Amount. Date ⁴									
5. Quality control									
	Results	Pass/Fail	Date	Inspector					
Vacuum ⁴									
Contamination									
Accelerated storage test ⁴									
Identification									
Viability ⁵									
6. Action for materials failed in quality control									
7. Confirmation by Curator									
Note & Signature									
8. Storage									
Stored by									
Amount . Date									
Notes									
1	for new deposit	2	describe *	3	for restock	4	for L-dried material	5	for frozen material

LAMPIRAN 4

Formulir 5. Request for Certificate

<u>REQUEST FOR CERTIFICATE</u>	
To:	Director of Research Centre for Biology, Indonesian Institute of Sciences
Date	: _____
Signature	: _____
Name	: _____
Institution	: _____
Address	: _____ _____
Phone	: _____
Fax	: _____
Email	: _____
Please supply certification for the following condition.	
Reason to need certificate	: _____ _____ _____
Please specify the certification you need : _____ _____ _____ _____ _____	

LAMPIRAN 5

Formulir 6. Order Form

ORDER for InaCC CULTURES

To :
 Manager InaCC
 Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI)

1. I hereby acknowledge that I have read, understood and agree with all items of the latest version of Agreement of Material Transfer of InaCC

SIGNATURE: _____ DATE: _____
 (YOUR SIGNATURE IS REQUIRED FOR ACCEPTANCE OF YOUR ORDER)

2. Intended use: _____

Your purchase order number, if any _____

APPLICANT		Billing address (if different from the one at left)	
Name :	_____	Name :	_____
Organization :	_____	Organization :	_____
Address :	_____	Address :	_____
Tel :	_____	Tel :	_____
Fax :	_____	Fax :	_____
E-mail :	_____	E-mail :	_____

Payment Method : Credit Card Cash Bank Transfer

	InaCC No.	Scientific name	Amount
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			

Total amount of cultures :

Please contact our administration office: Nur Halimah (62-81317555372), e-mail : inacc@mail.lipi.go.id

*Please type directly into the form.
 The shipping address if different from the one given above:
 NAME : _____
 ORGANIZATION : _____
 ADDRESS : _____

For official use only:

Manager	Curator	date, Administration
(.....)	(.....)	(.....)

LAMPIRAN 6

Formulir 7. MTA for Distribution (1/3)

MATERIAL TRANSFER AGREEMENT
(For Distribution to a Non Profit Organization)

RECIPIENT

Name of Recipient : _____
Recipient Organization : _____
Address : _____

This Material Transfer Agreement sets forth the terms and conditions under which Indonesian Culture Collection (hereinafter referred to as 'InaCC') will provide with the RECIPIENT, and the RECIPIENT will receive, the specified as BIOLOGICAL RESOURCE

and its derivatives (hereinafter referred to as the 'BIOLOGICAL RESOURCE') in response to the RECIPIENT's request, and with which the RECIPIENT scientist and organization agree before the RECIPIENT receives the BIOLOGICAL RESOURCE:

1. The InaCC, a culture collection under The Indonesian Institute of Sciences, is engaged in collection, maintenance, storage, propagation, quality control and distribution the biological resources, in order to contribute to the Indonesian and international scientific community in the field of life sciences.
2. The RECIPIENT shall obtain a written prior permission from the InaCC for the usage of the BIOLOGICAL RESOURCE for any other purposes than the purpose specified above.
3. The RECIPIENT guarantees that he/she will use the BIOLOGICAL RESOURCE transferred from InaCC and derivative (s), if any, of the transferred BIOLOGICAL RESOURCE obtained by cultivation, amplification or other methods by skilled person in an appropriate facility and under proper condition for safety.
4. The RECIPIENT shall bear the cost of shipping, handling, part of production and other expenses necessary for preparation or distribution of the BIOLOGICAL RESOURCE for the RECIPIENT.
5. The RECIPIENT agrees, without objection that he/she shall not allows any third party to use the BIOLOGICAL RESOURCE he/she has received from InaCC or any reproduction thereof, nor transfer or distribute any of the BIOLOGICAL RESOURCE to any third party.
6. Nothing in this AGREEMENT shall be interpreted that the InaCC grants the RECIPIENT any rights under any patents or other intellectual property, or licenses thereunder with respect to the BIOLOGICAL RESOURCE.

Formulir 7. MTA for Distribution (2/3)

7. The RECIPIENT acknowledges, without objection, that the transfer of the BIOLOGICAL RESOURCES does not constitute transfer to the RECIPIENT of the intellectual property rights or any other rights of InaCC or a third party of the BIOLOGICAL RESOURCES, and the RECIPIENT's right to use BIOLOGICAL RESOURCE the is limited to the extent permitted herein.
8. The RECIPIENT recognized, among other things, (i) that the BIOLOGICAL RESOURCE are potentially hazardous, and (ii) that any cultivation, amplification, use, transfer, storage, or similar acts of the BIOLOGICAL RESOURCE might infringe the intellectual property rights or other rights of a third party. The RECIPIENT shall, at his/her expense and responsibility, take any action necessary to avoid any hazard, infringement or other problem concerning the BIOLOGICAL RESOURCE.
9. The RECIPIENT agrees that any handling or other activities of the BIOLOGICAL RESOURCE in its laboratory shall be conducted in compliance with *all applicable* laws, regulations and guidelines. The RECIPIENT shall, if necessary, take all steps or produres to comply with legal requirements for handling of the BIOLOGICAL RESOURCE.
10. The RECIPIENT agrees to indicate the InaCC ID of the BIOLOGICAL RESOURCE in any presentation at a public conference, in any scientific paper or a similar publication.
11. Both parties shall discuss to enable amicable resolution of any accidents during shipment of the BIOLOGICAL RESOURCE.
12. Both parties shall discuss in good faith to enable the amicable resolution of matters, arising in connection with the interpretation or performance hereof as well as the matters which are not expressly set forth in this AGREEMENT.
13. Any matter or dispute which cannot be settled through said amicable discussion shall be subject to the exclusive jurisdiction of Bogor District Court, Jl. Pengadilan No. 10, Bogor, Indonesia. This AGREEMENT shall be governed in accordance with the laws of Indonesia.

Formulir 7. MTA for Distribution (3/3)

The RECIPIENT and the InaCC do hereby sign two original copies of this AGREEMENT and each party holds one signed copy.

**InaCC (Indonesian Culture Collection)
Indonesian Institute of Sciences**

Jl. Raya Jakarta – Bogor Km. 46, Cibinong 16911, Indonesia

Director,

Signature : _____

Date : _____

RECIPIENT

Organization : _____

Address : _____

Name of Authorized
representative : _____

Job Title : _____

Signature : _____

Date : _____

LAMPIRAN 7

Formulir 8. Serah Terima Barang/Jasa

BUKTI PENERIMAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama pelanggan :

Alamat :

Telah menerima

Mikroba

Laporan Jasa

Administrasi

.....
Pelanggan

(.....)

(.....)

LAMPIRAN 8

Formulir 9. Pengaduan Pembelian Mikroorganisme Mikroorganisme Pelanggan

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama pelanggan :

Alamat :

Jenis mikroba : Bakteri Kapang Khamir Aktinomisetes
 Mikroalga Arkea

Tanggal pembelian :

Nomor tanda terima:/...../.....

Mengadukan permasalahan sebagai berikut :

Telah menumbuhkan mikroba (produk) dengan nomor koleksi InaCC :

Jenis medium penumbuh yang digunakan :

pH medium :

Temperatur dan lama inkubasi :

Persyaratan gas (bila ada) yang dibutuhkan : Aerob Anaerobic

Permasalahan :

.....,

Manajer Teknis,	Administrasi	Pelanggan
(.....)	(.....)	(.....)

LAMPIRAN 9

Formulir 10. Penerimaan Jasa

1. No. sampel	:	_____
2. Nama konsumen	:	_____
3. Institusi	:	_____
4. Telp/Fax	:	_____
5. Tanggal penerimaan jasa	:	_____
6. Jenis sampel	:	_____
7. Jumlah	:	_____

I. JENIS JASA

1.1. Identifikasi mikroba

Morfologi hingga marga	Molekuler			
<input type="checkbox"/> Kapang	<input type="checkbox"/> Bakteri	<input type="checkbox"/> Arkea	<input type="checkbox"/> MALDI	
<input type="checkbox"/> Mikroalga	<input type="checkbox"/> Aktinomisetes	<input type="checkbox"/> Bakteriofage		
+ Photo mikroskopik	<input type="checkbox"/> Kapang			
	<input type="checkbox"/> Khamir			

1.2. Analisa kandungan mikroba

<input type="checkbox"/> Bakteri	<input type="checkbox"/> Kapang	<input type="checkbox"/> Khamir	<input type="checkbox"/> Aktinomisetes
<input type="checkbox"/> Arkea	<input type="checkbox"/> Bakteriofage	<input type="checkbox"/> Mikroalga	<input type="checkbox"/> Medium spesifik mikroba

1.3. Jasa penyimpanan mikroba

<input type="checkbox"/> Freezing	<input type="checkbox"/> L-drying, Lama penyimpanan	<input type="checkbox"/> Tahun
-----------------------------------	---	--------------------------------

1.4. Jasa konsultasi

1.5. Jasa pelatihan

II. Waktu pelaksanaan jasa: _____ s/d _____

III. Pelaksana: _____

Cibinong,.....

Penerima Sampel, Administrasi	Mengetahui, Manajer Teknis,	Pemohon
(.....)	(.....) NIP.	(.....)

LAMPIRAN 10

Formulir 11. Penerimaan dan Penyimpanan Contoh Uji

Nomor Administrasi : / / / /

Tanggal Diterima :

Jenis Contoh : Powder/ Cair/ Padat/

Kemasan & Berat Contoh :

No.	Kode Contoh	Jumlah	Jenis Analisa	Keterangan

Waktu Pengerjaan : agar diselesaikan pada tanggal

Mengetahui,
Bagian Administrasi

(.....)

Tanggal,.....

Penerima,
Kurator

(.....)

LAMPIRAN 11

Formulir 12. Laporan Analisis

HASIL ANALISIS	
Nama sample :	
Hasil analisa :	
1. HPLC :	
.....	
.....	
.....	
.....	
2. GC/ GCMS :	
.....	
.....	
.....	
.....	
3. MALDI-TOF :	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
Manajer Teknis,	Cibinong,..... 20.....
(.....)	Pelaksana
NIP.	(.....)

LAMPIRAN 12

Formulir 13. Hasil Identifikasi Mikroorganisme Mikroorganisme (1/2)

MORFOLOGI

Gambaran koloni

Medium :

Suhu inkubasi :^o C Lama inkubasi : jam Kondisi : (aerob/anaerob⁺)

Bentuk koloni :

Bulat/irregular :, permukaan :, Warna :,

Ukuran :

Gambaran Sel (mikroskopik)

Gram :

Bentuk : bulat : batang (spora/kapsul) :

Spiral : cocoid : lainnya :

Identifikasi Biokimia

No	Nama Uji	Hasil	No	Nama Uji	Hasil
1			8		
2			9		
3			10		
4			11		
5			12		
6			13		
7			14		

Pengujian Lain

.....
.....
.....
.....
.....

Formulir 13. Hasil Identifikasi Mikroorganisme (2/2)

HASIL IDENTIFIKASI

Kode	Nama Mikroba	
	Genus	Spesies

KESIMPULAN

.....
.....
.....

Cibinong,, 20.....

Manajer Teknis,

Pelaksana

Ir. Ahmad Jauhar Arief, M.Sc
NIP. 196105291987011001

.....
NIP.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Lembar asli dikirim ke bagian Administrasi- Lembar copy disimpan di Manajer Mutu |
|---|

LAMPIRAN 13

Formulir 14. Jawaban Hasil Identifikasi Kapang (1/2)

IDENTITAS SAMPEL				
Kode	Nama Mikroba			Jumlah
	Genus	Spesies	Sub spesies	

Gambaran Makroskopik

Medium :	Suhu inkubasi : ° C	Umur koloni : hari
Diameter koloni (mm)	:	
Warna : - muka koloni	:	
- sebalik koloni	:	
Bentuk koloni:	:	cembung/datar/cekung/bergelombang dan kasar atau licin
- permukaan koloni	:	
- tekstur koloni	:	sangat padat/padat/seperti kapas/longgar/sangat longgar / berbukuk / bergranula
- pola pertumbuhan hifa/ miselia	:	<i>superficial/ immersed/ beneath</i>
- garis-garis konsentris	:	+/-
- garis-garis radial	:	+/-
- tetes eksudat	:	+/-
Ciri khusus/ tambahan :		

A. Kapang

1. Gambaran Mikroskopik

Hifa / Miselia	
Septasi :	
Warna :	
Clamp Connection :	
Ukuran :	
Struktur Reproduksi	
- Tangkai penghasil spora : Warna : Permukaan : Percabangan : Ukuran :	Konidiofor / Sporangiofor / Lainnya
- Vesikel / Kolumela / Lainnya Bentuk : Warna : Ukuran :	
- Metula / Fialid Bentuk :	

Formulir 14. Jawaban Hasil Identifikasi Kapang (2/2)

Permukaan : Ukuran :	
- Spora Bentuk : Permukaan : Ukuran : Warna tunggal : Dalam kelompok :	
- Ciri Khusus / Tambahan :	

Keterangan :

(+) Ada / ditemukan

(-) Tidak ditemukan

HASIL IDENTIFIKASI

Nomor InaCC	Nama Mikroba			Keterangan
	Genus	Spesies	Sub spesies	

KESIMPULAN

Hasil identifikasi : sesuai tidak sesuai, dengan spesifikasi sampel

Sampel : diterima ditolak

Cibinong.....,20.....

Mengetahui,

Manajer Teknis,

Pelaksana

Ir. Ahmad Jauhar Arief, M.Sc
NIP. 196105291987011001

.....
NIP.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Lembar asli dikirim ke bagian Administrasi - Lembar copy disimpan di Manajer Mutu |
|--|

LAMPIRAN 14

Formulir 15. Jawaban Hasil Identifikasi Bakteri (1/2)

Kode	Nama Mikroba						Jumlah
	Genus	Spesies	Serotipe	Varietas	Strain	Tipe	

IDENTITAS SAMPEL

Gambaran koloni

Medium :

Suhu inkubasi :^o C Lama inkubasi :jam Kondisi : (aerob/anaerob^{*})

Bentuk koloni :

Bulat/*irregular* :, permukaan :, Warna :,
Ukuran :

Gambaran Sel (mikroskopik)

Gram :

Bentuk : bulat : batang (spora/kapsul) :
Spiral : cocoid : lainnya :

Fluoroscensi : Berpendar / Tidak

Keterangan tambahan :
.....

Reaksi Biokimia

No	Nama Uji	Hasil	No	Nama Uji	Hasil
1			7		
2			8		
3			9		
4			10		
5			11		
6			12		

Formulir 15. Jawaban Hasil Identifikasi Bakteri (2/2)

Pengujian Lain

.....
.....
.....
.....
.....

HASIL IDENTIFIKASI

Kode	Nama Mikroba					
	Genus	Spesies	Serotipe	Varietas	Strain	Tipe

KESIMPULAN

Hasil identifikasi : sesuai tidak sesuai, dengan spesifikasi sampel
Sampel : diterima ditolak

Cibinong,....., 20.....

Mengetahui,
Manajer Teknis,

Pelaksana

Ir. Ahmad Jauhar Arief, M.Sc
NIP. 196105291987011001

.....
NIP.

- Lembar asli dikirim ke bagian Administrasi
- Lembar copy disimpan di Manajer Mutu

LAMPIRAN 15

Formulir 16. Jawaban Hasil Identifikasi Khamir (1/2)

IDENTITAS SAMPEL						
Kode	Nama Mikroba			Jumlah		
	Genus	Spesies	Sub spesies			

Reaksi Biokimia

No	Nama Uji	Hasil	No	Nama Uji	Hasil
1			7		
2			8		
3			9		
4			10		
5			11		
6			12		

Pengujian Lain

.....

.....

.....

.....

.....

HASIL IDENTIFIKASI

Kode	Nama Mikroba					
	Genus	Spesies	Serotipe	Varietas	Strain	Tipe

Formulir 16. Jawaban Hasil Identifikasi Khamir (2/2)

KESIMPULAN

Hasil identifikasi : sesuai tidak sesuai, dengan spesifikasi sampel

Sampel : diterima ditolak

Cibinong,....., 20.....

Mengetahui,
Manajer Teknis,

Pelaksana

Ir. Ahmad Jauhar Arief, M.Sc
NIP. 196105291987011001

.....
NIP.

- Lembar asli dikirim ke bagian Administrasi
- Lembar copy disimpan di Manajer Mutu

LAMPIRAN 16

Formulir 17. Jawaban Hasil Identifikasi Aktinomisetes (1/2)

IDENTITAS SAMPEL				
Kode	Nama Mikroba			Jumlah
	Genus	Spesies	Sub spesies	

Gambaran Makroskopik

Medium :	Suhu inkubasi : ° C	Umur koloni : hari
Diameter koloni (mm)	:	
Warna : - muka koloni	:	
- sebalik koloni	:	
Bentuk koloni:	: cembung/datar/cekung/bergelombang dan kasar atau licin	
- permukaan koloni	:	
- tekstur koloni	: sangat padat/padat/seperti kapas/longgar/sangat longgar / berbukuk / bergranula	
- pola pertumbuhan hifa/ miselia	: <i>superficial/ immersed/ beneath</i>	
- garis-garis konsentris	: +/-	
- garis-garis radial	: +/-	
- tetes eksudat	: +/-	
Ciri khusus/ tambahan :	:	

A. Aktinomisetes

1. Gambaran Mikroskopik

Hifa / Miselia	
Septasi :	
Warna :	
Clamp Connection :	
Ukuran :	
Struktur Reproduksi	
- Tangkai penghasil spora : Warna : Permukaan : Percabangan : Ukuran :	Konidiofor / Sporangiofor / Lainnya
- Vesikel / Kolumela / Lainnya Bentuk : Warna : Ukuran :	
- Metula / Fialid Bentuk :	

Formulir 17. Jawaban Hasil Identifikasi Aktinomisetes (2/2)

Permukaan : Ukuran :	
- Spora Bentuk : Permukaan : Ukuran : Warna tunggal : Dalam kelompok :	
- Ciri Khusus / Tambahan :	

Keterangan :
(+) Ada / ditemukan (-) Tidak ditemukan

HASIL IDENTIFIKASI

Nomor InaCC	Nama Mikroba			Keterangan
	Genus	Spesies	Sub spesies	

KESIMPULAN

Hasil identifikasi : sesuai tidak sesuai, dengan spesifikaii sampel
Sampel : diterima ditolak

Cibinong.....,20.....

Mengetahui,
Manajer Teknis,

Pelaksana

Ir. Ahmad Jauhar Arief, M.Sc
NIP. 196105291987011001

.....
NIP.

- Lembar asli dikirim ke bagian Administrasi
- Lembar copy disimpan di Manajer Mutu

LAMPIRAN 17

Komposisi Media Kultivasi

1. Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP2)

<i>Yeast extract</i>	4 g
<i>Malt extract</i>	10 g
Glukosa	4 g
Agar	20 g
Air destilata	1.000 mL
pH	7,3

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit

2. Nutrient Agar (NA)

<i>Nutrient broth</i>	8 g
Agar	20 g
Air destilata	1.000 mL
pH	± 7

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit

3. Potato Dextrose Agar (PDA)

<i>Potato dextrose broth</i>	39 g
Agar	20 g
Air destilata	1.000 mL
pH	± 7

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit

4. Yeast Malt Agar (YMA)

<i>Yeast extract</i>	3 g
<i>Malt extract</i>	3 g
Pepton	5 g
Glukosa	10 g
Agar	20 g

Air destilata 1.000 mL

pH

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit

5. Yeast Starch Agar (YSA)

Yeast extract 2 g

Souble starch 10 g

Agar 20 g

Air destilata 1.000 mL

pH 7,3

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit

6. IMK (Sea Water)

NaNO_3 200 mg

Na_2HPO_4 1,4 mg

K_2HPO_4 5 mg

NH_4Cl 2,68 mg

Fe-EDTA 5,2 mg

Mn-EDTA 0,332 mg

$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 37,2 mg

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,023 mg

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,014 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0073 mg

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 mg

H_2SeO_3 0,0017 mg

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,180 mg

Thiamin•HCl 0,2 mg

Biotin 0,0015 mg

Vitamin B12 0,0015 mg

Sea water 1,000 mL

7. AF6 (pH 6,6)

NaNO ₃	14 mg
NH ₄ NO ₃	2,2 mg
MgSO ₄ •7H ₂ O	3 mg
KH ₂ PO ₄	1 mg
K ₂ HPO ₄	0,5 mg
CaCl ₂ •2H ₂ O	1 mg
CaCO ₃	1 mg
<i>Fe-citrate</i>	0,2 mg
<i>Citric acid</i>	0,2 mg
Biotin	0,2 µg
Thiamin•HCl	1 µg
Vitamin B6	0,1 µg
Vitamin B12	0,1 µg
Tracemetals*	0,5 ml
<i>Distilled water</i>	99,5 mL

***Tracemetals**

Na ₂ EDTA•2H ₂ O	5 mg
FeCl ₃ •6H ₂ O	0,98 mg
MnCl ₄ •4H ₂ O	0,18 mg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,11 mg
CoCl ₂ •6H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	12,5 mg
<i>Distilled water</i>	100 mL

8. Allen (pH 2,5)

(NH ₄) ₂ SO ₄	132 mg
KH ₂ PO ₄	27,2 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24,6 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,4 mg

Allen metals*	0,01 mL
<i>Distilled water</i>	99,9 mL
*Allen metals	
Fe-EDTA	30,16 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,79 g
H ₃ BO ₃	2,86 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	220 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	79 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	130 mg
NH ₄ VO ₃	23 mg
<i>Distilled water</i>	100 mL

9. BG-11 (pH 7.4)

NaNO ₃	150 mg
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,5 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,6 mg
<i>Citric acid</i>	0,6 mg
<i>Ferric ammonium citrate</i>	0,6 mg
Na ₂ EDTA – Mg	0,1 mg
Na ₂ CO ₃	2 mg
Trace metal mix A₅ + Co*	0,1 Ml
<i>Distilled water</i>	99,9 mL

***Trace metal mix A₅ + Co**

H ₃ BO ₃	286 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	181 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	39 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	7,9 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	4,9 mg
<i>Distilled water</i>	100 mL

10. MBM (pH 6,0)

KNO_3	25 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,5 mg
K_2HPO_4	7,5 mg
KH_2PO_4	17,5 mg
NaCl	2,5 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg
Fe solution*	0,1 Ml
A₅ solution*	0,1 mL
<i>Distilled water</i>	99,8 mL

***Fe solution**

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
<i>Distilled water</i>	100 mL
Conc · H_2SO_4	0.026mL

***A₅ solution**

H_3BO_3	286 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7,9 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,1 mg
<i>Distilled water</i>	100 mL

11. Halo2a

Komposisi untuk 1000 mL:

<i>Yeast extract</i>	2,0 g
<i>Casamino acids</i>	2,0 g
<i>Sodium glutamate</i>	1,0 g
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	1,0 g
KCl	2,0 g
K_2HPO_4	0,3 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
NH_4Cl	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,0 g
NaCl	200,0 g
Trace element*	2 mL

*Trace elements

Untuk 1000 mL:

<i>Nitrilotriacetic acid</i> (NTA)	12,8 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,35 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,024 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
ZnCl_2	0,1 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
H_3BO_3	0,01 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,024 g
NaCl 1g	
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,12 g
Na_2SeO_4	0,004 g
Na_2WO_4	0,004 g
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,02 g

Pertama-tama NTA dilarutkan dan disesuaikan pH-nya menjadi 6,5 menggunakan larutan NaOH, kemudian tambahkan mineral. pH akhir sebesar 7,0.

Komposisi Media Protektif

1. Media protektif aktinomisetes dan bakteri

Sodium L(+)-glutamate monohydrate	3 g
Ribitol/Adonitol	1,5 g
L-cysteine hydrochloride monohydrate	0,05 g
0,1 M potassium phosphate buffer (pH 7)	100 mL
Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit	

2. Media protektif kapang

Na- glutamat 3 g

Buffer Fosfat pH 7

(K_2HPO_4 1,74 g, KH_2PO_4 1,34 g, H_2O) 100 mL

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit

3. Media protektif khamir

Media A

Polyvinylpyrrolidone (K.90) 6 g

Laktosa 5 g

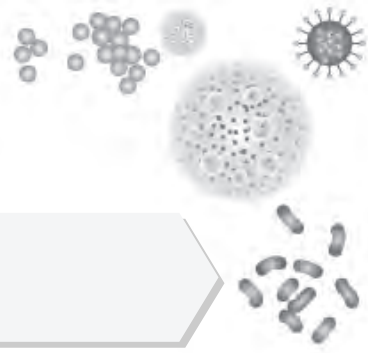
Air destilata 75 mL

Media B

Na- glutamat 3 g

Buffer Fosfat pH 7 (K_2HPO_4 1,74 g, KH_2PO_4 1,34 g, H_2O 100 mL)

Sterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, 1 atm selama 15 menit.



INDEKS

- Agromineral, iv
Air bebas nuklease, 83, 84, 95, 104, 111, 122, 130
Aktinomisetes, vi, vii, ix, xiii, xv, 9, 10, 18, 29–32, 35–37, 72, 93, 96, 178, 179
Arkea, vi, vii, ix, xiii, 9, 10, 25–27, 29, 126, 130, 132, 134
Ascomycota, 55, 147

Bakteri, vi, vii, ix, x, xv, 9, 10, 18, 38–40, 42, 44, 45, 72, 76, 77, 81, 174, 175
Basidiomycota, 55
Biosafety cabinet, 73, 101, 127
BLAST, xi, 90, 91, 93, 108, 115, 125, 138
Bonn Guide Line, xix
Budapest Treaty, xx, 142, 151

ChromasPro, 98, 108, 115, 125
Convention on Biological Diversity (CBD), xix
Cyanophyta, 116, 118

DNA *template*, 84, 88, 95, 104, 105, 111, 122, 131, 132, 135
Elution buffer, 122
Eukariotik, vii

Firmicutes, 39
Freeze-drying, vi, xi, 24, 32, 42, 50, 58, 129
Freezing, vi, ix, x, 24, 27, 36, 38, 44, 46, 52, 61, 63, 65

Gas burner, 26, 30, 33, 39, 42, 47, 50, 56, 59
Glomeromycota, 55
Go Taq green master mix, xiii, 84, 104, 111, 122
Gram, x, 29, 77, 78, 79, 80, 81, 145
Growth chamber, 65

Herbarium Bogoriense, xx, 8

Indonesian Culture Collection (InaCC), v, xix, 4, 6, 7, 190–197

ISO 9001:2008, xix, xx, 11

Kapang, vi, vii, x, xiii, xv, 9, 10, 18, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 100, 109, 112, 172, 173

Kering-beku, ix, 35

Khamir, vi, vii, x, xiii, xv, 9, 10, 18, 46, 47, 49, 50, 52, 53, 100, 103, 105, 176, 177

L-drying, vi, ix, x, xi, 23–25, 27, 30, 32–35, 39, 41, 42, 47, 49, 50, 52, 55–58, 71, 72, 75, 76, 100, 102, 103, 126, 129, 147, 150

Lyophilization, 23

Mikroalga, vi, vii, x, xiii, 9, 10, 64–66, 70, 116, 117, 123, 124

Nagoya Protocol, v, xix, 5, 6, 142

Nucleotide Analyzer, 81, 93, 109, 116

Nutrient broth, 72, 180

Pasteur, 3

Potato Dextrose Agar (PDA), 180

Primer forward, 84, 95, 122

Primer reverse, 84, 95, 122

Prokariotik, vii, 72

Proteobakteria, 39

Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS), 8

Subculturing, vi, x, 65, 70

Validitas, 144

Viabilitas, vii, x, xi, 63, 71, 72, 100, 126, 129

Washbuffer, 121

World Federation for Culture Collections (WFCC), xix, 11, 151

Yeast Starch broth, 72

Zoological Bogoriense, xx

Zygomycota, 55

BIOGRAFI PENYUSUN



Dr. Atit Kanti, S.Si., M.Sc.

Penulis adalah staf peneliti Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI. Penulis menamatkan pendidikan dasar di SD Karang Pawulang pada 1978, SMPN 13 Bandung pada 1984, dan SMAN 8 Bandung pada 1987. Penulis menyelesaikan pendidikan strata satu di Jurusan Biologi Universitas Padjajaran pada 1993. Selanjutnya, pada 2000, penulis menyelesaikan strata dua di Jurusan Mikrobiologi Tokyo University of Agriculture. Gelar doktor diperoleh dari Institut Pertanian Bogor untuk program studi Mikrobiologi. Saat ini, penulis menjabat sebagai kurator khamir di InaCC.



Muhammad Ilyas, M.Si.

Penulis adalah staf peneliti Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI. Penulis menyelesaikan pendidikan strata satu dan strata dua di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saat ini, penulis menjabat sebagai kurator kapang di Indonesian Culture Collection (InaCC).

Dr. Arif Nurkanto, M.Si.

Penulis adalah staf peneliti Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI. Pada 2005, penulis menamatkan pendidikan strata satu di Jurusan Biologi Universitas Diponegoro Semarang dan melanjutkan pendidikan strata dua Program Studi Biologi Universitas Indonesia pada 2010. Saat ini, penulis telah menyelesaikan pendidikan *doctoral* di Universitas of Tsukuba Jepang.



Tri Ratna Sulistiyani, M.Si.

Penulis adalah staf peneliti Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI. Pada 2006, penulis menyelesaikan pendidikan strata satu di Departemen Biokimia Institut Pertanian Bogor. Penulis mengikuti program magang di Gwangju Institute of Science and Technology Korea Selatan pada 2008. Penulis meraih gelar master di Program Studi Mikrobiologi Departemen Biologi Institut Pertanian Bogor. Saat ini, penulis menjabat sebagai wakil kurator bakteri di Indonesian Culture Collection (InaCC).



Siti Meliah, M.Si.

Penulis adalah staf peneliti di Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI. Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SDN Cipulir 02 pada 1999, SLTPN 153 Jakarta pada 2002, dan SMAN 47 Jakarta pada 2005. Selanjutnya, penulis menyelesaikan pendidikan strata satu pada 2010 pada Departemen Biologi Institut Pertanian Bogor untuk Mayor Biologi dan Minor Bioproses/Teknik Proses. Pada 2013, di kampus yang sama, penulis menyelesaikan pendidikan strata dua untuk program studi Mikrobiologi.



Panduan Pengelolaan **KOLEKSI** **MIKROORGANISME**

Indonesian Culture Collection (InaCC)

Indonesian Culture Collection (InaCC) merupakan pusat deponitori koleksi mikroorganisme Indonesia, dibangun untuk memperkuat fungsi otoritas ilmiah LIPI sebagai pusat acuan dalam pengelolaan sumber daya hayati nasional. Melalui buku panduan ini, InaCC berupaya mendokumentasikan dan membagi informasi yang terkait dengan sistem manajemen mutu koleksi mikroorganisme, mulai dari sistem administrasi hingga pemeliharaan koleksi yang berstandar internasional berdasarkan panduan World Federation for Culture Collections (WFCC) dan sistem manajemen ISO 9001:2008.

Buku ini dapat menjadi referensi dasar, baik bagi mahasiswa, peneliti, teknisi laboratorium, maupun staf administrasi yang terkait dengan pengelolaan koleksi mikroorganisme di Indonesia. Diharapkan buku panduan ini dapat memenuhi kebutuhan akan adanya metode baku dan sistematis dalam pengelolaan koleksi mikroorganisme yang berstandar internasional untuk tetap mempertahankan kekayaan mikroorganisme Indonesia.



Diterbitkan oleh:
LIPI Press, anggota Ikapi
Jln. R.P. Soeroso No. 39, Menteng, Jakarta 10350
Telp. (021) 314 0228, 314 6942. Faks.: (021) 314 4591
E-mail: press@mail.lipi.go.id
Website: lipipress.lipi.go.id

ISBN 978-979-799-982-7

