

# Uji Viabilitas Koleksi Kapang LIPI-MC dalam Ampul Penyimpanan Kering-beku *L-drying* setelah Satu Tahun Penyimpanan pada Suhu 5° C

## Viability tests of LIPI-MC mould collection in ampoule of *L-drying* preservation after one year of storage at 5° C

MUHAMMAD ILYAS\*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong.

Diterima: 25 Oktober 2006. Disetujui: 4 Januari 2007.

### ABSTRACT

A study on viability test of several LIPI-MC mould isolates in ampoule of *L-drying* preservation after one year storage at 5° C had been conducted. In this study, cell survival level of 34 ampoules number from eight mould generas and 17 species had been counted. The objective of this study was to observe the survival or viability level of several mould isolates in ampoule *L-drying* preservation after one year storage at 5° C. The measurement of viability level was based on the average of colony forming unit density (CFU/ml). The result showed that there were seven mould isolates have high viability, 18 isolates have medium viability, two isolates have low viability, and five isolates have lost its viability.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** viability, mould, ampoule, *L-drying*, colony forming unit (CFU/ml).

### PENDAHULUAN

Penyimpanan koleksi kapang pada awalnya dilakukan dengan melakukan transfer koloni secara berkala (*subculturing*) yaitu memindahkan isolat kapang dari satu media tumbuh ke media tumbuh selanjutnya. Dalam perjalanannya metode tersebut tidak dapat lagi diterapkan karena memiliki banyak kelemahan. Kelemahan metode penyimpanan berkala diantaranya; isolat kapang menjadi berubah karakter morfologi dan fisiologinya, berkurang atau kehilangan viabilitasnya, beresiko tinggi terkontaminasi, serta membutuhkan banyak dana perawatan, waktu, dan tenaga pelaksana terlebih bila koleksi kapang yang dimiliki dalam jumlah yang sangat besar (Flink dan Knudsen, 1983).

Adanya kenyataan tersebut menyebabkan metode penyimpanan kapang terus berkembang guna mengurangi kelemahan dan memperpanjang rentang waktu penyimpanan. Hasil pengembangan metode penyimpanan kapang menghasilkan beberapa metode yang dapat menyimpan kapang dalam waktu yang lama dengan tingkat kematian yang rendah. Metode tersebut diantaranya adalah metode penyimpanan beku (*freezing method*) dan metode penyimpanan kering-beku (*freeze drying/lyophilization method*). Kedua metode tersebut terbukti dapat menurunkan laju metabolisme kapang dan menginduksi proses dormansi pada kapang dengan tingkat kematian yang rendah (Flink dan Knudsen, 1983; Smith, 1991).

Metode penyimpanan kering-beku terdiri dari *liquid drying* (*L-drying*) dan *freeze drying*. Kedua metode tersebut dibedakan berdasarkan pada tahap dan proses pengeringan. Pada *L-drying*, proses pengeringan dilakukan melalui proses evaporasi, sedangkan pada *freeze drying* proses pengeringan dilakukan secara sublimasi. Selain itu, pada metode penyimpanan *L-drying* sampel dibuat hampa udara dan dikeringkan dari fase cair tanpa melalui proses pembekuan terlebih dahulu (Malik, 1991; Mikata 1999).

Metode penyimpanan *L-drying* dalam ampul pada suhu 5° C telah terbukti dapat menyimpan koleksi mikroba seperti bakteri, aktinomisetes, khamir, dan kapang pada rentang waktu lima hingga 20 tahun dengan tingkat kematian yang rendah (Tommerup dan Kirby, 1979; Sakane dan Kuroshima, 1997; Nagai *et al.*, 2005). Seluruh isolat kapang LIPI-MC yang disimpan secara *L-drying* dalam ampul disimpan pada suhu 5° C. Penelitian uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui tingkat viabilitas isolat kapang LIPI-MC dan efisiensi penyimpanan kering-beku *L-drying* selama satu tahun terhadap isolat kapang yang disimpan. Tingkat viabilitas diukur berdasarkan jumlah rerata kerapatan koloni kapang (CFU/ml) masing-masing isolat kapang yang telah disimpan selama satu tahun pada suhu 5° C dalam ampul penyimpanan kering beku *L-drying*.

### BAHAN DAN METODE

#### Sampel ampul penyimpanan kering-beku

Sampel ampul isolat kapang yang disimpan kering-beku *L-drying* berasal dari kultur koleksi LIPI-MC bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI, Bogor. Sampel ampul yang

\* Alamat Korespondensi:

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong  
Telp.: 021-8765066, Fax. 021-8765062  
Email : ilyasmould@yahoo.com

diuji viabilitasnya sebanyak 34 nomor dan isolat kapang yang berbeda.

#### Pengujian Tingkat Viabilitas

Tingkat viabilitas ampul berisi isolat kapang hasil penyimpanan kering-beku *L-drying* dilakukan dengan membuka ampul dan menumbuhkan spora di dalam ampul ke dalam cawan Petri berisi media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Nakagiri, 2005). Koloni kapang yang tumbuh diamati dan dihitung jumlah dan rerata kerapatan koloninya (CFU/ml).

Data kerapatan koloni kapang (CFU) diukur dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan tahapan kerja sebagai berikut;

- Dengan alat pemotong ampul (*diamond ampule cutter*), secara aseptik ampul dipotong tepat di bagian pertengahan sumbat kapas.
- Sumbat kapas kemudian diambil dan dilepaskan dari ujung ampul dengan menggunakan pinset steril
- Dengan pipet Pasteur, diteteskan  $\pm 0,1$  ml akuades steril ke dasar ampul yang berisi spora kering kapang, kemudian didiamkan selama  $\pm 10$  detik agar spora terbasahi dengan sempurna
- Seluruh isi ampul ( $\pm 0,1$  ml) kemudian diambil kembali dengan pipet Pasteur dan diencerkan dengan 9 ml akuades steril (pengenceran  $10^{-2}$ ), voteks hingga homogen.
- Sampel kemudian diencerkan kembali hingga pada konsentrasi  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$
- Dengan pipet mikro sebanyak 100 $\mu$ l sampel hasil

pengenceran, disebar ke dalam cawan Petri, kemudian dituang media PDA. Pada tahap ini untuk kedua pengenceran dibuat masing-masing sebanyak 3 ulangan dalam cawan Petri berdiameter 9 cm.

- Kultur selanjutnya diinkubasi selama 48–72 jam pada suhu ruang dan diamati pertumbuhannya serta dihitung jumlah dan rerata koloni (CFU/ml) yang terbentuk.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan uji viabilitas secara kuantitatif diambil berupa rerata kerapatan koloni isolat kapang per mililiter (CFU/ml). Uji viabilitas dilakukan pada 34 nomor ampul dengan isolat kapang yang terdiri dari 20 jenis dari delapan marga kapang yang berbeda. Hasil penghitungan rerata kerapatan koloni seluruh isolat kapang disajikan pada Tabel 1.

Selama satu tahun penyimpanan pada suhu 5° C, dari total 34 sampel isolat kapang LIPI-MC yang diuji viabilitasnya, 29 isolat kapang ( $\pm 85\%$  dari total sampel) tetap dapat tumbuh dan tidak kehilangan viabilitasnya. Hasil uji tersebut menegaskan bahwa metode penyimpanan kering-beku *L-drying* dapat mempertahankan viabilitas isolat-isolat kapang yang disimpan. Beberapa kultur mikroorganisme yang rentan terhadap proses penyimpanan jangka waktu lama dapat

disimpan dengan tingkat keberhasilan yang tinggi dengan menggunakan metode penyimpanan *L-drying*. Keberhasilan tersebut didukung beberapa faktor metodologis yang diterapkan dalam penyimpanan *L-drying*,

**Tabel 1.** Rerata kerapatan koloni (CFU/ml) isolat kapang LIPI-MC dalam ampul penyimpanan *L-drying* setelah satu tahun penyimpanan pada suhu 5° C

| No | No. LIPI-MC | Isolat | Jenis Kapang                   | CFU/mL (X 10 <sup>5</sup> ) | Tingkat Viabilitas | Keterangan   |
|----|-------------|--------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------|
| 1  | 465         |        | <i>Aspergillus awamori</i>     | 720                         | Tinggi             |              |
| 2  | 466         |        | <i>Aspergillus carbonarius</i> | 10                          | Sedang             |              |
| 3  | 193         |        | <i>Aspergillus flavus</i>      | 30                          | Sedang             |              |
| 4  | 473         |        | <i>Aspergillus flavus</i>      | 32                          | Sedang             |              |
| 5  | 476         |        | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | 60                          | Sedang             |              |
| 6  | 477         |        | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | 700                         | Tinggi             |              |
| 7  | 192         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | -                           | -                  | Tidak Tumbuh |
| 8  | 480         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 400                         | Tinggi             |              |
| 9  | 481         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 10                          | Sedang             |              |
| 10 | 482         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 24                          | Sedang             |              |
| 11 | 483         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 4                           | Rendah             |              |
| 12 | 485         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | -                           | -                  | Tidak Tumbuh |
| 13 | 487         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 200                         | Tinggi             |              |
| 14 | 490         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 32                          | Sedang             |              |
| 15 | 493         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 15                          | Sedang             |              |
| 16 | 494         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 10                          | Sedang             |              |
| 17 | 886         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | 220                         | Tinggi             |              |
| 18 | 889         |        | <i>Aspergillus niger</i>       | -                           | -                  | Tidak Tumbuh |
| 19 | TA2         |        | <i>Aspergillus oryzae</i>      | 10                          | Sedang             |              |
| 20 | 184         |        | <i>Aspergillus oryzae</i>      | 20                          | Sedang             |              |
| 21 | 499         |        | <i>Aspergillus oryzae</i>      | 10                          | Sedang             |              |
| 22 | 183         |        | <i>Aspergillus parasiticus</i> | 10                          | Sedang             |              |
| 23 | 999         |        | <i>Aspergillus spp.</i>        | 15                          | Sedang             |              |
| 24 | 570         |        | <i>Aspergillus tamarii</i>     | 10                          | Sedang             |              |
| 25 | T 170       |        | <i>Cladosporium herbarum</i>   | 130                         | Tinggi             |              |
| 26 | NK96        |        | <i>Eupenicillium sp.</i>       | -                           | -                  | Tidak Tumbuh |
| 27 | 64          |        | <i>Gliocladium verens</i>      | -                           | -                  | Tidak Tumbuh |
| 28 | 712         |        | <i>Paecilomyces sp.</i>        | 1                           | Rendah             |              |
| 29 | 713         |        | <i>Paecilomyces sp.</i>        | 30                          | Sedang             |              |
| 30 | 751         |        | <i>Penicillium spp.</i>        | 10                          | Sedang             |              |
| 31 | 856         |        | <i>Scopulariopsis sp.</i>      | 20                          | Sedang             |              |
| 32 | 859         |        | <i>Scopulariopsis sp.</i>      | 20                          | Sedang             |              |
| 33 | 901         |        | <i>Trichoderma hamatrum</i>    | 15                          | Sedang             |              |
| 34 | 900         |        | <i>Trichoderma viridae</i>     | 10                          | Sedang             |              |

diantaranya adalah tidak adanya proses pembekuan dan adanya penambahan media protektif pada awal proses pengeringan. Proses pembekuan dapat membunuh kultur yang rentan terhadap penurunan suhu yang ekstrim yaitu kultur-kultur mikroorganisme yang hidup pada suhu tinggi atau bersifat termofilik. Adapun penambahan protektif media seperti susu skim, meso-inositol, madu, glutamat, dan raffinosa pada awal proses penyimpanan berfungsi melindungi sel-sel mikroorganisme dari kerusakan pada saat proses pengeringan berlangsung (Malik, 1991).

Hasil uji viabilitas (Tabel 1) menunjukkan bahwa rerata kerapatan koloni isolat-isolat kapang yang tidak kehilangan viabilitasnya berkisar antara  $1 \times 10^5$  hingga  $72 \times 10^6$  CFU/ml. Rerata kerapatan koloni tertinggi dicapai pada isolat kapang *Aspergillus awamori* (No. LIPI-MC 465) dengan rerata CFU/ml sebesar  $72 \times 10^6$ . Batasan tinggi rendahnya tingkat viabilitas ditentukan berdasarkan banyak sedikitnya rerata kerapatan koloni isolat kapang yang tumbuh. Isolat yang menunjukkan tingkat viabilitas tinggi (rerata CFU  $\geq 1 \times 10^7$ /ml) dan sedang (rerata CFU  $\geq 1 \times 10^6$ /ml) tidak memerlukan proses pengampulan ulang dan proses penyimpanan ampul isolat dapat terus dilanjutkan untuk rentang waktu selanjutnya. Adapun isolat yang menunjukkan tingkat viabilitas yang rendah (rerata CFU berkisar  $1 \times 10^5$ /ml) atau sangat rendah (rerata CFU  $\leq 1 \times 10^4$ /ml) proses penyimpanan isolat dalam ampul untuk rentang waktu selanjutnya tidak dapat dilakukan. Hal tersebut disebabkan karena proses penyimpanan pada rentang waktu berikutnya akan dapat menghilangkan viabilitas isolat dalam ampul secara keseluruhan. Pada isolat-isolat yang memiliki viabilitas rendah dan sangat rendah sebaiknya dilakukan proses peremajaan kultur (*subculturing*) yang dilanjutkan dengan proses pengampulan ulang sehingga tingkat viabilitas isolat dalam ampul dapat kembali diperbarui (Mikata, 1999).

Beberapa isolat kapang yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan diantaranya adalah *Aspergillus niger* (No. LIPI-MC 192, 485, dan 889), *Eupenicillium* sp. (No. LIPI-MC NK96), dan *Gliocladium verens* (No. LIPI-MC 64). Hilangnya viabilitas isolat pada penyimpanan *L-drying* pada rentang waktu satu tahun penyimpanan lebih banyak disebabkan karena faktor teknis khususnya pada saat proses pengampulan dan bukan atau sedikit kemungkinannya karena perubahan fisiologis isolat yang disimpan. Kematian isolat mikroba pada penyimpanan kering-beku umumnya tidak disebabkan oleh faktor fisiologis seperti dehidrasi atau kekeringan sel tetapi lebih disebabkan oleh derajat dan jumlah air residu yang terdehidrasi pada saat proses pengampulan (Mikata, 1999). Faktor teknis yang menyebabkan kematian isolat diantaranya adalah pada saat proses pemotongan leher ampul dengan api las. Pemaparan api las yang terlalu lama dan dekat dengan dasar ampul akan menyebabkan dinding kaca ampul bersuhu tinggi dan memuai sehingga kumpulan spora isolat kapang yang terdapat disekitar dasar ampul ikut terbakar. Indikasi pemaparan api las yang terlalu lama dapat diamati berupa adanya sumbat kapas yang terbakar. Semakin banyak bagian sumbat kapas yang menghitam karena terbakar menunjukkan semakin lama proses pemaparan api dilakukan dan semakin besar resiko kematian isolat yang disimpan.

Beberapa nomor isolat kapang dari jenis yang sama yaitu *Aspergillus niger* menunjukkan adanya tingkat viabilitas yang bervariasi, dan pada beberapa nomor isolat kehilangan viabilitasnya. Perbedaan tingkat viabilitas tersebut diantaranya disebabkan adanya perbedaan variasi dalam jenis dan umur isolat yang digunakan. Adanya variasi dalam jenis akan mempengaruhi perbedaan karakter fisiologis dan morfologis, termasuk di dalamnya kemampuan viabilitas dan tingkat toleransi terhadap adanya perubahan kondisi lingkungan. Adapun dari sisi umur isolate, secara umum isolat kapang yang baik untuk dibuat suspensi spora dan disimpan dalam ampul *L-drying* adalah isolat yang telah dewasa dan matang spora. Hal tersebut dapat dicapai dengan cara menginkubasi kultur kapang minimal satu minggu sebelum dijadikan suspensi spora. Secara morfologis dan fisiologis spora yang telah matang sempurna memiliki ketahanan yang tinggi terhadap perubahan kondisi lingkungan sehingga secara alamiah dapat melakukan proses dormansi tanpa kehilangan kemampuan viabilitasnya. Sebaliknya, penggunaan kultur yang belum matang spora secara sempurna akan menyebabkan spora lebih rentan terhadap perubahan lingkungan sehingga mudah kehilangan viabilitasnya.

## KESIMPULAN

Pengujian tingkat viabilitas isolat kapang LIPI-MC yang disimpan dalam ampul penyimpanan kering-beku *L-drying* diukur berdasarkan jumlah rerata kerapatan koloni kapang (CFU/ml) masing-masing isolat. Hasil uji viabilitas menunjukkan dari 34 sampel ampul isolat kapang yang diuji tingkat viabilitasnya, tujuh isolat memiliki viabilitas tinggi, 18 isolat viabilitasnya sedang, dua isolat viabilitasnya rendah, dan lima isolat kehilangan viabilitasnya. Secara umum penyimpanan isolat kapang LIPI-MC dengan metode penyimpanan kering-beku *L-drying* pada suhu 5° C selama satu tahun penyimpanan telah berhasil dilakukan dengan tingkat keberhasilan viabilitas mencapai 85%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Flink, J.M. and H. Knudsen. 1983. *An introduction to freeze drying*. Denmark: Strandberg Bogtryk Offset.
- Malik, K.A. 1991. Maintenance of microorganisms by simple methods. In: Kirshop, B.E. and A. Doyle (eds.). *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A Manual of Laboratory Methods*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press.
- Mikata, K. 1999. Preservation of yeast culture by *L-drying*: Viability after 15 years storage at 5° C. *IFO Research Communications*. 19: 71–82.
- Nagai, T., K. Tomoika, K. Takeuchi, M. Iida, M. Kawada and T. Sato. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganisms resources in the MAAF Genebank. *JARQ*. 39(1): 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.
- Sakane, T. & K. Kuroshima. 1997. Viabilities of dried cultures of various bacteria after preservation for over 20 years and their prediction by the accelerated storage test. *Microbiological Culture Collection*. 1–7.
- Smith, D. 1991. Maintenance of filamentous fungi. In: Kirshop, B.E. and A. Doyle (eds.). *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A Manual of Laboratory Methods*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press.
- Tommerup, I.C. and D.K. Kirby. 1979. Preservation of spores vesicular-arbuscular endophytes by *L-drying*. *Applied & Environmental Microbiology*. 37(5): 831–835.