

PRAKTIKUM TEKNOBIO INDUSTRI



**FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA**

PRAKTIKUM TEKNOBIO INDUSTRI

Oleh :

Dr. Dra. E. Mursyanti, M.Si
Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta, M.Sc
Drs. P. Kianto Atmodjo, MSi
Ines Septi Arsiningtyas Ph.D., Apt

© Gosyen Publishing 2019



Gosyen Publishing
Jatirejo 58B RT07/RW21
Sendangadi, Mlati, Sleman, Yogyakarta, 55285
www.gosyenpublishing.web.id
e-mail : gosyenpublishing@yahoo.com

Ilustrasi Dalam : Andy Gp
Ilustrasi Sampul : Tim Gosyen

Cetakan Pertama 2019

Katalog Dalam Terbitan (KDT):

PRAKTIKUM TEKNOBIO INDUSTRI;

Dr. Dra. E. Mursyanti, M.Si,
Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta, M.Sc
Drs. P. Kianto Atmodjo, MSi
Ines Septi Arsiningtyas Ph.D., Apt

viii, 64 hlm; 205 x 275 cm.
ISBN 978-602-5411-50-2

Anggota IKAPI DIY
No. 098/DIY/2017

Hak Cipta dilindungi Undang-undang.

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apa pun, termasuk fotokopi, tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Kumpulan buku petunjuk praktikum ini berisi petunjuk beberapa praktikum yang merupakan mata praktikum wajib konsentrasi Teknobiologi-Industri. Jenis-jenis praktikum tersebut yaitu: Mikrobiologi Industri, Teknologi Obat Tradisional, dan Bioteknologi Tanaman Obat.

Masing-masing petunjuk praktikum berisi acara-acara praktikum yang telah dilakukan perbaikan baik isi maupun peralatan yang dipergunakan. Pemilihan acara praktikum oleh masing-masing Koordinator Praktikum diharapkan dapat memberikan ketrampilan dasar, penguasaan iptek terkini, dan pengalaman penting bagi mahasiswa Fakultas Teknobiologi, khususnya pada konsentrasi Teknobiologi-Industri. Pemilihan acara-acara praktikum telah disesuaikan dengan perkembangan zaman, perkembangan iptek di dunia industri serta dunia kerja masa kini.

Mahasiswa diberikan tanggungjawab untuk membaca, menguasai, dan memahami masing-masing petunjuk, agar dalam melakukan kegiatan praktikum mahasiswa tidak mengalami kesulitan. Sangat diharapkan pula mahasiswa mampu menggunakan alat, metode, dan melakukan analisis data hasil praktikum yang telah dilakukan serta menyajikannya dalam bentuk laporan praktikum.

Kepada para mahasiswa dan para pengguna buku petunjuk praktikum ini dimohon untuk memberikan kritik, saran, dan masukan sehingga buku petunjuk ini dapat dilakukan perbaikan dan penyempurnaan di masa mendatang.

Terimakasih disampaikan kepada para Koordinator Praktikum Mikrobiologi Industri, Teknologi Obat Tradisional, dan Bioteknologi Tanaman Obat yang telah menyelesaikan penyusunan buku petunjuk praktikum masing-masing. Terimakasih pula dihaturkan

kepada pimpinan Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta yang telah memberikan kesempatan kepada Laboratorium Teknobiologi-Industri untuk menyusun kumpulan buku petunjuk praktikum ini.

Yogyakarta, 18 Juli 2019
Kepala Laboratorium Teknobiologi-Industri,

ttd,

Drs. B. Boy RahardjoSidharta, M.Sc

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR iii

DAFTAR ISI v

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI INDUSTRI

ACARA I
UJI KEMURNIAN DAN POLA PERTUMBUHAN
BAKTERI ASAM LAKTAT 1

ACARA II
PRODUKSI ASAM LAKTAT SECARA HOMO FERMENTATIF 5

ACARA III
PRODUKSI ASAM SITRAT OLEH ASPERGILLUS 9

ACARA IV
AKTIVITAS PENISILIN YANG DIHASILKAN
OLEH *Penicillium chrysogenum* 13

DAFTAR BACAAN 17

**PRAKTIKUM
TEKNOLOGI OBAT TRADISIONAL**

ACARA 1 PENGENALAN TUMBUHAN HERBAL	21
ACARA 2 PENGOLAHAN PASCA PANEN: PENGERINGAN DAN PENYERBUKAN	27
ACARA 3 PENYARIAN (EKSTRAKSI)	29
ACARA 4 IDENTIFIKASI ZAT AKTIF (UJI FITOKIMIA)	31
ACARA 5 UJI ANTIOKSIDAN	35
ACARA 6 PEMBUATAN JAMU DAN PENGUJIAN ANGKA KAPANG KHAMIR	37
ACARA 7 PEMBUATAN PRODUK SEDIAAN FARMASI	39
DAFTAR PUSTAKA	41

**PETUNJUK PRAKTIKUM
BIOTEKNOLOGI TANAMAN OBAT**

ACARA 1 PEMBUATAN MEDIUM DAN STERILISASI	43
ACARA 2 KULTUR SUSPENSI SEL	45

ACARA 3	
ISOLASI TOTAL DNA GENOM TANAMAN	49
ACARA 4	
ISOLASI DNA PLASMID BAKTERI	51
ACARA5	
AMPLIFIKASI GEN DENGAN METODE PCR	53
ACARA6	
CEK DNA DENGAN GEL ELEKTROFORESIS	55
ACARA 7	
TRANSFORMASI GENETIK (I)	
PENANAMAN TARGET TRANSFORMASI	57
ACARA 8	
TRANSFORMASI GENETIK (II)	
Kokultivasi Target Transformasi dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
ACARA 9	
TRANSFORMASI GENETIK (III)	
Eliminasi <i>A.tumefaciens</i>	61
ACARA 10	
TRANSFORMASI GENETIK (IV)	
Penanaman Hasil Transformasi pada Medium Seleksi	63

PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI INDUSTRI

Dr. Dra. E. Mursyanti, M.Si
Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta, M.Sc

KATA PENGANTAR

Buku Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Industri edisi ke-3 ini merupakan revisi dari buku Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Industri edisi pertama dan kedua. Beberapa perubahan telah dilakukan, terutama untuk menyesuaikan kompetensi dari mata kuliah Mikrobiologi Industri yang dikaitkan dengan kompetensi konsentrasi/minat Teknobiologi di Fakultas Teknobiologi.

Fokus utama dari praktikum ini adalah memberikan pemahaman bagi praktikan dalam menghasilkan produk-produk metabolit, baik primer maupun sekunder dari kultur mikrobia. Selain itu memberikan pemahaman terhadap langkah-langkah atau tahap-tahap yang harus dilakukan untuk menghasilkan produk mikrobia. Penjelasan dan cara kerja pada buku petunjuk ini tidak terlalu rinci, namun diharapkan praktikan membaca dan mencari cara kerja dari petunjuk praktikum matakuliah atau buku teks terkait.

Akhir kata, semoga buku petunjuk praktikum ini dapat memberikan tuntunan dan manfaat bagi praktikan serta para pengguna buku ini dalam menjalankan praktikum Mikrobiologi Industri.

Yogyakarta, Juni 2019

Tim Penulis

Capaian Pembelajaran (CP) / *Learning Outcome* (LO) Praktikum Mikrobiologi Industri

A. Sikap:

Menjunjung tinggi nilai kemanusiaan dalam menjalankan tugas berdasarkan agama, moral, dan etika; menghargai keanekaragaman budaya, pandangan, agama, dan kepercayaan, serta pendapat atau temuan orisinal orang lain; menginternalisasi nilai, norma, dan etika akademik; menunjukkan sikap bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri; menginternalisasi semangat kemandirian, kejuangan, dan kewirausahaan; menunjukkan sikap yang mencerminkan nilai-nilai UAJY, yaitu unggul, inklusif, humanis, dan berintegritas.

B. Keterampilan Umum:

Menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, dan inovatif dalam konteks pengembangan atau penerapan iptek sesuai keahliannya; mengkaji pengembangan atau penerapan iptek sesuai keahliannya, berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah untuk menghasilkan solusi, gagasan, desain, atau kritik serta menyusun deskripsi saintifik hasil kajiannya dalam bentuk skripsi atau laporan tugas akhir; mengambil keputusan secara tepat dalam menyelesaikan masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data; mengelola pembelajaran secara mandiri; mengembangkan dan memelihara jaringan kerja dengan pembimbing, kolega, sejawat baik di dalam maupun di luar lembaganya.

C. Penguasaan Pengetahuan:

Menguasai konsep teoritis biologi sel dan molekul, biologi organismal, ekologi dan evolusi, menguasai konsep statistika, biofisika, kimia organik dan biokimia; menguasai prinsip-prinsip biologi, sumberdaya hayati, lingkungan hayati, konsep penerapan biologi dalam mengelola dan memanfaatkan sumberdaya hayati maupun lingkungannya; menguasai konsep, prinsip-prinsip dan aplikasi pengetahuan biologi pada bidang pangan, kesehatan, lingkungan hayati, dan sumberdaya hayati dalam pengelolaan dan pemanfaatan sumberdaya hayati maupun lingkungannya; menguasai metode bioteknologi

yang relevan, menguasai aplikasi *software*, instrumen dasar, metode standar untuk analisis dan sintesis pada bidang biologi yang umum atau yang spesifik di bidang industri obat-obatan dan atau lingkungan dan konservasi sumberdaya hayati dan atau pangan.

D. Ketrampilan Khusus:

Mampu memecahkan permasalahan biologi secara prosedural melalui pendekatan biologi dan bioteknologi dari tingkat molekuler sampai tingkat makroskopik/organism; mampu menguasai konsep dan prinsip bidang inti biologi: biologi hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme; mampu merencanakan dan mengelola sumberdaya di bawah tanggung jawabnya, dan mengevaluasi kerjanya secara komprehensif dengan memanfaatkan pengetahuan dan cara-cara biologi untuk menghasilkan langkah-langkah pengembangan strategis organisasi (menyiapkan, menangani, dan mengelola bahan biologi dengan benar dan aman) dalam bidang pengelolaan lingkungan secara berkelanjutan; mampu mempertanggungjawabkan pengelolaan bagian-bagian dari proses pendidikan biologi atau menyiapkan, menangani, dan mengelola bahan biologi di bidang lingkungan, kesehatan, dan proses manufaktur pada institusi pemerintah dan swasta; mampu menyajikan alternatif solusi sebagai dasar pengambilan keputusan yang tepat dalam memecahkan masalah Biologi terutama/khususnya dalam pengelolaan dan pemanfaatan sumberdaya hayati dan lingkungan melalui penerapan pengetahuan, metode biologi dan teknologi yang relevan; mampu mengembangkan kemanfaatan keilmuan Biologi untuk diaplikasikan pada lingkup kehidupan sehari-hari yang bermanfaat bagi masyarakat; mampu mengelola sumberdaya hayati pada institusi pemerintah, swasta atau untuk keperluan wirausaha; mampu menyusun laporan dan mengkomunikasikan/mempublikasikannya; mampu menyajikan jawaban alternatif dalam memecahkan masalah terkait pengelolaan sumberdaya hayati dan lingkungan melalui penerapan pengetahuan, metode dan teknologi yang relevan sebagai dasar pengambilan keputusan.

TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI INDUSTRI

1. Praktikan harus hadir 5 (lima) menit sebelum praktikum dimulai. Bila terlambat lebih dari 5 (lima) menit, praktikan tidak diperkenankan mengikuti praktikum pada hari itu.
2. Praktikan yang tidak hadir mengikuti praktikum harus memberikan surat keterangan dari dokter/orang tua/wali.
3. Praktikan yang tidak hadir 3 (tiga) kali berturut-turut/tidak, dianggap mengundurkan diri.
4. Praktikan diwajibkan mempelajari hal-hal yang berhubungan dengan acara baik dari buku petunjuk praktikum maupun dari buku-buku yang lain.
5. Setiap kali selesai praktikum, praktikan wajib membuat laporan hasil praktikum, dan dikumpulkan 1 (satu) minggu sesudahnya.
6. Setelah semua acara praktikum selesai, akan diadakan responsi atau ujian praktikum yang wajib diikuti oleh semua peserta dan tidak akan dilakukan responsi susulan.
7. Untuk dapat mengikuti responsi, semua laporan praktikum sudah harus mendapat pengesahan dari asisten.
8. Pada akhir praktikum, praktikan akan memperoleh surat keterangan tanda telah mengikuti praktikum.
9. Pada waktu praktikum semua praktikan diwajibkan memakai jas laboratorium. Bagi yang tidak memakai tidak diperkenankan mengikuti praktikum.
10. Bagi yang merusakkan alat harus mengganti dengan alat yang sama atau uang seharga alat tersebut.
11. Waktu melaksanakan praktikum harus sopan, tenang, dan tidak bersendau gurau. Bila praktikan tidak bertindak menurut norma susila akan dikenakan sanksi.
12. Aturan lain yang berkenaan dengan praktikum akan diatur/ditetapkan kemudian.

$$\text{NAP} = \frac{1A + 2T + 3L + 3R}{9}$$

Keterangan:

A = aktivitas

T = tes (pre/pos-tes)

L = laporan

R = responsi

KEAMANAN KERJA DI LABORATORIUM

Keamanan dan kenyamanan selama menjalankan praktikum **Mikrobiologi Industri** dapat dicapai dengan:

1. Meletakkan barang/benda yang **TIDAK** terkait dengan kegiatan praktikum, seperti: HP, laptop, tas, jaket, buku, dll. pada tempat yang telah disediakan (rak khusus). Tujuan: meminimalkan kontaminasi!
2. Beberapa mikroorganisme yang digunakan dalam praktikum **MUNGKIN** ada yang bersifat membahayakan/patogen (oportunistik) bagi manusia, sehingga mahasiswa **HARUS** bekerja secara aseptis. Pelajari teknik aseptis secara seksama dan mintalah panduan/arahan dari Asisten dan/atau Laboran!
3. **DILARANG** merokok, makan, dan minum di dalam laboratorium. **DILARANG** (kurangi) bicara, gunakan penutup mulut (masker). **CUCI** tangan sebelum dan saat akan meninggalkan laboratorium!
4. Jika **MENUMPAHKAN** sediaan mikroorganisme, lakukan **SEGERA** hal-hal berikut:
 - a. **TUTUP** dengan kertas tisu secukupnya, lalu semprot dengan alkohol. **CATATAN:** matikan lampu spiritus saat menyemprotkan alkohol! Setelah 10 menit, kumpulkan dan buanglah kertas tisu beserta tumpahan sediaan ke dalam tempat sampah yang disediakan. Gunakan sarung tangan karet untuk mengambil kertas tisu dan tumpahan sediaan tadi!
 - b. **CUCI** tangan dengan sabun desinfektan dan keringkan dengan kain lap atau kertas tisu hingga kering!
 - c. Laporkan kejadian tersebut kepada Asisten yang bertugas, Laboran atau Koordinator Praktikum.
5. **LAPORKAN** bila ada teman yang terluka, terbakar atau cedera lainnya kepada Asisten yang bertugas, Laboran atau Koordinator Praktikum.
6. Setelah menyelesaikan satu acara/kegiatan, **BUANG** semua bahan dan/atau sampah secara benar ke tempat sampah yang telah disediakan. Jaga jangan sampai ada cairan/ larutan tumpah ke lantai laboratorium!
7. Kumpulkan semua cawan petri (*petridish*), tabung reaksi, pipet, dan alat-alat gelas lainnya dalam tempat yang telah disediakan secara hati-hati agar **TIDAK** jatuh/pecah!

- Laporkan kepada Asisten yang bertugas, Laboran atau Koordinator Praktikum bila ada alat gelas yang pecah!
8. JANGAN mengambil alat dari gelas yang pecah dengan tangan Anda! Gunakan sapu dan alat pembersih yang telah disediakan! Buang semua pecahan kaca/gelas ke dalam tempat yang telah tersedia!
 9. HATI-HATI saat menggunakan lampu spiritus! Kancingkan semua kancing jas laboratorium Anda, ikat rambut ke belakang agar tidak mudah bersentuhan dengan api dari lampu spiritus!
 10. Kembalikan semua alat dan bahan yang digunakan dalam suatu acara/kegiatan praktikum pada tempat SEMULA!
 11. Setelah selesai acara/kegiatan, bersihkan atau sterilkan meja kerja Anda dengan alkohol!
 12. BACA "Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Industri Edisi 3" secara seksama dan ikuti semua petunjuk serta cara kerja dengan baik dan benar untuk menghindari bahaya dan ketidakamanan saat praktikum!
 13. Bila menggunakan cairan tubuh sebagai bahan praktikum, maka mahasiswa HARUS menggunakan dan/atau mengerjakan cairan tubuhnya sendiri! Tujuan: menghindari penularan atau penyebaran penyakit tertentu!
 14. Bila terjadi KEADAAN DARURAT/BAHAYA seperti gempa bumi dan kebakaran, SEGERA keluar dari Laboratorium dan hubungi petugas keamanan (Satpam) kampus.
 15. Selamat bekerja dan belajar, semoga semuanya berjalan dengan lancar, aman, dan nyaman. Tuhan memberkati Anda semua.

DAFTAR ISI

PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI INDUSTRI	i
KATA PENGANTAR	iii
Capaian Pembelajaran (CP) / <i>Learning Outcome</i> (LO) Praktikum Mikrobiologi Industri	v
TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI INDUSTRI	vii
KEAMANAN KERJA DI LABORATORIUM	ix
DAFTAR ISI	xi
ACARA I UJI KEMURNIAN DAN POLA PERTUMBUHAN BAKTERI ASAM LAKTAT	1
ACARA II PRODUKSI ASAM LAKTAT SECARA HOMO FERMENTATIF	5
ACARA III PRODUKSI ASAM SITRAT OLEH <i>ASPERGILLUS</i>	9
ACARA IV AKTIVITAS PENISILIN YANG DIHASILKAN OLEH <i>Penicillium chrysogenum</i>	13
DAFTAR BACAAN	17

ACARA I

UJI KEMURNIAN DAN POLA PERTUMBUHAN BAKTERI ASAM LAKTAT

Pendahuluan

Pertumbuhan ialah bertambahnya komponen sel secara ireversibel, biasanya disertai dengan bertambahnya ukuran sel dan pembelahan sel. Pada jasad uniseluler, pertumbuhan dapat disertai dengan pembelahan sel yang mengakibatkan bertambahnya individu.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri basilus Gram positif (+) dan tidak berspora. Jenis yang termasuk kelompok ini misalnya *Lactobacillus*, tergolong dalam suku Lactobacillaceae. Bakteri ini berbentuk batang yang panjang, anaerobik fakultatif, dan katalase negatif.

Jenis *Lactobacillus* dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu bersifat homofermentatif dan bersifat heterofermentatif. Jenis *Lactobacillus* homofermentatif dapat memecah gula menjadi asam laktat dan dapat tumbuh pada suhu 37 °C atau lebih. Jenis BAL yang tergolong homofermentatif misalnya *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. thermophilus*, dan *L. delbrueckii*. Jenis *Lactobacillus* yang bersifat heterofermentatif dan mempunyai suhu optimum pertumbuhan yang lebih rendah misalnya *L. casei*, *L. plantarum*, dan *L. leichmanii*.

Faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan dan aktivitas BAL adalah suhu, pH, kadar O₂, dan tipe *buffer* yang digunakan.

Tujuan

- a. Mahasiswa mengetahui kemurnian dari isolat *Lactobacillus delbrueckii* yang akan digunakan untuk memproduksi asam laktat
- b. Mahasiswa mengetahui pola pertumbuhan bakteri *Lactobacillus delbrueckii* yang ditumbuhkan pada medium diperkaya dan medium alami.

Alat dan bahan

1. Biakan murni *Lactobacillus delbrueckii* umur 48 jam
2. Medium pertumbuhan BAL
3. Gelas Benda

4. Cat Gram
5. Mikroskop
6. *Hand Counter*

Cara Kerja

A. Uji Kemurnian

1. Siapkan biakan *L. delbrueckii* pada medium MRS agar miring maupun medium MRS cair yang telah diinkubasi pada suhu 45 °C selama 48 jam.
2. Biakan pada medium MRS cair digunakan untuk uji morfologi koloni (*metode pour plate*), uji katalase, dan uji biokimia (produksi asam pada medium glukosa, fruktosa, dan maltosa), sedangkan biakan pada medium agar miring digunakan untuk uji pengecatan Gram dan uji motilitas.

B. Pola Pertumbuhan BAL

1. Pola pertumbuhan dibuat dengan langkah sebagai berikut: pertama membuat starter. Starter dibuat dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan yang terdapat pada medium agar miring ke dalam 10 ml medium cair, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 45 °C.
2. Ambil kultur starter sebanyak 1% selanjutnya dimasukkan ke dalam medium MRS cair atau medium alami cair (campuran dari air kelapa, ekstrak taoge dan ekstrak sawi). Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setiap 2 jam sekali sampel diambil dan diukur absorbansinya pada 620 nm.
3. Pembuatan medium alami dibuat dengan cara mencampurkan air kelapa : ekstrak taoge : ekstrak sawi dengan perbandingan 1:1:1, selanjutnya ditambahkan 60 g sukrosa kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
4. Pembuatan ekstrak taoge atau ekstrak sawi dibuat dengan cara menimbang 200 g taoge atau sawi, kemudian dimasukkan ke dalam 1 liter akuades lalu dipanaskan sampai mendidih, disaring dan diambil ekstraknya.
5. Pola pertumbuhan *Lactobacillus delbrueckii* dibuat diagram dengan sumbu Y sebagai nilai OD dan sumbu X sebagai waktu inkubasi.

Pertanyaan

1. Apa persamaan dan perbedaan BAL 'homofermentatif' dengan 'heterofermentatif'?
2. Sebutkan dan jelaskan faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan BAL!
3. Medium apa saja yang digunakan untuk menumbuhkan BAL? Mengapa?

4. Uji-uji apa saja yang dilakukan dalam praktikum ini? Sebutkan dan jelaskan secara singkat!
5. Apa yang dimaksud dengan 'starter' dan apa pula fungsinya dalam praktikum ini?

ACARA II

PRODUKSI ASAM LAKTAT SECARA HOMOFERMENTATIF

Pendahuluan

Asam laktat merupakan produk fermentasi hasil aktivitas BAL yang menyebabkan turunnya pH dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Asam laktat merupakan asam lipofilik yang mampu menembus sel mikrobial dan pada pH intraseluler yang lebih tinggi berdisosiasi menghasilkan ion hidrogen dan mengganggu fungsi metabolik esensial seperti translokasi, substrat dan fosforilasi oksidatif, dengan demikian mereduksi pH intraseluler.

Sumber utama BAL berupa permukaan tanaman (sayuran), manure, dan produk-produk susu. Kemampuan BAL dalam memfermentasi gula menjadi asam laktat penting dalam pembuatan produk-produk fermentasi seperti fermentasi sayur-sayuran, fermentasi susu, dan fermentasi ikan.

Lactobacillus delbrueckii adalah salah satu bakteri kelompok BAL yang bersifat homofermentatif, mikroaerofilik, tidak memproduksi asam dari laktosa, bersifat katalase negatif, dan membutuhkan suhu optimum untuk pertumbuhan sekitar 45 °C. *Lactobacillus delbrueckii* biasanya terdapat pada sayuran dan buah-buahan.

Asam laktat bersifat higroskopis, berupa cairan sirup yang mempunyai rasa yang cukup masam. Asam laktat banyak digunakan sebagai bahan tambahan kimiawi pada minuman ringan, selai, *jelly*, produk permen, dan sirup, serta dalam dekalsifikasi penyamakan kulit.

Tujuan

- Mahasiswa mengetahui kurva pertumbuhan dan pola produksi asam oleh *Lactobacillus delbrueckii* yang ditumbuhkan pada medium diperkaya dan alami selama 4 hari inkubasi.
- Mahasiswa dapat membandingkan kurva pertumbuhan, pola produksi asam *L. delbrueckii* pada medium diperkaya dan medium alami.

Alat dan bahan

1. Biakan murni *Lactobacillus delbrueckii* umur 48 jam
2. Medium MRS
3. Medium alami (air kelapa + ekstrak taoge + ekstrak sawi)
4. Indikator BTB-NR (*Bromo Thymol Blue-Neutral Red*)
5. NaOH 0,1 N
6. pH-meter

Cara kerja

1. Untuk pembuatan medium alami dibuat dengan cara mencampurkan air kelapa : ekstrak taoge : ekstrak sawi dengan perbandingan 1:1:1, selanjutnya ditambahkan 60 g sukrosa kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
2. Untuk pembuatan ekstrak taoge atau ekstrak sawi dibuat dengan cara menimbang 200 g taoge atau sawi kemudian dimasukkan ke dalam 1 liter akuades lalu dipanaskan sampai mendidih, disaring dan diambil ekstraknya.
3. Kultur bakteri *Lactobacillus delbrueckii* sebanyak 1% diinokulasikan masing-masing ke medium MRS dan medium alami, kemudian diinkubasi pada suhu 45 °C selama 24 jam.
4. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH-meter (yang telah distandardisasi dengan larutan buffer standar dengan pH 4) ke dalam larutan sampel.
5. Pengukuran gula reduksi dilakukan dengan metode Nelson-Somogy.
6. Jumlah biomassa sel diketahui berdasarkan berat kering sel selama masa inkubasi dengan cara mengambil 10 ml sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Endapan hasil sentrifugasi disaring dan diletakkan dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya kemudian dikeringkan pada suhu 105 °C sampai diperoleh berat konstan. Cawan porselin berisi sel kering ditimbang. Berat kering sel diperoleh dari berat cawan porselin yang berisi sel kering dikurangi berat cawan porselin mula-mula.
7. Pengukuran kadar asam total dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 10 ml dan ditambahkan 3 tetes BTB-NR (*Bromo Thymol Blue-Neutral Red*) dalam etanol sebagai indikator lalu dititrasi dengan NaOH 0,1 N. Titrasi dihentikan apabila telah terjadi perubahan warna kuning menjadi kehijauan.
8. Kadar asam total yang dihasilkan dihitung dengan rumus:
Kadar Asam Total (%) = $\frac{\text{Volume NaOH (ml)} \times N \text{ NaOH} \times 9}{\text{Volume sampel (ml)}}$
9. Pengamatan untuk semua parameter dilakukan pada hari ke-0, 1, 2, 3, dan 4.

Pertanyaan

1. Apa yang Anda ketahui tentang *Lactobacillus delbrueckii*? Mengapa digunakan *L. delbrueckii* dalam praktikum ini?
2. Mengapa asam laktat penting? Apa manfaatnya di bidang industri?
3. Apa yang dimaksud dengan 'medium diperkaya' dan 'medium alami' dalam praktikum ini?
4. Apa manfaat air kelapa, ekstrak taoge, dan ekstrak sawi dalam medium-medium tersebut?
5. Apa fungsi BTB-NR dalam praktikum ini?

ACARA III

PRODUKSI ASAM SITRAT OLEH *ASPERGILLUS*

Pendahuluan

Asam sitrat diketahui sebagai senyawa alami tanaman maupun senyawa yang diproduksi oleh Fungi *filamentous*. Produksi asam sitrat pertama kali dilakukan dengan cara fermentasi menggunakan kultur mikrobial permukaan. Sebanyak 99 % kebutuhan dunia akan asam sitrat diproduksi secara mikrobiologis. Asam sitrat yang dikomersialkan dalam bentuk asam sitrat monohidrat atau asam sitrat anhidrat.

Banyak bidang industri yang membutuhkan asam sitrat. Sebanyak 60 % asam sitrat digunakan untuk industri makanan dan minuman, misal untuk meningkatkan *flavor* atau sebagai pengawet *juice* atau ekstrak buah, permen, *ice cream*. Industri farmasetika menggunakan Fe-sitrat sebagai sumber Fe atau asam sitrat digunakan untuk mengawetkan darah yang disimpan atau untuk preparasi kosmetik. Industri kimia memerlukan asam sitrat untuk senyawa *antifoam*, *softener* atau *treatment* untuk tekstil. Akhir-akhir ini baru dikembangkan penggunaan asam sitrat pada industri deterjen.

Beberapa mikrobial potensial yang umum digunakan untuk industri asam sitrat dari genus *Aspergillus*, contohnya: *A. niger*, *A. wentii*, dan *A. clavatus*.

Apabila dilihat dari biosintesisnya, asam sitrat merupakan produk metabolit primer yang dibentuk pada daur asam trikarboksilat atau daur Krebs. Glukosa merupakan sumber utama karbon yang digunakan untuk produksi asam sitrat. Pada banyak mikrobial, 80 % glukosa yang digunakan untuk biosintesis asam sitrat berasal dari reaksi Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) sedangkan 20 % dari daur pentosa-fosfat.

Produksi asam sitrat dapat dioptimasi dari medium yang digunakan, terutama menggunakan jenis karbohidrat sebagai sumber C dan energi, misalnya pati atau molase. Metode produksi yang banyak dilakukan yaitu dengan proses di bawah permukaan (*submerged processes*). Proses fermentasi akan berhenti setelah 8-14 hari.

Tujuan Praktikum

- a. Mahasiswa dapat mengamati pertumbuhan dan produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger*.

- b. Mahasiswa dapat menerapkan pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam sistem kultur sekali unduh.

Bahan & Alat

1. Starter *Aspergillus niger* yang telah diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam pada penggojog.
2. Dua (2) macam medium buatan yaitu:
 - a. Medium A: terdiri dari sukrosa 1,5 g/L, NH_4NO_3 2,5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, keasaman diatur dengan HCl 5N pada pH 3,4-3,5.
 - b. Medium B: terdiri dari tepung pisang 14% (b/v), NH_4NO_3 2,5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, keasaman diatur dengan HCl 5 N pada pH 3,4-3,5.
3. Erlenmeyer, shaker, oven, autoklaf, spektrofotometer, pipet, aluminium foil, timbangan analitik, dll.

Cara kerja

1. Starter dibuat dengan cara menambahkan 2 % (v/v) suspensi spora ke dalam medium, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam pada penggojog.
2. Suspensi spora dibuat dengan cara: biakan murni *Aspergillus niger* pada medium PDA (agar miring) umur 72 jam ditambah akuades steril sebanyak 10 ml, kemudian digojog sampai homogen sehingga dihasilkan suspensi spora.
3. Starter sebanyak 1 % dimasukkan ke dalam masing-masing medium (medium A dan medium B), selanjutnya diinkubasi selama 8 hari. Pada hari ke-0, 2, 4, 6, 8 diukur biomassa sel berdasarkan berat kering sel, kadar gula reduksi, pH dan kadar asam sitrat.
4. Pembuatan tepung pisang dengan cara: pisang dikukus, kemudian dikupas kulitnya. Daging buahnya diiris-iris dan dikeringkan dengan oven, kemudian diblender dan diayak sehingga dihasilkan tepung pisang.
5. Pengukuran kadar asam sitrat dilakukan dengan metode spektrofotometer. Pertama-tama, harus membuat kurva standar asam sitrat monohidrat terlebih dahulu untuk menentukan rumus persamaan regresi linier, selanjutnya mengukur asam sitrat sampel dengan menggunakan persamaan regresi linear yang telah dibuat.
6. Pembuatan kurva standar: disiapkan larutan standar asam sitrat monohidrat dengan konsentrasi 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, dan 1,75 mg/ml, larutan asam asetat anhidrat dan larutan piridin 5 %. Tabung reaksi disiapkan dan diisi dengan 5 ml asetat anhidrat + 1 ml larutan piridin + 1 ml larutan asam sitrat monohidrat standar, selanjutnya divortex sampai homogen. Blanko terdiri dari 5 ml asetat anhidrat + 1 ml larutan piridin + 1 ml akuades, dan divortex. Semua tabung selanjutnya dipanaskan selama 15 menit,

selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Konsentrasi sebagai sumbu x sedangkan nilai OD sebagai sumbu y, kemudian dibuat persamaan garis regresinya.

7. Persiapan sampel: sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian ditambah akuades sampai tanda. Tabung reaksi diisi dengan 5 ml asetat anhidrat + 1 ml larutan piridin + 1 ml sampel, divortex sampai homogen dan dipanaskan selama 15 menit. Setelah dingin diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Kadar asam sitrat dihitung berdasarkan persamaan garis yang diperoleh dari kurva standar.

Pertanyaan

1. Apa manfaat asam sitrat di bidang industri? Sebutkan contoh-contohnya!
2. Bagaimana mekanisme *Aspergillus niger* menghasilkan asam sitrat?
3. Sebutkan metode pengukuran asam sitrat dalam praktikum ini!
4. Apa yang Anda ketahui tentang 'sistem kultur sekali unduh' (*batch culture system*)!
5. Mengapa digunakan panjang gelombang 420 nm dalam mengukur absorbansi asam sitrat? Jelaskan!

ACARA IV

AKTIVITAS PENISILIN YANG DIHASILKAN OLEH *Penicillium chrysogenum*

Pendahuluan

Penisilin merupakan salah satu jenis *antibiotic broadspectrum* yang aktivitasnya terletak pada cincin beta laktam yang dikandungnya. Aktivitas penisilin terkait dengan efek bakterisida, yaitu mengganggu sintesis peptidoglikan dinding sel dengan cara mencegah digabungkannya asam N-asetilmuramat pada sintesis dinding sel. Penisilin alami bersifat labil pada kondisi asam dan akan bersifat in-aktif apabila kehilangan cincin beta laktam.

Beberapa mikroorganisme yang dapat memproduksi penisilin berasal dari kelompok genus *Penicillium* dan *Streptomyces*. Beberapa contoh jenis *Penicillium* yang potensial menghasilkan penisilin adalah *P. notatum* dan *P. chrysogenum*.

Banyak jenis penisilin yang dihasilkan oleh *P. chrysogenum* efektif melawan bakteri Gram positif jenis *Staphylococcus*, *Bacillus*, dan *Clostridium*, serta beberapa jenis penisilin yang lain dapat menghambat bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* sp, dan *Proteus* sp.

Produksi penisilin oleh *P. chrysogenum* terjadi selama fase stasioner. Menurut Crueger & Crueger (1990), 0-40 jam setelah inokulasi, *P. chrysogenum* akan melakukan pertumbuhan untuk membentuk biomasa selnya, selanjutnya akan membentuk penisilin sampai 140 jam inkubasi. Pola ini tentu saja sangat dipengaruhi oleh nutrisi yang terdapat pada medium pertumbuhannya, suhu, pH, aerasi, dan agitasi selama pertumbuhan kultur.

Menurut Madigan dkk., (2000), pengukuran aktivitas antimikrobia dapat dilakukan dengan metode MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) maupun metode difusi agar. Nilai MIC ditentukan dari kadar minimum antimikrobia yang dapat menghambat pertumbuhan mikrobia. Nilai MIC tidak konstan karena tergantung dari sifat alami mikrobia uji, ukuran inokulum, komposisi medium kultur, waktu inkubasi dan kondisi inkubasi, seperti suhu, pH, aerasi. Adapun aktivitas antibiotik menggunakan metode difusi agar ditentukan dengan cara mengukur luas zona hambat yang dibentuk terhadap pertumbuhan mikrobia uji.

Tujuan Praktikum

- a. Mahasiswa mengetahui pola pertumbuhan dan aktivitas penisilin oleh *P. chrysogenum* selama waktu inkubasi.
- b. Mahasiswa dapat mengukur aktivitas penisilin berdasarkan luas zona hambat yang terbentuk terhadap pertumbuhan mikrobia uji.

Alat dan Bahan

Kultur *P. chrysogenum* umur 3 hari pada medium PDA miring yang diinkubasi pada suhu 30 °C, *Potato Dextrosa Broth* (PDB), NH_4NO_3 , akuades, reagen Nelson, glukosa standar. Alat yang diperlukan timbangan analitik, petridish, pH-meter, Erlenmeyer, spektrofotometer, autoklaf, *laminair air flow*, susunan/*paper disc*, dll.

Cara Kerja

1. Starter dibuat dengan cara: medium PDB diinokulasi dengan suspensi spora *P. chrysogenum* sebanyak 5 %, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C dalam *rotary shaker* selama 24 jam inkubasi. Suspensi spora dibuat dengan cara menambahkan akuades steril sebanyak 9 ml ke dalam kultur *P. chrysogenum* yang ditumbuhkan pada medium PDA miring, selanjutnya digojog beberapa kali sampai homogen.
2. Medium PDB dibuat dengan cara: 300 gr kentang dipotong-potong kecil kemudian ditambah akuades sebanyak 1000 ml. Bahan dipanaskan sampai mendidih selanjutnya disaring. Ekstrak diambil sebanyak 500 ml, ditambah 10 g dextrosa dan NH_4NO_3 sebanyak 1 %. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit.
3. Produksi penisilin dilakukan dengan cara: 5 % starter diinokulasikan ke medium PDB secara aseptis, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C dalam *shaker incubator* selama 6 hari inkubasi.
4. Parameter yang diukur meliputi biomasa sel berdasarkan berat kering sel, pH dengan pH-meter yang sudah distandardisasi, gula reduksi dengan metode Nelson-Somogyi, dan aktivitas penisilin yang dihasilkan. Semua parameter ini diukur pada hari ke-0, 2, 4, dan 6.
5. Pengukuran zona hambat digunakan metode difusi agar dengan mikrobia uji *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (bakteri Gram positif).
6. Metode difusi agar dilakukan dengan sumuran, yaitu dengan cara:
 - a. Mikrobia uji dimasukkan ke dalam *petridish* selanjutnya dimasukkan medium NA yang telah dicairkan (suhu suam-suam kuku).
 - b. Sebelum medium memadat, ditanam sumuran yang terbuat dari gelas yang sudah disterilkan terlebih dahulu secara tegak. Disisi lain dipersiapkan supernatan dari

kultur *P. chrysogenum*, dengan cara kultur disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Pelet yang diperoleh digunakan untuk menghitung biomasa sel sedangkan supernatan digunakan untuk mengukur zona hambat.

- c. Setelah medium padat, diambil 50 μ l supernatan yang berasal dari kultur *P. chrysogenum* dan dimasukkan ke dalam sumuran, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah 24 jam, diamati dan dihitung luas zona hambat yang terbentuk. Pengukuran zona hambat menggunakan rumus:

$$L = \frac{\pi (d_2 - d_1)^2}{2}$$

Keterangan:

L = luas zona hambat

π = 3,14

d_1 = diameter sumuran

d_2 = diameter zona hambat

Pertanyaan

1. Mengapa dipilih *P. chrysogenum* dalam praktikum ini? Apa 'keistimewaan' jenis ini? Jelaskan!
2. Faktor-faktor apa yang berpengaruh terhadap produksi penisilin? Sebutkan dan jelaskan!
3. Apa yang dimaksud MIC dan faktor apa saja yang memengaruhi pengukuran MIC?
4. Apa yang Anda ketahui tentang 'metode difusi agar' dan 'metode sumuran'? Jelaskan!
5. Bagaimana cara/metode pengukuran zona hambat dalam praktikum ini? Jelaskan!

DAFTAR BACAAN

- Madigan, M. T., Matinko, J. M., dan Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Ninth edition. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Mursyanti, E. 2000. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Industri*. Edisi 2. Laboratorium Teknobiologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Okafor, N. 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Science Publishers. Enfield, New Hampshire. 530 halaman.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C.S. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Schlegel, H. G. dan Karin, S. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM Press. Yogyakarta.
- Volk, W. A. dan Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Penerbit PT Erlangga, Jakarta.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., dan Higton, G. 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science Ltd., Oxford. 288 halaman.

LAMPIRAN



LABORATORIUM TEKNOBIO-INDUSTRI, PROGRAM STUDI BIOLOGI,
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI

UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA – Jl. Babarsari 44, Yogyakarta 55281

Jadwal Kegiatan Praktikum Mikrobiologi-Industri

No	Hari, Tanggal*	Topik	Kegiatan	Keterangan
1		Koordinasi Pengampu, Asisten, dan staf laboratorium	Persiapan Awal	Koord. Prak. dan Staf Lab.
2		Tata tertib, Keamanan Laboratorium, Penjelasan Kegiatan Praktikum, Pembagian Kelompok (Proyek praktikum kelompok)	Asistensi Umum, Acara I	Koord. Prak. dan Asisten
3		Finalisasi proyek praktikum kelompok: Diskusi dan Presentasi Proyek I	Acara II	Koord. Prak. dan Asisten
4		Finalisasi proyek praktikum kelompok: Diskusi dan Presentasi Proyek II	Acara II (lanjutan)	Koord. Prak. dan Asisten
5		Finalisasi proyek praktikum kelompok: Diskusi dan Presentasi Proyek III	Acara II (lanjutan)	Koord. Prak. dan Asisten
6		Uji Kemurnian mikrobial Pola Pertumbuhan mikrobial (24 jam)	Acara III – VIII	Koord. Prak. dan Asisten
7		Penyelesaian Laporan Praktikum I	Acara IX	Koord. Prak. dan Asisten
8		Responsi 1	Acara X	Koord. Prak. dan Asisten
9		UTS		
10				
11		Persiapan dan pelaksanaan Proyek	Acara XI	Koord. Prak. dan Asisten
12		Pelaksanaan Proyek Praktikum Kelompok I	Acara XII	Koord. Prak. dan Asisten
13		Pelaksanaan Proyek Praktikum Kelompok II	Acara XII (lanjutan)	Koord. Prak. dan Asisten
14		Pelaksanaan Proyek Praktikum Kelompok III	Acara XII (lanjutan)	Koord. Prak. dan Asisten
14		Diskusi dan Pembuatan Laporan Praktikum	Acara XIII	Koord. Prak. dan Asisten

No	Hari, Tanggal*	Topik	Kegiatan	Keterangan
15		Pengumpulan dan Pengesahan Laporan Praktikum	Acara XIII (lanjutan)	Koord. Prak. dan Asisten
16		Responsi 2	Acara XIV	Koord. Prak. dan Asisten
17		UAS		
18				

Catatan:

*Hari dan tanggal menyesuaikan Tahun Akademik yang berlaku

- a. 1 SKS Praktikum = 170 menit kegiatan psikomotorik di laboratorium, meliputi kegiatan praktikum dan pembuatan laporan praktikum
- b. Perkiraan pemakaian waktu: 120 menit untuk kegiatan praktikum/eksperimen dan 40 menit untuk membuat laporan praktikum serta 10 menit untuk membersihkan laboratorium

PRAKTIKUM TEKNOLOGI OBAT TRADISIONAL

**Drs. P. Kianto Atmodjo, MSi
Ines Septi Arsiningtyas Ph.D., Apt**

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Mahasiswa siap 15 menit sebelum praktikum mulai dan telah menyiapkan agenda kerja.
2. Mahasiswa wajib menggunakan jas laboratorium dan menunjukkan agenda kerja ketika masuk ke dalam laboratorium.
3. Mahasiswa yang terlambat harus meminta ijin kepada koordinator.
4. Tidak ada inhal praktikum.
5. Selama praktikum, mahasiswa tidak boleh merokok dan bergurau.
6. Mahasiswa harus serius dalam melaksanakan praktikum. Asisten berhak menegur atau mengeluarkan praktikan yang tidak serius dan mengganggu praktikum.
7. Pada saat praktikum, mahasiswa dikelompokkan 4-5 orang per kelompok, disesuaikan banyaknya praktikan dan kegiatan praktikum.
8. Mahasiswa yang memecahkan, merusak alat atau menumpahkan bahan harus mengganti alat/bahan yang sama atau uang seharga alat/bahan jika tidak ada.
9. Setiap praktikum akan diawali atau diakhiri dengan tes (pretest atau posttest).
10. Pengamatan yang dilakukan di luar waktu praktikum harus sepengetahuan asisten (janjian waktu).
11. Setelah melakukan praktikum, mahasiswa wajib membersihkan alat-alat dan meja kerja yang digunakan.
12. Setelah melakukan praktikum mahasiswa harus membuat laporan dan dikumpulkan sesuai jadwal yang ditentukan.
13. Di akhir praktikum, mahasiswa harus mengikuti ujian praktikum (responsi).
14. Nilai akhir praktikum (NAP) dihitung berdasarkan komposisi sebagai berikut :

Responsi	: 35%
Laporan	: 40%
Pre/Post Test	: 10%
Aktivitas	: 15%
15. Hal yang belum diatur pada tata tertib ini akan diatur kemudian.

DAFTAR ISI

TATA TERTIB PRAKTIKUM	iii
DAFTAR ISI	v
ACARA 1 Pengenalan Tumbuhan Herbal	21
ACARA 2 Pengolahan Pasca Panen: Pengeringan dan Penyerbukan	27
ACARA 3 Penyarian (Ekstraksi)	29
ACARA 4 Identifikasi Zat Aktif (Uji Fitokimia)	31
ACARA 5 Uji Antioksidan	35
ACARA 6 Pembuatan Jamu dan Pengujian Angka Kapang Khamir	37
ACARA 7 Pembuatan Produk Sediaan Farmasi	39
DAFTAR PUSTAKA	41

ACARA 1

PENGENALAN TUMBUHAN HERBAL

Sejak jaman dahulu, secara turun temurun dan berdasarkan kepercayaan, manusia telah memanfaatkan tumbuhan untuk mengobati berbagai macam penyakit. Kebanyakan tumbuhan yang digunakan adalah herba (tumbuhan berdaun lebar, yang hidup di bawah naungan) terutama kunyit, jahe, kencur, dan temulawak. Dalam perkembangannya semua obat yang berasal dari tumbuhan disebut dengan herbal.

Pemanfaatan herbal tidak hanya untuk pengobatan, namun juga untuk bumbu masak (misal kelompok empon-empon dan rempah-rempah), pengobatan (misal sirih untuk mimisan dan temulawak untuk hepatitis), kebugaran (misal jahe, ginseng), kosmetika (serai untuk sabun), dan untuk mengurangi pencemaran lingkungan (tumbuhan lidah mertua), bahkan untuk menangkal pengaruh buruk atau hawa negatif (misal dlingo dan bengle). Herba yang digunakan ada yang hanya organ tertentu seperti akar (misal jahe, kunyit, alang-alang dan ginseng), batang (misal kayu manis dan secang), daun (misal katuk, brotowali, sirih, dan sambiloto), bunga (misal rosella, mawar dan melati), buah (misal kapulaga dan cengkih) dan biji (misal padi hitam dan mahoni), namun ada juga yang menggunakan keseluruhan tubuh tumbuhan.

Setiap jenis herba memiliki persamaan dan perbedaan manfaat, ada yang memiliki manfaat khusus, tetapi ada juga yang banyak manfaatnya. Manfaat herba ditentukan kandungan zat aktif yang dimiliki. Selain itu, zat aktif ini juga menentukan cita rasa, warna dan aroma yang khas, sehingga dapat digunakan untuk identifikasi jenis herba tersebut. Pengenalan akan ciri-ciri herbal dari bentuk (individu atau organ), aroma, warna dan lain-lain sangat diperlukan agar tidak salah dalam membuat ramuan, sehingga tujuan penggunaan herbal akan tercapai (Dalimartha, 1999).

ACARA 1A. PENGENALAN TUMBUHAN HERBAL BERDASARKAN ORGAN DAUN

A. Tujuan

1. Mengenal ciri-ciri tumbuhan herbal berdasarkan bentuk fisik dan orgaoleptik.
2. Mampu mengidentifikasi herbal tertentu berdasarkan aroma.
3. Mampu mentabulasikan ciri khas tumbuhan herbal berdasarkan organ daun.

B. Bahan dan Alat

1. Selaginella, Marchantia, Ustilago
2. Daun = Pandan, Katuk, Pepaya, Sera, Salam, Sambiloto, Brotowali, Keji beling, Kamboja kuning
3. Panci non-aluminium, kompor listrik, saringan

C. Cara Kerja

• Pengenalandan Tabulasi Ciri Tumbuhan Herbal

1. Amati spesimen berupa tumbuhan utuh atau organ.
2. Gambarlah spesimen tersebut dan berilah keterangan bagian-bagiannya.
3. Setelah itu, setiap spesimen diuji organoleptik berupa bau/aroma dan rasa dengan cara mencium atau mengecap secara langsung.
4. Panaskan 500 ml air kemudian masukkan salah satu daun sesuai petunjuk asisten.
5. Panaskan terus dengan api sedang, sampai air tersisa kurang lebih separo.
6. Catat aroma, warna, dan rasanya.
7. Buatlah tabulasi yang menunjukkan ciri khas tumbuhan herbal.

• Identifikasi Tumbuhan Herbal Tertentu Berdasarkan Cita Rasa

1. Disediakan lima macam spesimen berupa cairan.
2. Setiap praktikan diminta mencium aroma, rasa dan warna.
3. Sebutkan apa nama jenis herbal tersebut.

D. Laporan

1. Deskripsikan dan buatlah klasifikasinya secara lengkap tumbuhan herbal tersebut berdasarkan buku Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Tumbuhan Berguna Indonesia, Flora of Java atau buku yang lain yang relevan.
2. Tuliskan zat aktif dan kegunaan dari tumbuhan herbal tersebut dalam kehidupan sehari-hari.

ACARA 1B. PENGENALAN TUMBUHAN HERBAL BERDASARKAN ORGAN AKAR (RHIZOMA) DAN BATANG

A. Tujuan :

1. Mengenal ciri-ciri tumbuhan herbal berdasarkan bentuk fisik dan organoleptik organ akar dan batang
2. Mampu mentabulasikan ciri khas tumbuhan herbal berdasarkan organ akar dan batang
3. Mampu mengidentifikasi herbal tertentu berdasarkan cita rasa

B. Bahan dan Alat

1. Akar = Alang-alang
2. Rhizoma/Umbi = Jahe, Kencur, Temulawak, Kunyit, Temu Mangga, Temu Putih, Dlingo, Bengle
3. Batang/Kulit Kayu = Secang, Kayu Manis, Pule
4. Kompur, Panci non aluminium, Blender, Saringan, Parutan

C. Cara Kerja

• Pengenalan dan Tabulasi Ciri Tumbuhan Herbal

1. Amati spesimen berupa akar, rhizome, dan kulit batang.
2. Gambarlah spesimen tersebut dan berilah keterangan bagian-bagiannya.
3. Setelah itu, setiap spesimen diuji organoleptik berupa bau/aroma dan rasa dengan cara mencium atau mengecap secara langsung.
4. Panaskan 500 ml air kemudian masukkan salah satu daun sesuai petunjuk asisten.
8. Panaskan terus dengan api sedang, sampai air tersisa kurang lebih separo.
9. Catat aroma, warna, dan rasanya.
10. Kupaslah dua macam rhizome, kemudian diparut, diperas dan diambil airnya. Rasakan rasa, bau, dan panas yang dihasilkan.
11. Buatlah tabulasi yang menunjukkan ciri khas tumbuhan herbal.

• Identifikasi Tumbuhan Herbal Tertentu Berdasarkan Cita Rasa

1. Disediakan lima macam spesimen berupa cairan.
2. Setiap praktikan diminta mencium aroma, rasa dan warna.
3. Sebutkan apa nama jenis herbal tersebut.

E. Laporan

1. Deskripsikan dan buatlah klasifikasinya secara lengkap tumbuhan herbal tersebut berdasarkan buku Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Tumbuhan Berguna Indonesia, Flora of Java atau buku yang lain yang relevan.
2. Tuliskan zat aktif dan kegunaan dari tumbuhan herbal tersebut dalam kehidupan sehari-hari.

ACARA 1C. PENGENALAN TUMBUHAN HERBAL BERDASARKAN ORGAN BUNGA DAN BUAH

A. Tujuan :

1. Mengetahui ciri-ciri tumbuhan herbal berdasarkan bentuk fisik dan organoleptik bunga dan buah.
2. Mampu mentabulasikan ciri khas tumbuhan herbal berdasarkan organ bunga dan buah.
3. Mampu mengidentifikasi herbal tertentu berdasarkan cita rasa.

B. Bahan dan Alat

1. Bunga = Cengkeh, Kapulaga, Pekak, Rosela, Ceplok Piring, Melati, dan Mawar
2. Buah = Jeruk nipis, Makota Dewa, Delima
3. Biji = Beras Hitam dan Beras Merah, Merica, Mahoni
4. Kompor, Panci lurik/stainless steel, Saringan, Pengaduk

C. Cara Kerja

• Pengenalan dan Tabulasi Ciri Tumbuhan Herbal

1. Amati spesimen berupa bunga, buah, dan biji.
2. Gambarlah spesimen tersebut dan berilah keterangan bagian-bagiannya.
3. Setelah itu, setiap spesimen diuji organoleptik berupa bau/aroma dan rasa dengan cara mencium atau mengecap secara langsung.
4. Panaskan 500 ml air kemudian masukkan salah satu daun sesuai petunjuk asisten.
5. Panaskan terus dengan api sedang, sampai air tersisa kurang lebih separo.
6. Catat aroma, warna, dan rasanya.
7. Buatlah tabulasi yang menunjukkan ciri khas tumbuhan herbal.

- **Identifikasi Tumbuhan Herbal Tertentu Berdasarkan Cita Rasa**

1. Disediakan lima macam spesimen berupa cairan.
2. Setiap praktikan diminta mencium aroma, rasa dan warna.
3. Sebutkan apa nama jenis herbal tersebut.

F. Laporan

1. Deskripsikan dan buatlah klasifikasinya secara lengkap tumbuhan herbal tersebut berdasarkan buku Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Tumbuhan Berguna Indonesia, Flora of Java atau buku yang lain yang relevan.
2. Tuliskan zat aktif dan kegunaan dari tumbuhan herbal tersebut dalam kehidupan sehari-hari.

ACARA 2

PENGOLAHAN PASCA PANEN: PENGERINGAN DAN PENYERBUKAN

Jaminan mutu obat tradisional sangat dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain adalah standar dan metode budidaya serta teknologi pasca panen. Mutu simplisia umumnya kurang memenuhi persyaratan karena penanganan pasca panen yang kurang tepat serta terbatasnya ilmu pengetahuan dan teknologi.

Prosedur standar pengolahan tanaman obat menjadi simplisia bertujuan untuk memenuhi persyaratan simplisia sebagai bahan baku obat tradisional, terutama untuk menjamin keseragaman senyawa aktif, keamanan, dan khasiat sediaan akhir. Tahapan pembuatan simplisia adalah sebagai berikut:

1. Pengumpulan bahan baku, meliputi bagian tanaman dan umur tanaman yang digunakan
2. Sortasi basah, dilakukan pada bahan segar dengan cara memisahkan kotoran dan / atau bahan asing saat pengumpulan.
3. Pencucian, berfungsi untuk menurunkan jumlah mikroba yang menyebabkan pembusukan dan membuat penampilan fisik simplisia lebih menarik.
4. Perajangan (pengubahan bentuk), diperlukan untuk memudahkan kegiatan pengeringan, pengemasan, penggilingan dan penyimpanan serta pengolahan selanjutnya.
5. Pengeringan, dilakukan untuk menghentikan reaksi enzimatis yang menjadi salah satu penyebab kerusakan simplisia. Pengeringan dapat dilakukan dengan cara pengeringan secara alamiah (di bawah sinar matahari dan tempat teduh) dan pengeringan secara buatan.
6. Sortasi kering dilakukan saat bahan simplisia telah kering sebelum dikemas.
7. Pengemasan, dilakukan untuk melindungi simplisia saat pengangkutan, distribusi dan penyimpanan, dari gangguan luar.
8. Penyimpanan, dilakukan bila simplisia secara kuantitatif melebihi kebutuhan serta untuk memenuhi jangka panjang.

Pengolahan pasca panen dilakukan berbeda terhadap jenis simplisia yang ada karena sifat yang dimiliki berbeda-beda pula. Maka, sebagai pembuat simplisia, diharapkan dapat

mengenali karakteristik bagian tanaman yang digunakan, dan dapat membuat simplisia yang baik dan benar.

A. Tujuan

Mampu membuat simplisia tanaman obat secara benar dan sederhana.

B. Alat dan Bahan

Spesimen (daun, rimpang, akar, buah, biji), oven, kain hitam, cawan

C. Cara Kerja

• **PENGERINGAN**

1. Spesimen dibersihkan dari kotoran dan diseleksi. Bagian yang rusak atau busuk dibuang.
2. Sampel dicuci.
3. Sampel yang tebal dan berdaging seperti rimpang dipotong seperti ceriping ketela.
4. Timbang sampel.
5. Tata sampel pada tempat yang tahan kering dan tidak lengket. Tata sedemikian sehingga tidak tumpang tindih dan diperkirakan memperoleh panas yang sama.
6. Masukkan ke pengering oven dan atur suhunya 50-60°C (suhu pemanasan tergantung jenis bahan dan zat aktif).
7. Setiap 24 jam, bahan ditimbang dan dibalik. Sebelum ditimbang, spesimen didinginkan terlebih dahulu di dalam eksikator selama 10-15 menit. Apabila selisih penimbangan sudah tidak ada (berat sudah konstan), maka spesimen dibungkus rapat menggunakan kertas atau plastik.
8. Ulangi langkah kerja no. 6-7 dengan cara pengeringan yang lain yaitu dengan memanaskan di bawah sinar matahari. Sampel diberi 2 macam perlakuan yaitu ditutup kain hitam dan tanpa ditutup.
9. Setiap 3-4 jam, spesimen dibalik agar pengeringan merata dan cepat. Bahan ditimbang setiap 24 jam hingga beratnya konstan

• **PENYERBUKAN :**

1. Bahan yang sudah kering dan ukurannya besar diperkecil/dipotong.
2. Tumbuklah bahan tersebut sampai halus. Penyerbukan juga dapat dilakukan menggunakan blender.
3. Bahan diayak dengan ukuran 40, 60 dan 80 dan 100 mesh.
4. Serbuk disimpan dalam kantung plastik atau stoples.

ACARA 3

PENYARIAN (EKSTRAKSI)

Sediaan galenik adalah sediaan hasil pemisahan fisik atau penyarian atau ekstraksi dari tumbuhan atau hewan. Sediaan galenik dapat berupa padatan, cairan dan gas atau kombinasi ketiga bentuk tersebut. Pemisahan fisik dilakukan dengan pemecahan bahan, pengepresan/ditekan, penyaringan bertekanan, dan penguapan (destilasi). Contoh sediaan galenik adalah minyak kelapa (VCO), minyak kayu putih dan minyak herba lainnya.

Penyarian adalah pemisahan suatu zat yang terlarut dalam dua pelarut yang tidak campur. Penyarian yang umum dilakukan menggunakan zat pelarut (polar/non polar) untuk menarik senyawa aktif yang dikehendaki. Zat pelarut yang digunakan dapat tunggal maupun majemuk (campuran). Selain itu dapat juga sekali penyarian maupun secara berulang (disarikan berulang menggunakan penyari sama) atau bertingkat (menggunakan penyari yang berbeda tingkat polaritas atau pH-nya beda). Penyarian menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan atau tanpa pemanasan (baik api besar atau api kecil). Zat yang akan disarikan dapat dibungkus atau tanpa dibungkus. Zat yang disarikan akan terdistribusi merata pada pelarut yang digunakan mengikuti hukum distribusi (Sudjadi, 1988).

Metode ekstraksi dikelompokkan menjadi dua yaitu ekstraksi sederhana dan khusus. Ekstraksi sederhana meliputi metode maserasi, infundasi, perkolasi, evakolasi, dan dialokasi. Metode ekstraksi khusus meliputi sokhletasi, refluks, dan ultrasonik (Harborne, 1987). Maserasi adalah metode ekstraksi dengan caramerendam bahan dalam pelarut untuk waktu tertentu. Metode ini digunakan untuk ekstraksi zat aktif yang tidak tahan panas. Maserasi merupakan metode yang mudah, sederhana, dan tidak membutuhkan peralatan rumit (Yuningsih, 2007).

A. Tujuan

Mahasiswa mampu melakukan penyarian.

B. Alat dan Bahan

1. Daun katuk, andong, suji, kunyit, jahe, daun tembakau, kelapa
2. Petroleum eter, asam klorida, aquadest, aseton
3. Ekstraktor, labu pemisah

C. Cara Kerja

• PENYARIAN MENGGUNAKAN AIR

1. Bahan 200 g daun atau rimpang ditumbuk halus
2. Tambahkan air 400 ml
3. Diremas-remas
4. Diperas dan disaring
5. Diamkan satu malam atau disentrifuge pada kec 3000 rpm selama waktu 15 menit sampai terbentuk endapan.
6. Disaring dan cairan beningnya disimpan

• PENYARIAN MENGGUNAKAN PELARUT ORGANIK (MASERASI)

1. Bubuk sampel sebanyak 1 g dimasukkan ke erlenmeyer 50 ml.
2. Tambahkan NaOH 20% sebanyak 1 ml, aduk sampai rata.
3. Tambahkan 20 ml Petroleum eter/alkohol/aseton.
4. Diamkan selama 2 jam.
5. Ambil menggunakan pipet 10 ml dan saring dengan kertas saring. Filtrat dimasukkan dalam erlenmeyer 25 ml diuapkan sampai tersisa 1-2 ml dalam *waterbath* suhu sedang.
6. Zat berwarna coklat yang tersisa adalah alkaloid nikotin/kurkumin/klorofil (untuk menghasilkan ekstrak yang banyak dapat dilakukan berulang atau diperbesar sampel dan volumenya; selain itu ampas dapat diekstrak berulang dgn zat yang sama atau berbeda untuk memperoleh senyawa lain).
7. Filtrat ini dapat ditentukan kandungan senyawa secara kualitatif maupun kuantitatif.

ACARA 4

IDENTIFIKASI ZAT AKTIF (UJI FITOKIMIA)

Fitokimia adalah ilmu yang mempelajari kandungan senyawa kimia atau senyawa bahan alami tumbuhan. Senyawa bahan alami pada tumbuhan ada yang memiliki khasiat tertentu, misal sebagai antioksidan, antiaging, antimikroba, dan lain-lain disebut sebagai senyawa aktif. Senyawa aktif ini disintesis melalui metabolisme primer dan sekunder, namun umumnya merupakan bagian dari metabolisme sekunder yang hanya dilakukan oleh tumbuhan tertentu dalam kondisi yang ekstrem, untuk proteksi, penyembuhan luka, maupun penyebaran (menarik serangga untuk penyerbukan). Metabolit sekunder ada beraneka ragam, yang dapat dikelompokkan menjadi senyawa alkaloida, fenol, tannin, flavonoid dan terpenoida.

Alkaloid adalah sebuah golongan senyawa basa bernitrogen yang kebanyakan heterosiklik dan terdapat di tumbuhan (tetapi ini tidak mengecualikan senyawa yang berasal dari hewan). Senyawa fenol atau polifenol merupakan senyawa yang memiliki banyak gugus fenol, dan sering dalam bentuk glikosida polar sehingga mudah larut dalam pelarut polar. Senyawa ini memberikan warna pada tumbuhan. Polifenol berperan sebagai antioksidan dan menetralkan radikal bebas dalam tubuh (Arnelia, 2002).

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol. Senyawa ini banyak turunannya diantaranya adalah kalkan, katekin, flavon, flavonol, antosianidin, dan auron (Middleton dan Chitan, 1994). Senyawa ini merupakan prekursor senyawa toksik dan memiliki aktivitas antioksidan, antiserangga, dan antimikrobia (Harborne, 1996; Middleton dkk 1998).

Tannin termasuk senyawa polifenol dengan berat molekul 0,5-3 Kd. Zat ini mampu mengendapkan protein, larut dalam air, berwarna tertentu dan khas setiap jenis tannin. Tannin biasanya merah gelap-coklat (Deaville dkk., 2010; Ahadi, 2003).

A. Tujuan

1. Mahasiswa mampu mengenali alkaloid, fenol dan flavonoid secara kualitatif.
2. Mahasiswa mampu mengenali zat aktif menggunakan kromatografi.
3. Mahasiswa mampu mengisolasi dan meyarikan suatu zat menggunakan metode maserasi satu zat pelarut.

B. Alat dan bahan

1. Sampel dari percobaan sebelumnya (jika pekat dapat diencerkan).
2. Alkaloid, fenol, flavonoid
3. HPLC/KLT, alkaloid kit, flavonoid kit, fenol kit
4. Erlenmeyer 50 ml, petroleum eter, alkohol 95%, serbuk daun tembakau, NaOH 20%

C. Cara Kerja

• IDENTIFIKASI FITOKIMIA SECARA KUALITATIF

1. Uji Alkaloid

Sampel tanaman sebanyak 30 mg ditambah 10 ml kloroform dan 6 tetes amoniak, kemudian disaring ke dalam tabung reaksi. Filtrat ditambahkan 3-5 tetes asam sulfat 2 M dan dikocok sehingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam (yang bagian atas) dimasukkan ke tabung reaksi lain (tiga tabung) menggunakan pipet lalu ditambahkan 1 pipet pereaksi Dragendorff (tabung 1), pereaksi Meyer (tabung 2), pereaksi Wagner (tabung 3). Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat pada pereaksi Dragendorff, endapan putih dengan peraksi Meyer, dan endapan coklat dengan pereaksi Wagner.

2. Uji Saponin

Sampel/ekstrak tanaman sebanyak 30 mg diekstraksi menggunakan 5 ml dietil eter sebanyak 3 kali. Dari fraksi ekstrak tersebut, dihasilkan fraksi yang larut dalam dietil eter dan yang tidak larut dalam dietil eter. Fraksi yang tidak larut dalam dietil eter kemudian ditambahkan air sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi dan dikocok. Ekstrak dinyatakan positif mengandung saponin apabila terdapat busa dengan ketinggian 1-3 cm yang bertahan selama 15 menit.

3. Uji Flavonoid

Sampel/ekstrak sebanyak 30 mg ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan HCl pekat kemudian dikocok kuat-kuat. Positif flavonoid dinyatakan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga.

Atau (cara lain) : ekstrak sebanyak 0,1 g ditambah 5 ml methanol 30% kemudian dipanaskan 5 menit. Filtrat ditambah asam sulfat, bila terbentuk warna merah berarti positif ada flavonoid.

4. Uji Triterpenoid/Steroid

Ekstrak tanaman sebanyak 2 g ditambah 25 ml etanol 30% lalu dipanaskan dan disaring. Filtratnya diuapkan kemudian ditambahkan eter. Lapisan eter ditambahkan pereaksi Liebermen Burchard (3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes

asam sulfat pekat).Warna merah atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid dan warna hijau menunjukkan adanya steroid.

5. Uji Tannin

Ekstrak tanaman sebanyak 10 g ditambahkan air kemudian didihkan selama beberapa menit.Lalu disaring dan filtratnya ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1% (b/v).Warna biru atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin.

ACARA 5

UJI ANTIOKSIDAN

Tujuan: Mahasiswa dapat melakukan uji antioksidan

Pendahuluan:

Daya antioksidan menjadi potensi yang bisa dikembangkan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat digunakan untuk melindungi komponen biologi seperti lipida, protein, vitamin, dan DNA melalui perlambatan kerusakan, ketengikan, atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi radikal bebas.

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai electron tidak berpasangan, sifat sangat reaktif dan aktivitas tidak beratur untuk mendapatkan pasangan elektronnya dan menimbulkan kerusakan pada bagian-bagian sel dalam tubuh.

Cara Kerja:

Bahan: teh celup

Metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan mudah untuk penapisan aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa, selain itu terbukti akurat, efektif dan praktis (Molyneux, 2003).

Antioksidan standar asam askorbat digunakan sebagai pembanding dibuat dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 ppm. Larutan ekstrak dan antioksidan pembanding asam askorbat yang telah dibuat, masing-masing sebanyak 2,5 mL direaksikan dengan 2,5 mL larutan DPPH 1 mM dalam tabung reaksi. Sedangkan larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 2,5 mL methanol dengan 2,5 mL larutan DPPH 1 mM. Semua campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan terlindungi dari cahaya matahari. Kemudian, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

Perhitungan AEAC menggunakan rumus berikut:

Persentase penghambatan radikal bebas (persen inhibisi) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\%inhibisi = \frac{absblanko - absample}{absblanko} \times 100$$

ACARA 6

PEMBUATAN JAMU DAN PENGUJIAN ANGKA KAPANG KHAMIR

Tujuan: Mahasiswa dapat membuat jamu secara sederhana dan Mahasiswa mampu menetapkan angka kapang khamir dalam obat tradisional

Pendahuluan

Jamu adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan bahan hewan, bahan mineral, sediaan galenik atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman.

Seperti produk makanan, sediaan obat tradisional umumnya mengandung bahan nabati yang sensitif terhadap bahaya mikrobiologis, salah satunya adalah terdapatnya cemaran kapang dan khamir pada beberapa produk jamu di pasaran. Kapang dan khamir tersebut dapat menimbulkan efek toksik bagi konsumen (Lestari, 1986).

Jumlah kapang (jamur) dan khamir yang besar, menunjukkan kemunduran dari mutu obat tradisional. Kapang dan khamir akan berkembang biak bila tempat tumbuhnya cocok untuk pertumbuhan. Di samping itu kapang tertentu ada yang menghasilkan zat racun (toksin) seperti jamur *Aspergillus flavus* dapat menghasilkan aflatoksin.

Angka kapang khamir adalah bilangan yang menunjukkan jumlah koloni jamur yang meliputi kapang (jamur multiseluler) dan khamir (jamur uniseluler) per gram/ml sampel yang dihitung dengan mengalikan koloni jamur yang tumbuh pada media nutrisi dengan faktor pengenceran yang digunakan setelah diinkubasi selama 3-5 hari pada suhu 20-25 °C.

Cara Kerja:

Pembuatan jamu

Bahan: Kunyit dan Asam

Pembuatan:

1. Simplisia dipotong ukuran kecil
2. Dikeringkan dengan oven

3. Diblender
4. Disaring
5. Ditambahkan dengan bahan yang lain

Pengujian angka kapang khamir

A. Alat dan Bahan

Bahan : Serbuk jamu, desinfektan alcohol 70%, Potato Dextrose Agar (PDA) Kentang. $\frac{1}{4}$ kg, Sukrosa $\frac{1}{4}$ kg, Agar swallow 1 bks, Indikator universal, Asam tatarat / asam citrate 10 % steril, Kertas saring., Air suling Agar 0,05% (ASA) steril, Kloramfenicol 100 mg/l media.

Alat : LAF (laminar air Flow), Stomaker atau blender, Pipet ukur mulut lebar 10 ml, Pipet ukur 1 ml, Tabung reaksi tinggi 14 cm diameter 1 cm, Cawan petri diameter 10 cm, Lampu spiritus

B. Cara Kerja (Safriansyah, 2002)

1. Pembuatan media PDA
2. Homogenisasi sampel : 1 g sampel dimasukkan dalam 9 ml akuadest steril (ASA) atau larutan garam fisiologis
3. Untuk masing-masing sampel disiapkan 3 buah tabung reaksi yang masing-masing telah diisi 9 ml ASA.
4. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh yang merupakan pengenceran 10^{-1} , dipipet 1 ml kedalam tabung ASA pertama sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Dibuat pengenceran berikutnya sehingga diperoleh pengenceran sesuai batas maksimum persyaratan masing-masing sampel.
5. Siapkan cawan petri steril yang telah diisi PDA kurang lebih 12 ml atau secukupnya sampai memenuhi permukaan cawan secara aseptis, biarkan memadat.
6. Tuangkan 0,5 ml sampel pada permukaan PDA, segera goyangkan di permukaan meja pola angka 8 sehingga suspensi tersebar merata dan dibuat duplo. Lakukan hal yang sama pada sampel pengenceran berikutnya.
7. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dilakukan uji blanko. Ke dalam satu cawan petri dituangkan PDA dan dibiarkan memadat. Ke dalam cawan petri yang lain, dituangkan PDA dan pengencer 1 ml kemudian dibiarkan memadat.
8. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 20-25⁰ C dan diamati pada hari ke-3 sampai hari ke-5. Koloni khamir (ragi) memiliki bentuk bulat kecil, putih, hampir menyerupai bakteri.

Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

ACARA 7

PEMBUATAN PRODUK SEDIAAN FARMASI

Sediaan farmasi adalah obat, bahan obat, obat tradisional dan kosmetika. Kemasan sediaan farmasi dan alat kesehatan adalah bahan yang digunakan untuk mewadahi dan/atau membungkus sediaan farmasi dan alat kesehatan baik yang bersentuhan langsung maupun tidak.

Penandaan dan informasi sediaan farmasi dapat berbentuk gambar warna, tulisan, atau kombinasi antara atau ketiganya atau bentuk lainnya yang disertakan pada kemasan atau dimasukkan dalam kemasan, atau merupakan bagian dari wadah dan/atau kemasannya.

Sediaan farmasi dapat berupa penggunaan untuk dalam dan penggunaan luar. Peruntukan penggunaan dalam bentuknya seperti tablet, kapsul, pil. Penggunaan luar dapat berupa krim, salep, lotion, gel. Bentuk tradisional dapat berupa lulur, scrub, dll. Penggunaan produk yang berfungsi sebagai aromaterapi seperti lilin aromaterapi, dupa, dll.

Kemasan produk harus dibuat dalam bentuk yang semenarik mungkin agar dapat menarik minat konsumen untuk membeli. Akan tetapi pembuatan kemasan harus sesuai dengan aturan dan komposisi yang ada,

A. Tujuan

Mahasiswa mampu membuat produk dan kemasan sediaan farmasi

B. Alat dan Bahan

Sesuai dengan pilihan praktikan

C. Cara Kerja

1. Praktikan memilih salah satu bentuk sediaan farmasi yang diinginkan dengan bahan yang tersedia di laboratorium.
2. Formulasi optimal dilakukan dengan cara penelusuran literature
3. Praktikan membuat kemasan produk dan poster yang sesuai dengan produk yang dibuat

DAFTAR PUSTAKA

- Ahadi, M.R. 2003. Kandungan Tannin Terkondensasi dan Laju Dekomposisi pada Seresah daun *Rhizopora mucronata* pada Ekosistem Tambak Tumpangsari. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arnelia, E.M. 2002. Daya Antihelmintik Infusa Daun Sirsak terhadap *Ascaridia galli* secara *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Dalimartha, S. 2005. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Trubus Agriwidaya. Cet 5, Jakarta.
- Deaville E.R..D. I, Given dan I. Muller Harvey, 2010. Chesnut and Tannin Silages; Effect in Sheep Differ For Apperent Digetibility, Nitrogen, Utilization and Loss. *Animal Feed Science Technology*. 157:129-138
- Elfianus, G. 2008. Pembuatan Virgin Coconut Oil Secara Fermentasi. *Bulletin Teknologi Pertanian*. 2:69-73
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia*. Terj. Kosasih P dan Iwang. S. cet 2. ITB Press, Bandung.
- Info Trubus Kit Juni 2009
- Lestari. 1986. *Isolasi dan Identifikasi Cendawan-Cendawan Toksik pada Jamu*. Dalam *Kumpulan Hasil-Hasil Penelitian Bidang Obat-Obatan Tradisional*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Middelton E.C., Kandaswani T.C., dan Theoharides, 1998, *The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implication For Imumunity, Infflamtion and Cancer in Harbone* J.B. Flavonoids. Chapman and Hall, London
- Safriansyah. 2002. Analisis Faktor Risiko Pencemaran Mikroba pada Produk Obat Tradisional : Studi Titik Kritis dalam Proses Produksi Obat Tradisional Bentuk Serbuk

- pada Perusahaan Jamu di Kalimantan Selatan. *Tesis*. Magister Ilmu Kesehatan Masyarakat. Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sudarmadji, S. Haryono., dan Suhardi. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Hasil Pertanian*. Liberty, Yogyakarta.
- Sudjadi, 1988. *Metode Pemisahan*. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Usman, A. 2013. *Lembar Kerja Uji Kimia dan Kompilasi Data Laboratorium Pengujian*. LPPT UGM, Yogyakarta.
- [www.prakherbal/BAB III PEMBUATAN VCO _ TEKNOLOGI INDUSTRI.htm](http://www.prakherbal/BAB%20III%20PEMBUATAN%20VCO%20_%20TEKNOLOGI%20INDUSTRI.htm)
- Yuningsih, R. 2007. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun jawer Kotok. *Skripsi*. FMIPA IPB, Bogor.

PETUNJUK PRAKTIKUM BIOTEKNOLOGI TANAMAN OBAT

Dr. Dra. Exsyupransia Mursyanti, M.Si

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Agar praktikum berjalan lancar, praktikan wajib mentaati peraturan selama praktikum sebagai berikut.

1. Praktikan harus sudah hadir di ruang praktikum 15 menit sebelum acara praktikum di mulai.
2. Praktikan wajib mempelajari materi yang akan dikerjakan pada hari itu.
3. Sebelum praktikum diadakan, praktikan wajib menjalani pretest tertulis untuk setiap unit acara praktikum.
4. Praktikan wajib mengenakan jas praktikum yang pantas.
5. Praktikan bertanggung jawab terhadap peralatan yang digunakan, bila terjadi kerusakan/kehilangan.
6. Pada akhir praktikum, praktikan wajib menempuh responsi dengan materi responsi sesuai dengan praktikum yang dilakukan.
7. Praktikan yang tidak hadir dua kali atau lebih dinyatakan gugur dalam mata praktikum ini.
8. Penilaian akhir mata praktikum ini meliputi pretes, laporan, dan responsi.
9. Peraturan yang belum tercantum dalam tata tertib ini akan ditetapkan kemudian.

DAFTAR ISI

TATA TERTIB PRAKTIKUM	iii
DAFTAR ISI	v
ACARA 1 PEMBUATAN MEDIUM DAN STERILISASI	43
ACARA 2 KULTUR SUSPENSI SEL	45
ACARA 3 ISOLASI TOTAL DNA GENOM TANAMAN	49
ACARA 4 ISOLASI DNA PLASMID BAKTERI	51
ACARA5 AMPLIFIKASI GEN DENGAN METODE PCR	53
ACARA6 CEK DNA DENGAN GEL ELEKTROFORESIS	55
ACARA 7 TRANSFORMASI GENETIK (I) PENANAMAN TARGET TRANSFORMASI	57

ACARA 8	
TRANSFORMASI GENETIK (II)	
Kokultivasi Target Transformasi dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
ACARA 9	
TRANSFORMASI GENETIK (III)	
Eliminasi <i>A.tumefaciens</i>	61
ACARA 10	
TRANSFORMASI GENETIK (IV)	
Penanaman Hasil Transformasi pada Medium Seleksi	63

ACARA 1

PEMBUATAN MEDIUM DAN STERILISASI

- A. Tujuan :**
- Mengetahui proses pembuatan berbagai macam medium untuk kultur suspensi dan transformasi genetik
 - Mengetahui proses sterilisasi medium
 - Mengetahui ada tidaknya kontaminasi dan jenis kontaminasi
- B. Bahan :** Komponen medium MS cair, NP cair, NP padat, LB cair, LB padat, ekstrak tomat, air kelapa, agar, sukrosa, aquades, komponen antibiotik (kanamisin, rifampisin, *acetosyringone*, meropenem, higromisin), komponen hormon(2,4-D), tween20
- C. Alat :** Autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), *hotplate magnetic stirrer*, timbangan analitik, gelas beker, erlenmeyer, pH meter, cawan petri, botol kultur, konikel, PCR tube, microtube, microtip, pinset, *scalpel*, *blade*, spatula, saringan teh, mortar, *pestle*, gelas pengaduk, pipet tetes, botol jam, aluminium foil, kertas saring, kain nilon, kertas payung, dan plastik wrap.
- D. CaraKerja:**
- Medium yang dibuat meliputi medium untuk kultur suspensi sel (MS cair + 2,4-D 2 ppm), medium untuk isolasi DNA plasmid bakteri (medium LB padat + kanamisin 100 ppm + rifampisin 30 ppm dan medium LB cair + kanamisin 100 ppm + rifampisin 30 ppm), medium untuk penanaman biji anggrek (NP padat + air kelapa), medium untuk prekultur dan kokultivasi (medium CIM: medium NP + 2,4-D1 ppm + ekstrak tomat), medium untuk kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* EHA105/GV3101 (medium LB cair + kanamisin 100 ppm + rifampisin 30 ppm), medium untuk transformasi (medium NP cair dan medium NP cair + *acetosyringone* 25 ppm + tween20), medium untuk eliminasi (medium 1/2 NP cair tanpa gula + meropenem 25 ppm), serta medium seleksi (NP padat + higromisin 10 ppm).

Pembuatan medium pada prinsipnya sebagai berikut:

1. *Aquadest* 500 mL disiapkan (volume 50% jika membuat 1 L medium).
2. Komponen medium ditimbang sesuai kebutuhan dan dilarutkan dalam *aquadest* dengan *Hot plate magnetic stirrer*.
3. Ditambahkan komponen tambahan (yang tahan panas) dan dihomogenkan.
4. *Aquadest* ditambahkan hingga volume mencapai 1 L (100% volume) dan diaduk.
5. Nilai pH diatur pada rentang 5,6 - 5,8.
6. Ditambahkan NaOH 1N (bila nilai pH <5,6) atau HCl 1 N (bila nilai pH >5,8).
7. Bila hendak membuat medium padat maka ditambahkan agar dan dipanaskan dengan *Hot plate magnetic stirrer* hingga larutan jernih.
8. Medium dengan komponen tahan panas disterilisasi dengan autoklaf 121°C, 1 atm selama 15 menit.
9. Medium dengan komponen termolabil disterilisasi dengan *millipore filter*.
10. Medium diinkubasi minimal 3 hari dan siap digunakan apabila tidak ada kontaminasi.

Catatan:

1. Medium cair tidak memerlukan penambahan agar
2. Medium ½ NP adalah medium NP yang dibuat berdasarkan setengah resep, tetapi komponen tambahan lain (agar, sukrosa) tetap satu resep
3. Untuk medium dengan air kelapa ditambahkan sebanyak 100 mL/L medium
4. Untuk medium dengan ekstrak tomat ditambahkan sebanyak 100 g/L medium
5. Pengamatan dilakukan hari ke-1 dan hari ke-4

ACARA 2

KULTUR SUSPENSI SEL

- A. Tujuan :**
- Mengetahui cara melakukan kultur suspensi kalus
 - Mengetahui pertumbuhan sel kalus berdasarkan parameter PVC, berat kering, berat basah, dan jumlah sel kalus
 - Mengetahui kekeruhan kultur
- B. Bahan :** Kalus yang remah (*friable*) dari kalus daun Kaca Piring (*Gardenia jasminoides*), medium untuk kultur suspensi sel (MS cair + 2,4-D 2 ppm), alkohol 70%, dan enzim pectinase dari *Aspergillus niger*.
- C. Alat :** Timbangan analitik, botol kultur, pinset, skalpel, blade, shaker incubator, LAF (*Laminar Air Flow*), centrifuge, haemocytometer, mikroskop, cawan petri, propipet, pipet ukur, mikropipet, mikrotip, gelas benda, gelas penutup, aluminium foil, plastic wrap, konikel, spirtus, korek api, corong gelas, oven, kertas saring, kain kasa, microtube, handcounter, botol jam, dan vortex.
- D. Cara Kerja:**
1. **Persiapan Kalus dan Perhitungan Berat Basah Kalus**
Botol kultur berisi medium MS cair + 2,4-D 2 ppm ditimbang beratnya lalu dicatat sebagai berat awal (W_{b0}). Kalus dipotong-potong dengan skalpel kemudian dimasukkan ke dalam botol berisi medium. Botol kultur kemudian ditutup dengan aluminium foil dan diwrap. Botol medium yang telah berisi kalus ditimbang dan dicatat sebagai berat akhir. Pengerjaan dilakukan di dalam LAF secara aseptis. Botol diberi label lalu diinkubasi pada shaker incubator suhu 27°C dengan kecepatan 110 rpm.
Rumus perhitungan: Berat Basah= $W_{b1}-W_{b0}$
 2. **Kekeruhan Kultur**
Setiap botol kultur yang berisi kalus diamati kekeruhan mediumnya dengan cara penglihatan langsung dan diberi keterangan sebagai berikut:

- = Tidak keruh
- + = Sedikit keruh
- ++ = Keruh
- +++ = Sangat keruh

3. Perhitungan PCV (*Packed Cell Volume*)

Perhitungan PCV (*Packed Cell Volume*) dapat dilakukan dengan cara botol yang berisi kalus dihomogenkan dengan cara digojog. Kultur dimasukkan ke dalam tabung konikal sebanyak 5 ml. Tabung konikal kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 15-30 menit. Volume pelet yang terbentuk diukur dengan tabung konikal sebagai pembandingnya dan di hitung persen volume

$$PCV = \frac{\text{Volume pelet}}{\text{Volume cuplikan}} \times 100\%$$

4. Pengamatan Morfologi Sel Kalus

Pengamatan morfologi sel kalus dilakukan dengan mikroskop. Gelas benda dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Sel kalus diambil dengan pipet tetes dan diteteskan ke gelas benda lalu ditutup dengan gelas penutup. Sel diamati dengan mikroskop pada perbesaran 10x5, usahakan yang didapat adalah sel tunggal. Hasil morfologi lalu dicatat dan difoto.

5. Perhitungan Berat Kering Kalus

Cawan petri berisi kertas saring steril dioven selama 5 menit lalu ditimbang dan dicatat hasilnya sebagai berat awal (W_{b0}). Kertas saring lalu diambil dan dilipat menjadi bentuk segitiga dan diletakkan pada corong gelas. Kalus yang digunakan untuk perhitungan berat kering di saring sebanyak 10 ml dengan kertas saring dan gelas pengaduk. Kertas saring yang terisi kalus lalu diletakkan kembali pada cawan petri dan dimasukkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, ditimbang dan dicatat hasilnya sebagai berat akhir (W_{k1}). Rumus perhitungan: Berat Kering = $W_{k1} - W_{b0}$

6. Perhitungan Jumlah Sel Kalus

Sebanyak 75 μ L kultur kalus dimasukkan ke mikrotube lalu ditambahkan 75 μ L enzimpectinase from *Aspergillus niger* dan diinkubasi selama 1 jam. Selanjutnya mikrotube divortex selama 30 detik. Campuran tersebut dimasukkan ke *haemocytometer* lalu dihitung jumlah selnya dengan rumus:

$$\text{Total sel/ ml} = \frac{\text{total sel yang dihitung} \times \text{faktor dilusi} \times 10^4}{5}$$

E. Hasil Pengamatan:

Tabel Pembahasan

Tabel 1. Pengamatan Pertumbuhan Kultur Suspensi Kalus

Minggu ke-	Berat Basah Kalus	Berat Kering Kalus	% PCV	Kekeruhan	Jumlah Sel/ mL
0					
1					
2					
3					
4					

Keterangan:

Tabel 2. Morfologi Sel Kalus

Minggu ke-	Gambar	Keterangan
0		
1		
2		
3		
4		

Tabel Lampiran

Tabel 1. Berat Basah Kalus

Minggu ke-	Berat Botol Tanpa Kalus	Berat Botol Dengan Kalus	Berat Basah Kalus
0			
1			
2			
3			
4			

Tabel 2. Berat Kering Kalus

Minggu ke-	Berat Petri + Kertas Saring	Berat Petri + Kertas Saring + Kalus	Berat Kering Kalus
0			
1			
2			
3			
4			

Tabel 3. PCV Kalus

Minggu ke-	Volume Cuplikan	Volume Pelet	% PCV
0			
1			
2			
3			
4			

Tabel 4. Jumlah Sel Kalus/mL

Minggu ke-	Jumlah Sel pada Petak ke-					Total Jumlah Sel/mL
	1	2	3	4	5	
0						
1						
2						
3						
4						

Pengamatan dilakukan sebanyak 5x selama 4 minggu (minggu ke-0 sampai minggu ke-4)

ACARA 3

ISOLASI TOTAL DNA GENOM TANAMAN

A. Tujuan :

- Mengetahui metode isolasi DNA total dari daun tanaman Telang (*Clitoria ternatea*)
- Mengetahui kualitas DNA hasil isolasi genom tanaman Telang (*Clitoria ternatea*)

B. Bahan : daun tanaman Telang (*Clitoria ternatea*), larutan CTAB, merkaptoetanol, kloroform, isopropanol, etanol absolut, TE buffer

C. Alat : timbangan analitik, microtube 1,5 mL, mikropipet, mikrotip, *mortar&pestle* (steril & dingin), *waterbath*, penjepit kayu/spons pengapung, centrifuge, shaker, dan rak mikrotube

D. Cara Kerja (modifikasi metode Murray-Thompson,1980):

1. Daun tanaman dicuci dengan air mengalir, dipotong dan ditimbang sebanyak 0,6 gr, lalu ditambahkan 100 μ L larutan CTAB dan dihaluskan dengan *mortar* dan *pestle* steril yang dingin (selama 2 menit atau sampai hancur).
2. Tambahkan 400 μ L larutan CTAB kemudian homogenkan dan masukkan semua larutan sampel ke dalam cawan ke dalam microtube 1,5ml.
3. Sampel diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 55-65°C selama 30 menit.
4. Tambahkan 500 μ L larutan kloroform dengan perbandingan 1:1, campur dan homogenkan pada shaker dengan suhu kamar selama 30 menit.
5. Ambil microtube berisi sampel tersebut, buka tutupnya sebentar untuk mengeluarkan gas yang terbentuk selama penggojogan, kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 5000 rpm.
6. Transfer 300-400 μ L supernatant ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru. Apabila warna supernatant masih terlihat kehijauan maka ulangi lagi proses ekstraksi kloroform. Kemudian tambahkan 300-400 μ L larutan isopropanol dengan perbandingan 1:1 dan di inversi 6x, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit.

7. Microtube disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 5000 rpm.
8. Supernatant dibuang, pellet DNA dibilas dengan 100 μ L larutan etanol absolut, lalu disentrifugasi selama 2 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 10.000 rpm.
9. Supernatant dibuang dan pellet dikering-anginkan.
10. Setelah kering, resuspensikan pellet DNA dengan 100 μ L larutan TE buffer.
11. Simpan DNA genom tumbuhan pada suhu 4⁰C.

ACARA 4

ISOLASI DNA PLASMID BAKTERI

A. Tujuan :

- Mengetahui metode isolasi DNA Plasmid Bakteri *Agrobacterium tumefaciens*
- Mengetahui kualitas DNA hasil isolasi Plasmid Bakteri *Agrobacterium tumefaciens*

B. Bahan : Kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105 / GV3101), medium LB padat & cair+ antibiotik (Kanamycin 100 ppm + Rifampicin 30 ppm – EHA105) / (Hygromycin 50 ppm + Kanamycin 50 ppm – GV3101), plasmid (pTA7002-*AtRKD4* / p2K1-*Hd3a*), alkohol 70%, Geneaid Presto Mini Plasmid Kit PDH100 (PD1 Buffer, PD2 Buffer, PD3 Buffer, True Blue Lysis Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, RNase, PDH column, collectiontube)

C. Alat : cawan petri, botol kultur, ose, spirtus, korek api, LAF (*Laminar Air Flow*), shaker, microtube, microtip, mikropipet, centrifuge refrigerated, plastic wrap, alumunium foil, marker, dan spektrofotometer.

D. Cara Kerja:

1. Preparasi Kultur *Agrobacterium tumefaciens* EHA105
Agrobacterium tumefaciens EHA105/GV3101 diinokulasi dengan cara *streak plate* kemedium LB padat (Kanamycin 100 ppm + Rifampicin 30 ppm–EHA105)/ (Hygromycin 50 ppm + Kanamycin 50 ppm – GV3101) pada cawan petri lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya diambil 2-3 koloni tunggal dan diinokulasike medium LB cair + antibiotic pada botol kultur lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian diambil 2-3% kultur dan diinokulasi kemedium LB cair + antibiotik lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 120 -150 rpm (OD=0,8).
2. Isolasi Plasmid
 - a. Harvesting
Sebanyak 1,5 mL kultur *Agrobacterium tumefaciens* dimasukkan ke dalam tube 1.5 mL lalu disentrifugasi selama 1 menit pada suhu ruang dengan

- kecepatan 10.000 rpm (16.000×g). Supernatant dibuang lalu perlakuan tersebut diulangi sebanyak 5 kali.
- b. Resuspension
Pelet hasil harvesting ditambahkan 200 µL *PD1 Buffer* yang sudah mengandung RNA selalu diberi 2 µL *True Blue Lysis Buffer* dan dicampur hingga homogen.
 - c. Cell Lysis
Hasil resuspensi diberi 200 µL *PD2 Buffer* kemudian dihomogenkan dengan cara diinversi 10× lalu didiamkan pada suhu ruang selama 2 menit (jangan lebih dari 5 menit). Selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi, jika larutan berwarna biru maka sel telah lisis dengan sempurna.
 - d. Neutralization
Hasil lisis sel ditambahkan 300 µL *PD3 Buffer* dan langsung diinversi 10×. Selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi, jika larutan berwarna putih maka proses netralisasi berlangsung sempurna. Hasil tersebut disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruang dengan kecepatan (16.000× g) 10.000 rpm. Kolom PDH dipindahkan ke dalam tube 2 mL.
 - e. DNA Binding
Supernatant hasil sentrifugasi dipindahkan menggunakan mikropipet ke kolom PDH lalu disentrifugasi selama 3 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 10.000 rpm. Larutan pada tube 2 mL dibuang dan tube tersebut dipasang kembali ke kolom PDH.
 - f. Wash
Sebanyak 600 µL *Wash Buffer* ditambahkan ke kolom PDH lalu disentrifugasi selama 30 detik pada suhu ruang dengan kecepatan (16.000× g) 10.000 rpm. Larutan pada tube 2 mL dibuang dan tube tersebut dipasang kembali ke kolom PDH lalu disentrifugasi selama 3 menit pada suhu ruang dengan kecepatan (16.000× g) 10.000 rpm. Kolom PDH dipindahkan ke dalam tube 2 mL yang baru.
 - g. Elution
Sebanyak 50 µL *Elution Buffer / TE Buffer* ditambahkan ke tengah kolom PDH lalu didiamkan selama 2 menit pada suhu ruang. Selanjutnya tube disentrifugasi selama 2 menit pada suhu ruang dengan kecepatan (16.000× g) 10.000 rpm. Kemudian plasmid disimpan pada suhu -4°C hingga -20°C (penyimpanan jangka waktu lama).

ACARA5

AMPLIFIKASI GEN DENGAN METODE PCR

A. Tujuan :

- Mengetahui hasil deteksi gen *trnL*, *Actin*, *HPT* dan *AtRKD4 / Hd3a* pada DNA genom tanaman Telang (*Clitoria ternatea*) dan DNA plasmid bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dengan metode PCR

B. Bahan : hasil isolasi DNA genom tanaman Telang (*Clitoria ternatea*), hasil isolasi DNA plasmid pTA7002-*AtRKD4 / p2K1-Hd3a*, koloni bakteri *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 / GV3101, PCR Kit (KAPA3G PlantPCR Kit KK7251), primer Forward (F) dan Reverse (R) gen *AtRKD4 / Hd3a*, *HPT*, *Actin*, *tRNL*, dan alkohol 70%

C. Alat : mesin PCR, mikropipet, mikrotip, cooler box, rak mikrotube

D. Cara Kerja:

1. Hasil isolasi DNA genom tanaman, DNA plasmid, koloni bakteri, serta PCR Kit serta pasangan oligonukleotida primer disiapkan. Untuk DNA genom tanaman menggunakan primer *Forward&Reverse trnL* dan *Actin*, DNA plasmid menggunakan primer *Forward & Reverse HPT dan AtRKD4/Hd3a*.
2. Komponen PCR dimasukkan ke PCR tube 0,2 ml (kondisi dingin, di dalam *ice box*) sesuai dengan urutan berikut:

ddH ₂ O / PCR Grade Water	X μ L
2 X KAPA Plant PCR Buffer	25 μ L
25 mM MgCl ₂ (1.5 mM/1 \times - Optional)	3 μ L
10 μ M primer Forward	1.5 μ L
10 μ M primer Reverse	1.5 μ L
Template DNA	Y μ L
2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase (1U/50 μ L)	0.4 μ L
<hr/>	
Total	50 μ L

Dilakukan proses vortex dan spin down setelah penambahan komponen PCR dan setelah penambahan template DNA & DNA Polymerase (dipastikan microtubeter tutup rapat).

3. Hidupkan mesin PCR (*thermalcycler*) dan set program PCR sebagai berikut:

AtRKD4

Step	Temp	Duration	Cycles
<i>Initial Denaturation</i>	95°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	95°C	30 sec	30
<i>Annealing*</i>	58°C	30 sec	
<i>Extension</i>	72°C	30 sec	
<i>Final Extension</i>	72°C	10 min	1
<i>Hold</i>	4°C	∞	1

**Actin* :49°C– 30S

Hd3a

Step	Temp	Duration	Cycles
<i>Initial Denaturation</i>	96°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	94°C	30 sec	30
<i>Annealing*</i>	55°C	30 sec	
<i>Extension</i>	72°C	1 min	
<i>Final Extension</i>	72°C	10 min	1
<i>Hold</i>	4°C	∞	1

**Actin* :49°C– 30S

4. Stop reaksi PCR, ambil PCR sampel (simpan di refrigerator, 4°C), kemudian keluarlah dari program dan kembalikan setting mesin PCR ke menu utama, baru kemudian matikan mesin (*power supply turn OFF*).
5. Cek hasil reaksi PCR dengan gel elektroforesis

ACARA6

CEK DNA DENGAN GEL ELEKTROFORESIS

A. Tujuan :

- Mengetahui metode elektroforesis hasil PCR DNA Genom tanaman Telang (*Clitoria ternatea*), DNA plasmid pTA7002-*AtRKD4* / p2K1-*Hd3a* dan PCR koloni *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 / GV3101
- Mengetahui hasil visualisasi PCR DNA Genom tanaman Telang (*Clitoria ternatea*), DNA plasmid pTA7002-*AtRKD4* / p2K1-*Hd3a* dan PCR koloni *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 / GV3101

B. **Bahan :** agarose, sampel hasil PCR, TBE buffer 0,5x, florosafe, DNA loading dye, ladder 100 bp.

C. **Alat :** cetakan agarose (tray&comb), microwave, mikropipet, mikrotip, *parafilm*, Erlenmeyer 250 mL, spatula, gelas ukur, alat elektroforesis, aluminum foil, timbangan analitik, *Gel-Doc/UV transilluminator*, *Dark Reader*.

D. Cara Kerja :

1. Pembuatan TBE Buffer 0,5x

Sebanyak 10 mL stok TBE buffer 10x diambil dan ditambahkan akuades sebanyak 190 mL lalu dihomogenkan dan disimpan pada suhu ruang.

2. Pembuatan Gel Agarose 1,4% (Plasmid) dan 1% (Genom)

Sebanyak 0,42 gram (1,4% - Plasmid) dan 0,3 gram (1% - Genom) bubuk agarose dimasukkan dalam Erlenmeyer dan masing-masing ditambahkan TBE buffer 0,5x sebanyak 30 mL lalu dipanaskan dalam *microwave* selama 1-2 menit sampai larut sempurna. Kemudian larutan agarose didiamkan hingga hangat dan ditambahkan *fluorosafe* sebanyak 1,5 μ L lalu dihomogenkan. Larutan tersebut segera dituangkan ke tray cetakan agarose dan comb di pasang untuk cetakan sumuran gel lalu didiamkan, gelembung yang terbentuk dihilangkan. Jika agarose sudah memadat, comb dapat dilepas dari cetakan dan diangkat.

3. Elektroforesis Hasil PCR

Agarose yang sudah mengeras beserta tray diletakkan di dalam alat elektroforesis kemudian dituangkan TBE buffer 0,5x hingga agarose terendam. Campurkan 5 μ L sampel hasil PCR dengan 1 μ L loading dye di atas kertas parafilm dan diresuspensi perlahan beberapa kali hingga homogen. Pada sumur pertama gel agarose dimasukkan 6 μ L ladder 100 bp, selanjutnya dimasukkan campuran sampel hasil PCR dengan loading dye ke sumuran berikutnya. Tutup alat elektroforesis, atur voltase pada 50 volt dengan waktu 45 menit lalu nyalakan alat dan cek setiap 15 menit sekali. Arah migrasi DNA dari kutub negatif ke kutub positif sehingga sumuran gel dipastikan berada di kutub negative dari alat elektroforesis. Setelah migrasi DNA mencapai 2/3 panjang gel (ditunjukkan dengan warna biru berpindah ke arah kutub positif), matikan alat, dan tray berisi gel diambil. Gel dikeluarkan dari tray dan hasil elektroforesis dapat divisualisasi dengan *Gel-Doc* atau *Dark Reader*. Hasil visualisasi didokumentasikan.

ACARA 7

TRANSFORMASI GENETIK (I) PENANAMAN TARGET TRANSFORMASI

A. Tujuan :

Mengetahui proses penanaman dan perkembangan biji anggrek/daun tanaman telang pada medium untuk menghasilkan protokorm/kalusembriogenik sebagai target transformasi

B. Bahan :

Buah anggrek *Phalaenopsis amabilis* yang sudah matang tetapi belum pecah, medium NP padat + air kelapa dalam cawan petri, alkohol 96%, alkohol 70%

Daun tanaman Telang (*Clitoriaternatea*), Air Deterjen, Air Filtrasi, Aquadest Steril, Medium MS + TDZ 5 ppm, Tween20, NaClO 25, Agrept (Bakteriosida), Dithane (Fungisida), Alkohol 70%, Alkohol 96%.

C. Alat : LAF (*Laminar Air Flow*), cawan petri + kertas saring steril, skalpel, blade, spatula, bunsen, pinset, botol jam, plastik wrap,

D. Cara Kerja :

Biji Anggrek -Protocorm

1. Cuci buah anggrek dibawah air mengalir, selanjutnya dengan air sabun dan bilas sampai bersih (jaga buah jangan sampai luka)
2. Buah anggrek direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit dan kering-anginkan
3. Selanjutnya buah anggrek dicelupkan dalam alkohol 96% dan di *flaming* di atas lampu Bunsen sebanyak 3 kali
4. Buah anggrek dalam keadaan masih *terflaming* (api menyala) dimasukkan ke dalam LAF dan diletakkan di atas cawan petri steril
5. Buah anggrek dipotong secara membujur lalu bijinya dikerok dengan spatula dan diletakkan di cawan petri yang baru
6. Selanjutnya biji ditabur secara merata pada medium yang diatasnya sudah diberi kain nilon steril kemudian cawan petri di *seal* rapat dengan plastik wrap

7. Pertumbuhan biji anggrek diamati dengan optilab dan didokumentasikan selama 4 minggu (mulai dari hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28). Parameter yang diamati yaitu warna biji, morfologi, dan kontaminasi)

Tanaman Telang

1. Daun tanaman Telang pada bagian ke-2 hingga ke-4 dari ujung diambil, dimasukkan ke dalam wadah gelas beker 500 mL dan dicuci dengan air deterjen lalu dibilas dengan air filtrasi.
2. Air deterjen dibuang, daun kemudian dibersihkan dari sisa detergen dengan cara menggojognya dengan aquadest steril dan beker kemudian ditutup menggunakan aluminium foil.
3. Daun Telang yang telah disterilisasi dimasukkan ke dalam wadah beker dan ditutup menggunakan aluminium foil kemudian dimasukkan dalam LAF.
4. Eksplan disterilisasi menggunakan alkohol 70% di dalam LAF dengan cara digojog dengan keadaan semua eksplan terendam selama 30 detik kemudian alkohol dibuang dan eksplan digojog dengan aquadest steril.
5. Eksplan kemudian disterilisasi menggunakan larutan fungisida 500 ppm dan bakteriosida 500 ppm yang telah ditambah dengan 2 tetes tween dengan cara digojog selama 5 menit kemudian dibilas menggunakan aquadest steril.
6. Eksplan kemudian disterilisasi menggunakan NaClO 20% selama 3 menit kemudian dibilas dan digojog menggunakan aquadest steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 1, 3 dan 5 menit.
7. Eksplan yang telah steril kemudian dipindah ke dalam cawan petri steril yang telah diberi kertas saring steril dan dipotong membentuk persegi dengan ukuran $1 \times 1 \text{ cm}^2$.
8. Kalus embriogenik dibuat dengan cara menanam eksplan yang telah dipotong persegi ke dalam medium *Murashige and Skoog* yang telah ditambahkan hormon TDZ 5 ppm.
9. Eksplan yang telah ditanam kemudian diinkubasi selama 28 hari di dalam ruang inkubasi, diamati dan didokumentasikan perkembangannya.

ACARA 8

TRANSFORMASI GENETIK (II)

Kokultivasi Target Transformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens*

A. Tujuan :

Melakukan kokultivasi target transforman pada kultur *A. tumefaciens* yang mengandung DNA rekombinan

B. Bahan : Kultur *A. tumefaciens* yang mengandung plasmid rekombinan umur 15 jam yang ditanam pada medium LB cair + antibiotik (Kanamycin 100 ppm + Rifampicin 30 ppm –EHA105)/ (Hygromycin 50 ppm + Kanamycin 50 ppm – GV3101), protokorm anggrek umur 3-4 minggu (ditanam pada medium NP padat + air kelapa dan diatas kain nilon), medium NP cair + acetosyringone 25 ppm + 2 tetes Tween20, medium NP+CIM

C. Alat : mikrotube 1,5 ml, tabung konikel 15 ml dan 50 ml, mikropipet, mikrotip, rak mikrotube, sentrifuge, saringan teh, erlenmeyer, kertas saring, kain nilon, cawan petri, pinset, spatula, tempat alkohol 70%, plastik wrap, bunsen, spirtus, korek api, shaker, botol kultur, gelas beker, alumunium foil, stopwatch

D. Cara Kerja :

1. Prekultur

Protokorm anggrek/Kalus Embriogenik Telang yang sudah ditumbuhkan selama 4 minggu dipindahkan secara aseptis ke medium NP CIM / MS CIM yang sudah dilapisi kain nilon steril lalu diinkubasi selama 3 hari

2. Persiapan *A. Tumefaciens*

Bakteri *A. tumefaciens* dari stok gliserol atau stok medium padat diinokulasi secara streakplate ke medium LB padat + antibiotik (Kanamycin 100 ppm + Rifampicin 30 ppm–EHA105) / (Hygromycin 50 ppm + Kanamycin 50 ppm – GV3101) lalu diinokulasi pada medium LB cair + antibiotik lalu diinkubasi dalam gelap selama 48 jam pada suhu 28°C dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya diambil 2% kultur cair *A. tumefaciens* kemudian diinokulasi pada medium LB cair + antibiotik dan

diinkubasi dalam gelap selama 15 jam pada suhu 28°C dengan kecepatan 120 rpm.

3. Transformasi dan Kokultivasi

Biji Anggrek -Protocorm

Kultur cair *A. tumefaciens* diambil sebanyak 1 ml dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatant dibuang lalu ditambahkan 1 mL NP cair, diresuspensi dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatant dibuang lalu ditambahkan 1 mL NP cair dan diresuspensi. Selanjutnya kultur tersebut dipindah ke konikel lalu ditambahkan 4 mL NP cair + acetosyringone 25 ppm + 2 tetes tween 20. Protocorm dimasukkan dalam konikel berisi suspense bakteri dan didiamkan selama 30 menit sambil digojog setiap 5 menit. Protocorm ditiriskan di atas saringan teh yang sudah dialasi kain nilon steril dan dikering-anginkan. Kain nilon berisi protocorm dipindahkan ke medium kokultivasi (medium NP + CIM) dan diinkubasi dalam gelap selama 72 jam pada suhu ruang.

TanamanTelang

1. Kultur bakteri pada medium LB cair (OD600 = 0,8) diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung konikal dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4500 rpm.
2. Supernatan yang didapatkan kemudian dibuang secara hati-hati menggunakan micropipette kemudian medium MS cair ditambahkan hingga pellet yang berada pada tabung terendam kemudian divortex dan dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit menggunakan centrifuge dengan kecepatan 4500.
3. Supernatan yang didapatkan ditambah kembali menggunakan medium MS cair dengan perbandingan pelet : medium sebesar 1:5. Medium kemudian ditambah menggunakan Asetosiringon sebanyak 100 µL dan Tween 20 sebanyak 2 tetes, dan dihomogenkan.
4. Kalus Telang diambil dari medium prekultur menggunakan spatula dan dimasukkan ke dalam tabung konikel berisi *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Kalus pada tabung konikal diinkubasi selama 30 menit, dan tabung digojog setiap 5 menit.
6. Kalus kemudian ditiriskan di atas saringan teh yang sudah dialasi kain nilon steril dan dikering-anginkan.
7. Kain nilon berisi kalus dipindahkan ke medium kokultivasi (medium MS CIM) dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 72 jam pada suhu ruang.

ACARA 9

TRANSFORMASI GENETIK (III)

Eliminasi *A.tumefaciens*

A. Tujuan :

Melakukan eliminasi *A.tumefaciens* pada target transformasi

B. Bahan :

Protokorm / Kalus hasil kokultivasi, medium eliminasi [(Protokorm Anggrek : ½ NP cair tanpa gula + meropenem 25 ppm) (Kalus Telang : ½ MS cair tanpa gula + meropenem 50 ppm)], akuades steril

C. Alat :

Tabung konikel, mikropipet, mikrotip, rak konikel, pinset, spatula, alkohol 70%, plasticwrap, cawan petri + kertas saring steril, korek api, bunsen, spirtus

D. Cara Kerja:

1. Akuades steril sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam konikel
2. Protokorm/Kalus hasil kokultivasi dimasukkan ke dalam konikel tersebut lalu digojog
3. Akuades dibuang dan ditambahkan akuades steril yang baru sebanyak 3 mL lalu digojog
4. Akuades dibuang dan ditambahkan 3 mL medium eliminasi (Protokorm Anggrek : ½ NP cair tanpa gula + meropenem 25 ppm) (Kalus Telang : ½ MS cair tanpa gula + meropenem 50 ppm) lalu digojog kemudian dipindahkan ke konikel baru
5. Medium dibuang dan ditambahkan 3 mL medium eliminasi lalu digojog'
6. Medium dibuang dan ditambahkan 3 mL medium eliminasi
7. Konikel di wrap dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C dengan kecepatan 130 rpm
8. Proses eliminasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan selang waktu 24 jam (sesuai waktu inkubasi)

ACARA 10

TRANSFORMASI GENETIK (IV) Penanaman Hasil Transformasi pada Medium Seleksi

A. Tujuan :

Melakukan penanaman dan mengamati morfologi protokorm /kalus hasil transformasi pada medium seleksi.

B. Bahan: Protokorm hasil eliminasi, medium seleksi (Protokorm: NP padat + higromisin 10 ppm) (Kalus Telang : MS Padat + Higromisin 10 ppm), akuades steril

C. Alat: tabung konikel 50 ml, mikropipet, mikrotip, rak konikel, saringan teh, gelas beker, kertas saring, kain nilon, cawan petri, pinset, spatula, alkohol 70%

D. Cara Kerja :

1. Konikel yang berisi medium dan protokorm/kalus hasil eliminasi disiapkan
2. Medium di dalam konikel dibuang lalu ditambahkan 3 mL akuades steril
3. Protokorm ditiriskan di atas saringan teh yang dialasi kain nilon steril
4. Kain nilon berisi protokorm diletakkan ke dalam cawan petri yang dialasi kain saring steril
5. Protokorm/kalus dikering-anginkan
6. Protokorm/kalus dipindah ke dalam medium seleksi (Medium NP/MS padat + higromisin 10 ppm)
7. Pertumbuhan protokorm/kalus pada medium seleksi diamati selama 2 minggu

