

PRAKTIKUM KULTUR JARINGAN

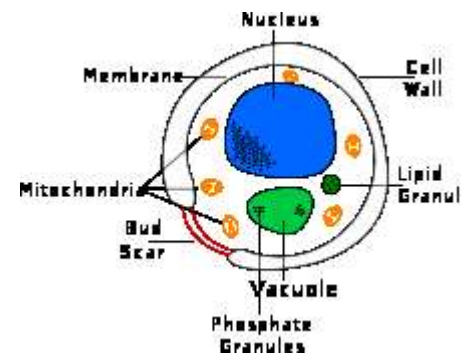
- Tujuan:**
- Mengetahui dan mampu melakukan teknik-teknik mengisolasi / inokulasi bakteri di media
 - Menggunakan alat mikroskop dengan benar.
 - Meneliti efek bahan atau kondisi tertentu terhadap *viability* kultur sel ragi
 - Diperkenalkan pada teknik McFarland Scale, absorbance spectrum serta pewarna sel

**Kegiatan praktikum ini diadaptasi dari bahan:*

- Depdiknas, 2008. http://118.98.213.22/kgi/smp/smp/biologi/klas_7/2_Cara%20Menggunakan%20Mikroskop%20Cahaya/materi03.html
- Thiel, T, 1999. Science in the Real World: Microbes in Action Bubbly Yeast, University of Missouri

Pendahuluan: Kultur jaringan/sel merupakan teknik laboratorium yang sangat berguna untuk bermacam-macam aplikasi di bidang farmakologi, anatomi, fisiologi, genetika maupun molekular biologi. Kultur jaringan yang pertama dilaksanakan dengan sukses pada tahun 1885 (oleh Wilhelm Roux) dan sekarang teknik kultur jaringan atau sel-sel dipergunakan dalam banyak aplikasi seperti produksi vaksin, perkembangan obat baru dan penghasilan insulin serta protein-protein lain. Keuntungan teknik kultur jaringan termasuk ketentuannya faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi aktifitas dan fungsi sel-sel. Dengan teknik tersebut, kita dapat meneliti aktifitas intraselular, interaksi sebuah sel dengan sel lain, dampak perubahan genetika tertentu, efeknya pada kekurangan atau kebanyakan unsur nutrisi terhadap kesehatan sel-sel dan banyak hal lain. Teknik kultur jaringan mempunyai kelemahan, antara lain kebutuhan untuk kondisi sangat bersih dan steril, keahlian teknis, serta keraguan bahwa jaringan atau sel yang bertumbuh *in vitro* (yaitu “di dalam medium”) berbeda dengan jaringan atau sel yang *in vivo* (yaitu alami).

Oleh karena perlengkapan Laboratorium Terpadu terbatas, hari ini kita akan mengerjakan kultur sel yang sederhana yaitu sel bakteri dan sel ragi (*S. cerevisiae*). Kita akan menggunakan mikroskop dan pewarna biologis untuk memonitor perubahan-perubahan pada sel yang kita kultur.



Skematik Sel Ragi

BAKTERI

Bagian A – MENGISOLASI / INOKULASI BAKTERI DI MEDIA

Protokol untuk teknik aseptic, inokulasi, metode goresan dll akan dijelaskan pada periode praktikum.

Sebagai persiapan, tolonglah membaca bahan “Kuliah 7 – Tambahan Kultur Media” yang sudah diupload ke situs web kita.

CATATAN DARI PENJELASAN PETUGAS LAB:

RAGI

Bagian A – MENGUKUR PRODUKSI CO₂ DENGAN PERUBAHAN WARNA PEWARNA BROMOPHENOL BLUE

Alat dan bahan yang digunakan

water botol yang kecil	selang plastic ~ 30cm	waterbath/es/?	ragi
beaker	larutan <i>bromophenol blue</i>	akudes	sukrosa

1. Tentukan kondisi untuk peparat ragi kelompok Anda: ____g ragi; ____g sukrosa dalam 100ml akuades.
2. Sebelum ragi dan sukrosa dicampur dengan akudes, biarkan 100ml akudes dalam water botol kecil ditera pada temperatur yang kelompok Anda mau periksa. Temperatur = _____ .
3. Pasang selang plastic pada ujung tip water botol dan masukkan ke dalam beaker yang akan berisi dengan larutan *bromophenol blue*. Cek posisi semuanya sebelum peparat ragi maupun larutan *bromophenol blue* dimasukkan wadah masing-masing.
4. Ketika siap, tambah ragi dan sukrosa ke dalam water botol kecil. Tutup. Tuangkan ~ 100 ml larutan *bromophenol blue* ke dalam beaker. Catat watkunya pada Table 1 di bawah dan perhatikannya supaya jelas bawa proses fermentasi sudah mulai.
5. Aduk kembali dan periksa warna larutan bromophenol blue setiap 10 menit selama 1,5 jam atau lebih. Catat apa yang Anda amati dalam Tabel 1.

Tabel 1: Produksi CO₂ (yang diukur oleh perubahan warna larutan bromophenol blue)

Waktu mulai: _____

waktu	pengamatan	waktu	pengamatan

Bagian B – MEMPERKIRAKAN KONSENTRASI SEL (CFU – “COLONY FORMING UNITS”) MELALUI KEKERUHANNYA

Alat dan bahan yang digunakan

1%BaCl ₂	96% H ₂ SO ₄ (yg pekat)	beaker	8-10 tabung reaksi
pipet otomatis	pipet Mohr (10ml)	gelas ukur	kuvet
rak tabung	alat spektrofotometer		spidol

Larutan %1 H₂SO₄ –siapkan 100ml.

1. Siapkan 9 tabung reaksi dalam rak tabung. Tandainya dengan McFarland Scale (lihat tabel ke kanan).
2. Isilah dengan 1% BaCl₂ dan 1% H₂SO₄ sesuai dengan catatan di tabel ke kanan.
3. Bawa rak tabung ke alat spektrofotometer untuk mengukur kekeruhannya.
4. Tentukan alat spektrofotometer pada λ di antara 440nm dan 650nm (catat λ yang dipakai di tabel 2)
5. Tuangkan ~ 1 ml sampel “blanko” ke dalam kuvet plastic spektrofotometer. Nulkan alat spektrofotometer.
6. Periksa serapan sampel-sampel lain pada λ yang sama dengan cara penuangan ke dalam kuvet yang tidak menambahkan gelombang tapi memang mengokokan isi tabung reaksi dan menghasilkan sampel yang rata-rata.
7. Masukkan hasil yang diperoleh dalam table 2 di bawah.

McFarland Scale	CFU (x10 ⁶ /mL)	1% BaCl ₂ / 1% H ₂ SO ₄ (mL)
0,5	<300	0.05/9.95
1	300	0.1/9.9
2	600	0.2/9.8
3	900	0.3/9.7
4	1200	0.4/9.6
5	1500	0.5/9.5
6	1800	0.6/9.4
7	2100	0.7/9.3
8	2400	0.8/9.2
9	blanko	0/10

Tabel 2: Hasil Serapan Standar-Standar McFarland Scale

Diukur pada λ = _____

scale	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8
CFU (x10 ⁶ /mL)	<300	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400
A									

Bagian C – MENGUKUR “CFU” PEPARAT RAGI

Alat dan bahan yang digunakan

pipet otomatis	10 tabung reaksi	rak tabung	akudes
kuvet	alat spektrofotometer	spidol	

1. Anda akan buat pengenceran “doubling dilution”. Sediakan 9 tabung reaksi dalam rak dan ditandai dengan faktor pengenceran “2”, “4”, “8”. “16”, “32”, “64”, “128”, “256” dan “512”.
2. Isilah masing-masing dengan 1 ml akudes.
3. Pada tabung reaksi “2” tambah 1 ml peparat ragi yang baru dikocokkan.
4. Ambil 1 ml dari tabung reaksi “2” dan masukkan ke tabung reaksi “4”
5. Ambil 1 ml dari tabung reaksi “4” dan masukkan ke tabung reaksi “8”

6. Ulangi dengan tabung reaksi yang berikutnya sampai pengenceran faktor 512 sudah siap.
7. Periksa "Absorbance Spektrum" dengan alat spektrofotometer pada λ yang Anda menggunakan untuk McFarland Scale.
8. Isilah hasilnya pada Tabel 3.

Tabel 3: Hasil Serapan *Doubling Dilution* Peparat Ragi

Diukur pada $\lambda =$ _____;

faktor	asli	2	4	8	16	32	64	128	256	512
A										

DETIL PEPARAT RAGI: Jumlah ragi: _____ gr Temperatur yg ditentukan: _____
 Konsentrasi gula (%) _____ Waktu sejak fermentasi mulai: _____

Bagian D – MENGUKUR *ABSORANCE SPECTRUM BROMOPHENOL BLUE*

Alat dan bahan yang digunakan

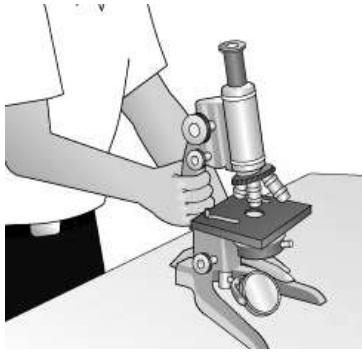
pipet otomatis	larutan <i>bromophenol blue</i>	akudes	0,01M HCl	4 tabung reaksi
kuvet	alat spektrofotometer	pipet tetes	kertas pH	spidol

1. Tandai tabung reaksi dengan "pH=5", "pH=4,5", "pH=4" dan "pH= 3".
2. Isilah masing-masing dengan 5 ml akudes.
3. Tambah 5 ml larutan *bromophenol blue* pada setiap tabung reaksi.
4. Menggunakan pipet tetes, larutan 0,01M HCl dan kertas pH untuk menentukan pH pada setiap tabung reaksi.
5. Berikan satu tabung kepada setiap grup meja di laboratorium hari ini.
6. Periksa "Absorbance Spektrum" dengan alat spektrofotometer
 - a. Siapkan blanko – akudes dalam kuvet spektrofotometer
 - b. Tuangkan ~ 1ml dari larutan *bromophenol blue* ke dalam kuvet spektrofotometer.
 - c. Pilih "scan" pada menu alatnya dan masukan 400nm dan 700nm sebagai jarak/range yang ingin diperiksa.
 - d. Pilihlah "*fast scan*"
 - e. Nulkan alatnya dengan blanko.
 - f. Masukkan sampel dan mulai scan.
 - g. Ketika alat sudah selesai, print spectrum.
 - h. Scan dan upload spectrum ke situs web kita dengan catatan pHnya larutan.

Bagian C - PENGGUNAAN MIKROSKOP UNTUK MELIHAT HASILNYA

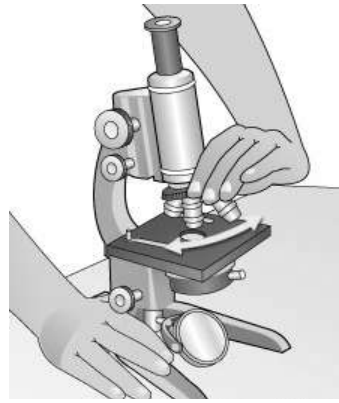
Sebelum melakukan praktikum dengan menggunakan mikroskop cahaya maka perhatikan langkah-langkah berikut:

1.



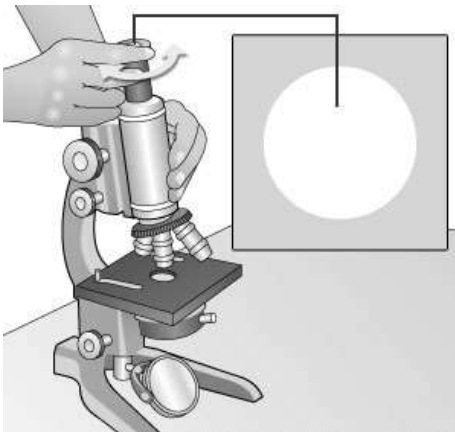
Letakkan mikroskop di atas meja dengan cara memegang lengan mikroskop sedemikian rupa sehingga mikroskop berada persis di hadapan pemakai.

2.



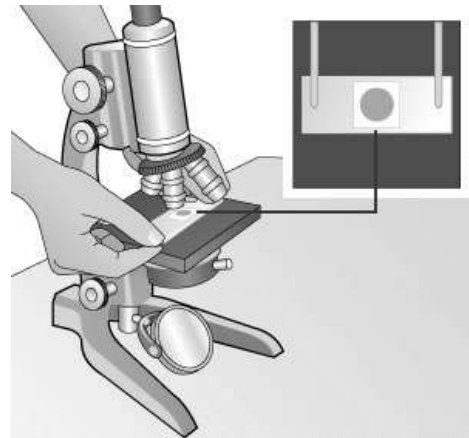
Putar revolver sehingga lensa obyektif dengan perbesaran lemah berada pada posisi satu poros dengan lensa okuler yang ditandai bunyi klik pada revolver

3.



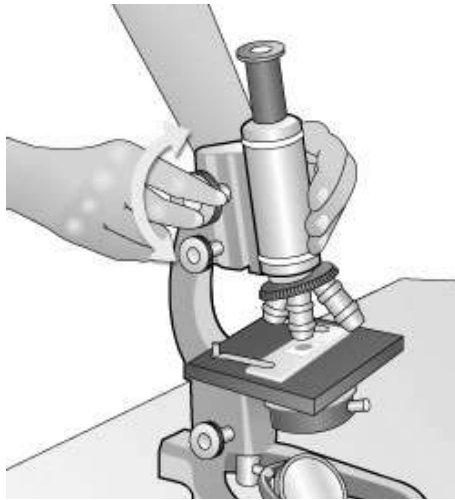
Mengatur cermin dan diafragma untuk melihat kekuatan cahaya masuk, hingga dari lensa okuler tampak terang berbentuk bulat (lapang pandang).

4.



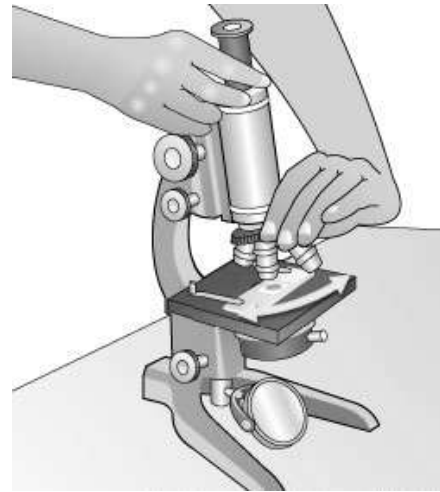
Tempatkan preparat pada meja benda tepat pada lubang preparat dan jepit dengan penjepit obyek/benda.

5.



Aturlah fokus untuk memperjelas gambar obyek dengan cara memutar pemutar kasar, sambil dilihat dari lensa okuler. Untuk mempertajam putarlah pemutar halus.

6.



Apabila bayangan obyek sudah ditemukan, maka untuk memperbesar, gantilah lensa obyektif dengan ukuran dari 10X, 40X atau 100X, dengan cara memutar revolver hingga bunyi klik.

7. Apabila telah selesai menggunakan, bersihkan mikroskop dan simpan pada tempat yang tidak lembab

**gambar-gambar di atas copyright Pustekkon Depdiknas 2008*

Cara Kerja:

1. Transfer 1 tetes kultur sel (bakteri atau ragi) dari piring Petri pertama ke objek glass yang bersih dan kering. Tutup dengan cover glass.
2. Letakkan objek glass di bawah lensa perbesaran 10X .
3. Sesuai dengan teknik yang diterangkan di atas, fokuskan lensa pada preparat dan putar revolver mikroskop ke lensa yang punya magnifikasi yang tepat untuk tujuan pengamatan sel-sel.
4. Gambarkan hasil yang Anda lihat pada halaman hasil praktikum ini.
5. Anda bisa menggunakan pewarna metilin blue agar detil sel-sel lebih jelas.

Laporan Praktikum Kultur Sel: (per kelompok meja)

Buat laporan praktikum yang lengkap dengan judul, dan tujuan dengan kata-kata Anda sendiri.

Buatlah kurva standar dengan data yang diperoleh di Tabel 2. Menggunakah grafik tersebut untuk memperkirakan konsentrasi preparat ragi pada faktor pengenceran 128. Sebenarnya McFarland Scale/Standard bermaksud untuk digunakan untuk mengukur konsenstrasi e.coli. Berikan pendapat Anda atas gunanya skala McFarland dalam konteks praktikum kita hari ini.

Kumpulkan hasil scan *absorbance spectrum* dari semua kondisi pH. Perbandingkan dan berikan 2 kesimpulan yang berdasar scan-scan tersebut.

Buatlah gambar sel bakteri serta sel ragi sesuai dengan apa yang Anda amati dengan mikroskop.

Catat 2 hal yang menarik bagi Anda mengenai teknik kultur bakteri yang disampaikan pada praktikum ini serta 2 hal lagi dari bagian yang berkaitan dengan ragi.

Berikanlah saran atas praktikum ini dan usulan supaya untuk praktikum selanjutnya lebih baik lagi.