

BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM MIKROTEKNIK TUMBUHAN Edisi Revisi III



Oleh:

Dr. Tri Mulyaningsih, M.Si

Sri Puji Astuti, S.Si., MSi



**LABORATORIUM BIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS MATARAM
2018**

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, berkat rahmat dan hidayah-Nya-lah buku Petunjuk Praktikum Mikroteknik Tumbuhan Edisi Revisi III dapat terselesaikan dengan baik. Revisi terjadi pada bahan specimen, bahan fixasi, senyawa kimia, metode pembuatan sediaan maserasidll. Revisi ini dimaksudkan untuk mengikuti perkembangan teknik pembuatan preparat yang terbaru. Buku petunjuk Praktikum ini disusun dengan tujuan membantu mahasiswa S1 Program Studi Biologi FMIPA Universitas Mataram, dalam memahami, melatih *skill*, dan melaksanakan matakuliah Mikroteknik. Selain itu, buku ini disusun dengan bahasa yang sangat komunikatif untuk memudahkan mahasiswa dalam mensinkronkan antara materi-materi perkuliahan dengan praktikum matakuliah Mikroteknik Tumbuhan.

Buku ini dilengkapi dengan teknik-teknik pengerjaan pembuatan preparat spesimen tumbuhan, baik Sediaan segar, Sediaan semi permanen, Sediaan permanen, Sediaan utuh, Sediaan kromosom, Maserasi tumbuhan, dan Fitokimia. Dalam setiap acara kegiatan telah dilengkapi dengan tugas mandiri maupun kelompok yang bertujuan agar mahasiswa dapat lebih memahami dan mengevaluasi hasil kerja setiap kegiatan.

Penulis berharap buku Petunjuk Praktikum Mikroteknik Tumbuhan ini dapat dimanfaatkan dengan semaksimal mungkin demi kemajuan, perkembangan ilmu dan *skill* di bidang mikroteknik tumbuhan. Evaluasi dan perbaikan akan terus dilakukan demi kesempurnaan buku praktikum ini.

Mataram, September, 2018
Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| Halaman Judul | i |
| Kata Pengantar | ii |
| Daftar Isi | iii |
| Tata Tertib Praktikum Mikroteknik Tumbuhan | iv |
| ACARA I : Sediaan segar | 1 |
| ACARA II : Sediaan semi premanen | 2 |
| ACARA III : Sediaan permanen | 3 |
| ACARA IV : Sediaan utuh | 8 |
| ACARA V : Sediaan kromosom | 10 |
| ACARA VI : Maserasi tumbuhan | 12 |
| ACARA VII : Mikrokimia | 14 |
| Daftar pustaka | 16 |

TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROTEKNIK TUMBUHAN

Tata tertib yang harus ditaati oleh setiap praktikan yang mengikuti kegiatan Praktikum Mikroteknik Tumbuhan, adalah sebagai berikut:

1. Setiap praktikan wajib mengenakan jas praktikum
2. Setiap praktikan wajib membawa alat tulis lengkap, buku petunjuk Praktikum Mikroteknik Tumbuhan.
3. Selama berlangsungnya praktikum praktikan wajib membisukan HP.
4. Praktikan tidak diperbolehkan makan dan menggunakan HP kecuali untuk keperluan praktikum mikrotek tumbuhan selama kegiatan praktikum berlangsung.
5. Praktikan tidak diperbolehkan membuat kegaduhan atau mengganggu rekan praktikan yang lain.
6. Setiap praktikan wajib mengerjakan praktikum mikrotek tumbuhan sendiri, selanjutnya membuat laporan pada buku kerja yang telah disediakan dan dikumpulkan kepada Co-Ass-nya masing-masing setiap selesai praktikum.
7. Demi kelancaran praktikum mikrotek tumbuhan, praktikan hendaknya membawa alat: silet baru dan kuas kecil sendiri.
8. Praktikan tidak diperbolehkan masuk ruang (tempat kegiatan berlangsungnya praktikum) lebih dari 15 menit dari jam Praktikum regular.

ACARA I SEDIAAN SEGAR

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) segar dari organ tumbuhan.

Alat:

1. Silet yang tajam
2. Jarum preparat
3. Kuas kecil
4. Gelas penutup
5. Gelas benda
6. Cawan petri
7. Pipet
8. Mikroskop

Pewarnaan: Safranin O 1% (Akl 50%).

Bahan:

1. Batang dan daun muda Bambu
2. Buah buncis (*Phaseolus vulgaris* L.)
3. Tangkai & helaian daun genjer (*Limnocharis flava* Buchenau)
4. Daun Kalanchoe (*Bryophyllum delagoense* (Eckl. & Zeyh.) Druce)
5. Tangkai & helaian daun ganyong (*Canna edulis* Ker Gawl.)
6. Kulit batang kelor (*Moringa oliafera* L.)

Alat Pengapit Spesimen:

Batang muda pace

Mounting: Aquades

Cara Kerja:

1. Potong ranting muda yang berdaun dipotong menggunakan cutter/ gunting stek.
2. Bekas potongan dibungkus dengan tissue basah, selanjutnya dimasukkan ke dalam plastik.
3. Siapkan batang pace muda, belah ke arah longitudinal.

4. Jepit spesimen dengan batang pace pada no.2, selanjutnya spesimen diiris melintang menggunakan silet, dengan arah mengiris ke-arah tubuh kita (iris melintang). Irisan sedapat mungkin setipis mungkin.
5. Siapkan petridish yang diisi air, kumpulkan irisan specimen ke dalam air dalam cawan petri.
6. Siapkan gelas benda, beri setetes air dengan menggunakan pipet, pilih irisan specimen yang paling tipis dan letakkan irisan tsb di atas tetesan air pada gelas benda .
7. Tutup irisan tsb dengan gelas penutup, dengan cara letakan gelas penutup pada gelas benda dengan sudut 45° , sentuhkan gelas penutup dengan air selanjutnya dengan bantuan jarum preparat ditutup perlahan, sehingga tidak terbentuk gelembung udara. Cek sediaan segar di bawah mikroskop, jika irisan telah tipis sekali, preparat difoto.
8. Untuk mewarnai sediaan, tetesan Safranin O 1% (alcohol 50%), melalui pinggiran gelas penutup. Diamkan 5 menit hingga sediaan terwarnai secara merata.
9. Cuci sediaan hingga cairan di dalam gelas penutup bening, hanya sediaan yang berwarna merah.

ACARA II SEDIAAN SEMI PERMANEN

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) semi permanen dari organ tumbuhan dan macam-macam mikroorganisme.

Alat:

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Silet yang tajam | 6. Pipet |
| 2. Jarum preparat | 7. Cawan petri |
| 3. Kuas kecil | 8. Mikroskop |
| 4. Gelas penutup berukuran 6,4 x2,5 cm | 9. Pinset ujung runcing |
| 5. Gelas benda No. 1 tebal 0,13 mm atau No.1,5 tebal 0,17 mm, berukuran 7,5x2,5 cm | |

Fiksatif dan pewarnaan:

Anilin blue ws – Lacto-phenol

Mounting:

1. Anilin blue ws – Lacto-phenol
2. Kutek atau parafin

Bahan:

Spesimen:

1. Kamedangan *Gyrinops versteegii*
2. Jamur tempe *Rhizophus cerreviceae*

Anilin blue ws – Lacto-phenol:

- | | | | |
|-------------------|-------|------------|-------|
| 1. Anilin blue ws | 1g. | 4. Phenol | 25g |
| 2. Glycerol | 25 ml | 5. Aquades | 25 ml |
| 3. Lactic acid | 25 ml | | |

Perekat: kutek

Cara Kerja:

1. Spesimen kamedangan *Gyrinops versteegii* diiris melintang menggunakan silet, dengan arah mengiris ke-arah tubuh kita. Irisan sedapat mungkin setipis mungkin. Untuk Jamur tempe, jamur diambil beberapa hifa saja menggunakan pinset ujung runcing.
2. Siapkan gelas benda, beri setetes Anilin blue ws – Lacto-phenol dengan menggunakan pipet di atas gelas benda tersebut.
3. Letakkan irisan melintang yang sangat tipis dari spesimen di atas tetesan Anilin blue ws – Lacto-phenol tersebut.
4. Tutup bahan preparat setengah premanen dengan gelas penutup.
5. Caranya letakkan gelas penutup pada gelas benda dengan sudut 45°, sentuhkan gelas penutup dengan Anilin blue ws – Lacto-phenol selanjutnya dengan bantuan jarum preparat ditutup perlahan, sehingga tidak terbentuk gelembung udara.
6. Pinggiran gelas penutup dilapisi menggunakan kutek atau paraffin.

ACARA III SEDIAAN PERMANEN.

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) permanen dari organ tumbuhan.

Alat:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Silet yang tajam | 8. Pipet |
| 2. Jarum preparat | 9. Gelas Baker |
| 3. Kuas kecil | 10. Pinset ujung runcing |
| 4. Mikrotom | 11. Mikroskop |
| 5. Botol specimen (botol pinisilin) | 12. Oven |
| 6. Gelas penutup untuk sediaan seri | 13. <i>Water bath</i> |
| 7. Gelas benda | 14. Mesin vakum dan eksikator |

Bahan:

Spesimen :

1. Akar, batang, daun Panggal Buaya (*Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) D.C.)
2. Akar, batang muda dan daun beringin (*Ficus benjamina*)
3. Akar, batang, daun Asam (*Tamarindus indica* L.)
4. Akar, batang, daun klicung (*Diospyros malabarica*)
5. Akar, batang, daun patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.)
6. Akar, batang muda dan bambu (*Bambusa vulgaris*).
7. , batang muda dan daun Garu purut

Larutan fiksatif Formadehyde (Formalin) 4% 100 ml

Pewarna Safranin O 1%:

1. Safranin O 1g.
2. Alkohol (50%) 99 ml

Pewarna Fast green FCF:

1. Fast green FCF 0,5g.
2. Alkohol (90%) 99 ml

Dehidrasi, Penjernihan, Infiltrasi, *Embedding*, Dealkoholisasi:

1. Alkohol absolut 0,5 L.
2. xylol 0,25 L
3. Parafin 250 g
4. N- Butanol 1 L

Larutan pembersih cleaning):

1. Alkohol 95% 100 ml
2. Acetic acid 3 tetes

Perekat (Adhesive) A:

1. Gelatin 1 g dilarutkan dalam air mineral pada suhu 40°C hingga homogen.
2. Tambahkan 2g phenol ke dalam larutan tersebut, aduk hingga homogeny, lalu disaring.

Perekat (Adhesive) B: Formalin 3%

Penutupan (mounting):

1. Entelan.

Cara Kerja:

1. Akar dan batang spesimen dipotong (tidak boleh serong) sepanjang 0,8 cm sedangkan daun specimen dipotong membujur 2mm salah satu sisi midrib, dan sisi lainnya selebar 8mm, selanjutnya dipotong 8mm.
2. Spesimen dimasukkan ke dalam larutan fiksatif formalin 4%.
3. Botol specimen masukkan ke dalam eksikator dan divakum, untuk mengeluarkan udara dari dalam jaringan.
4. Cuci specimen dengan air mineral 4 kali, step pertama didiamkan selama 1 jam dan step 3 dan 4 diamkan selama 30 menit.
5. Selanjutnya step dehidrasi dan infiltrasi, seperti pada table 1, berikut ini:

Tabel 1. Tahapan Dehidrasi

| No | N-Butanol | Ethanol | Aquades | Waktu (jam) | Re-used |
|----|-----------|---------|---------|-------------|---------|
| 1 | 0 | 50 | 50 | 4 | N |
| 2 | 10 | 40 | 50 | 4 | N |
| 3 | 20 | 50 | 30 | 4 | Y |
| 4 | 35 | 59 | 15 | 4 | Y |
| 5 | 55 | 45 | 0 | 4 | Y |
| 6 | 75 | 25 | 0 | 4 | Y |
| 7 | 100 | 0 | 0 | 4 | Y |
| 8 | 100 | 0 | 0 | 4 | Y |
| 9 | 100 | 0 | 0 | 4 | Y |
| 10 | 100 | 0 | 0 | 4 | Y |

6. **Infiltrasi**, tandai volume n-Butanol sebagai strip I dan tandai strip II dengan volume yang sama, masukkan Kristal paraffin hingga strip ke II.
7. Masukkan botol specimen tsb ke dalam oven, atur suhu 40°C diamkan selama 1 jam, 50°C diamkan selama 1 jam dan terakhir atur suhu 60 °C diamkan selama semalam. Cek volume paraffin dan tambahi jika volume paraffin berkurang.
8. Setelah n-Butanol telah menguap semuanya dan tinggal cairan paraffin, pindahkan ke cairan paraffin baru dan diamkan selama 1 jam simpan pada suhu 60 °C. Selanjutnya diganti lagi dengan cairan paraffin baru dan diamkan selama 24 jam simpan pada suhu 60 °C.
9. **Buat cetakan** paraffin menggunakan aluminium foil dengan ukuran panjang: lebar: tinggi = 1,5cm:1cm:1,5 cm.
10. Cairkan Kristal/ irisan paraffin dalam gelas piala di dalam oven pada suhu 60 °C.
11. **Embeding**. Tuang cairan paraffin ke dalam cetakan paraffin, ambil specimen dan masukkan ke dalam cetakan paraffin yang telah terisi cairan paraffin, atur sesuai dengan jenis irisan (transversal atau longitudinal).
12. Siip gelas benda dan gelas penutup dan rendam ke dalam larutan pembersih selama 24 jam, tiriskan dan lap dengan tissue, keringkan gelas benda dan penutup ke dalam oven pada suhu 60 °C, selanjutnya simpan dalam kotak.

13. Gelas benda yang telah bersih diberi 0,5 tetes perekat A, tetesan tersebut ditutup dengan gelas benda dan geser-geser hingga perekat rata di seluruh kedua permukaan gelas benda, lalu usap dengan jari telunjuk hingga rata benar, selanjutnya letakan di atas tutup water-bath pada suhu 55 °C hingga kering.
14. Rekatkan paraffin blok specimen pada plastic holder atau wood holder, menggunakan cairan paraffin.
15. **Penyayatan.** Bentuk permukaan paraffin blok specimen, bentuk empat persegi panjang yang mengikuti posisi specimen, atur agar sisi atas dan bawah empat persegi panjang tersebut sejajar, agar irisan dapat membentuk pita paraffin yang panjang saat disayat.
16. Pasang plastic atau wood holder pada holder mikrotom, atur ketebalan irisan 8 µm, Iris blok paraffin, sesuai dengan SOP mikrotom tersebut.
17. Siapkan gelas benda yang telah diolesi perekat A, beri 3 tetes perekat B, pilih pita paraffin yang berisi specimen yang bagus, potong sepanjang gelas benda dan letakkan diatas tetesan perekat B, hingga pita paraffin meregang dan rata tanpa terjadi pengkerutan.
18. Letakan gelas benda tersebut di atas tutup water bath yang suhunya 55 °C hingga kering dan pita paraffin berubah menjadi bening.
19. **Penghilangan paraffin (dewax).** Masukkan Jar n-Butanol ke dalam oven yang bersuhu 60 °C, hingga n-Butanol suhunya mencapai 60 °C.
20. Masukkan gelas benda yang telah ditemplei pita paraffin ke dalam Jar n-Butanol (no. 19), diamkan selama 1 jam. Pindahkan gelas benda tersebut pada Jar n-Butanol yang baru, diamkan 1 jam.
21. **Pewarnaan ganda (double staining).** Proses ini mengikuti urutan yang terdapat pada table 2., berikut ini:

Tabel 2. Tahapan proses penghilangan parafin pada sayatan spesimen (*dewax*).

| No | Senyawa Kimia | Waktu (menit) |
|----|-----------------------|---------------|
| 1 | Xylene | 10 |
| 2 | Xylene | 10 |
| 3 | Xylene : 100% Ethanol | 5 |
| 4 | 100% Ethanol | 5 |
| 5 | 95% Ethanol | 5 |
| 6 | 75% Ethanol | 5 |

Tabel 3. Tahapan proses Pewarnaan Ganda (*double staining*)

| No | Senyawa Kimia | Waktu (menit) |
|----|---------------------|---------------|
| 1 | 50% Ethanol | 5 |
| 2 | Safranin O 1% (50%) | 4 jam |
| 3 | 50% Ethanol | 1 |
| 4 | 75% Ethanol | 1 |
| 5 | 95% Ethanol | 1 |
| 6 | 100% Ethanol | 1 |
| 7 | Fast Green | 45-60 |
| 8 | 95% Ethanol | 1 |
| 9 | 100% Ethanol | 1 |

Tabel 4. Tahapan proses penjernihan (*Clearing*)

| No | Senyawa Kimia | Waktu (menit) |
|----|------------------------|---------------|
| 1 | 100% Ethanol:N-Butanol | 1 |
| 2 | N-Butanol | 1 |
| 3 | N-Butanol:Xylene | 1 |
| 4 | Xylene | 1 |
| 5 | Mounting | 1 |

ACARA IV SEDIAAN UTUH

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) utuh dari sediaan jaringan epidermis dan stomata daun.

Alat:

1. Silet
2. Jarum preparat
3. Kuas kecil
4. Mikroskop
5. Botol specimen (botol pinisilin)
6. Gelas penutup
7. Gelas benda
8. Pipet
9. Cawan petri
10. Pinset ujung runcing
11. *Water bath*

Bahan:

Spesimen:

Kelompok A.

1. Daun *Canna*
2. Daun soka (*Ixora* sp.)
3. Daun sawi hijau/ caisim (*Raphanus* sp.)
4. Daun padi (*Oryza sativa*)
5. Daun *Isodon rubescens*

Kelompok B

6. Daun Bambu (*Bambusa* sp.)
7. Daun beringin (*Ficus benjamina*)
8. Daun mangga (*Mangifera indica*)
9. Daun Banten (*Lannea* sp.)
10. Daun *Euphorbia hirta*

Bahan fiksatif I: Hydrochloric Acid 25% (alcohol 95%):

11. Alkohol (95%) 75 ml.
12. Hydrochloric acid 25 ml

Bahan fiksatif II: Hydrochloric Acid 10% (Aq):

1. Air mineral 90 ml.
2. Hydrochloric acid 10 ml

Larutan Pemisah: Larutan Sodium hidroksida (NaOH) 8% (Aq)

Pewarna : Safranin O 1 % (Alkohol 50%)

Bahan mounting: Enthelan

Cara Kerja:

1. Daun dipotong-potong 5-10 mm, rendam ke dalam larutan fiksatif Alkohol-Hydrochloric Acid 25% selama 24 jam.
2. Cuci alkohol 95%, untuk menghilangkan klorofil.
3. Pindahkan ke alkohol 70% diamkan selama 5 menit,
4. Pindahkan ke alcohol 50% diamkan selama 5 menit,
5. Pindahkan ke larutan NaOH (8%), selama 45 menit atau sampai jaringan membengkak dan epidermis dapat dipisahkan dari tulang daun masukan ke dalam water-bath dengan suhu 60 °C.
6. Cuci perlahan pada air mengalir selama (20- 120 menit), dengan cara epidermis ditampung dalam gelas beker, tutup dengan Petridis.
7. Pindahkan ke larutan Hydrochloric acid (10%aq).
8. Cuci menggunakan air mengalir.
9. Letakan specimen dalam cawan petri yang berisi air, cubit epidermis atas dan bawah, letakkan berdampingan pada gelas benda dengan posisi tertelungkup, tetesi specimen dengan air.
10. Warnai dengan safranin O % selama 5 menit.
11. **Dehidrasi:** Pindahkan ke alkohol 50% simpan selama 10 detik
12. Pindahkan ke alkohol 70% simpan selama 10 detik
13. Pindahkan ke alkohol 90% simpan selama 10 detik
14. Pindahkan ke alkohol 100% simpan selama 10 detik
15. **Pernjernih:** Pindahkan ke alkohol 100%: N-butanol 100%=1:1 simpan selama 10 detik

16. Pindahkan ke n-Butanol 100% simpan selama 10 detik
17. Pindahkan ke Xylol 100%: N-butanol 100%=1:1 simpan selama 10 detik
18. Pindahkan ke xylol simpan selama 10 detik
19. Pindahkan setiap lapisan daun ke dalam gelas benda dan tetesi dengan enthelan.

ACARA V SEDIAAN KROMOSOM

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) kromosom pada fase mitosis pada akar dan meiosis pada anthera.

Alat:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Mikroskop | 9. Pipet |
| 2. Jarum preparat | 10. Gelas Baker |
| 3. Tissue | 11. Pinset ujung runcing |
| 4. Pensil berpenghapus | 12. Lampu bunsen |
| 5. Botol specimen (botol pinisilin) | 13. Oven |
| 6. Silet | |
| 7. Gelas penutup berukuran | |
| 8. Gelas benda | |

Bahan:

Spesimen:

1. Akar putih (*Alium sativum*)
2. Akar bawang merah (*Alium cepa* var. *aggregatum*)
3. Akar *Phaleria* sp.
4. Akar, batang, daun klicung (*Diospyros malabarica*)

Bahan fiksatif I [(Acetic acid 45% (alk 100%)]: disimpan(15menit), pada suhu 5°C (di dalam Freesher):

- Acetic acid (glacial) 45 ml
- Alcohol (100%) 55 ml

Bahan fiksatif II [(Acetic acid 25% (alk 100%)]: larutan Clarke A (1-24 jam) disimpan di dalam refreegerator (kulkas):

- Acetic acid (glacial) 25 ml

- Alcohol (100%) 75 ml

Bahan Larutan hidrolisis.

- Alkohol 100% 100 ml
 - Hydrochloric acid 10 ml
- Larutan hidrolisis
Diamkan 5-6 menit

Pewarnaan:

Carmine-acetic:

1. Acetic acid (glacial) 45 ml
 2. Carmine (powder) 1g
 3. Aquades 55 ml
- Larutkan Carmine-acetic,
didihkan dalam ruang asam,

atau larutan stok *Orcein-acetic* (Aceto-Orcein):

1. Acetic acid (glacial) 100ml
 2. Orcein 2,2g
 3. Aquades 12 ml
 4. Larutan stok 10 ml
- Larutan stok
- Pewarna Aceto-Orcein

Bahan mounting:

- Glycerol (gliserin)

Cara Kerja:

1. Potonglah ujung akar yang masih tumbuh sepanjang 0,5 cm -0,8 cm.
2. Masukkan potongan akar ke dalam larutan fiksatif I, simpan selama 15 menit di dalam freesher.
3. Pindahkan ke larutan fixative II, simpan selama 24 jam di dalam refrigerator (kulkas).
4. Pindahkan ke dalam larutan hidrolisis simpan selama 6 menit, pada suhu 60°C di dalam *water bath*.
5. Pindahkan ke dalam larutan pewarna Aceto-Orcein simpan selama 15-20 menit, pada suhu 50°C di dalam *water bath*.
6. Siapkan gelas benda yang telah dibersihkan dengan alcohol 95%, ambil specimen pada no 6, letakan di atas gelas benda, beri 0,5 tetesi gliserin.
7. Tutup specimen menggunakan gelas penutup, di atas gelas penutup tersebut diberi kertas tissue sebagai pelapis.

8. Selanjutnya specimen di geprek dengan pensil berpenghapus, sampai sel-selnya terpisah-pisah selanjutnya disquash menggunakan jempol, cek di bawah mikroskop dengan perbesaran 16 x 10 dan 16X45.
9. Hangatkan sediaan ($\pm 50^{\circ}\text{C}$) di atas api Bunsen, lalu didinginkan hingga pewarnaan terlihat kontras.
10. Fotolah sediaan kromosom tersebut.

ACARA VI MASERASI TUMBUHAN

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) maserasi pada daun tumbuhan.

Alat:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Silet | 8. Pipet |
| 2. Jarum preparat | 9. Cawan petri |
| 3. Kuas kecil | 10. Pinset ujung runcing |
| 4. Mikroskop | 11. Water bath |
| 5. Botol specimen (botol pinisilin) | 12. Tissue |
| 6. Gelas penutup | |
| 7. Gelas benda | |

Bahan:

Spesimen :

1. Akar, batang, daun Pangkal Buaya (*Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) D.C.)
2. Akar, batang, daun kelor (*Moringa oliafera* L.)
3. Batang Akar, batang, daun Asam (*Tamaridus indica* L.)
4. Batang muda bambu (*Bambusa vulgaris*).
5. Akar, batang, daun klicung (*Diospyros malabarica*)
6. Batang muda belinjo (*Gnetum gnemon*)

Bahan fiksatif Eau de Javelle:

- | | |
|---------------------|--------|
| 10. Bubuk pemutih | 20 g |
| 11. Air mineral | 100 ml |
| 12. Sodium carbonat | 15 g |
| 13. Air mineral | 100 ml |

} Biarkan beberapa jam, lalu tambahkan lart. no 12

Bahan Fixatif Asam asetat-peroksida

14. Asam khromat 50 ml

15. Peroksida 50 ml

Pewarna: 16. Safranin O 1% (Akl 50%)

Bahan mounting:

17. Enthelan

Cara Kerja:

x

Maserasi berkas pengangkut pada jaringan xylem batang spesimen tersebut pada bahan praktikum

- Batang spesimen dikupas kulitnya, dipotong-potong 8 mm, fiksasi menggunakan larutan formalin 4%.
- Spesimen dicuci dengan air mineral.
- Spesimen dibelah-belah bagian xylemnya, lalu direndam ke dalam larutan maserasi, simpan selama (24-28 jam).
- Cuci perlahan pada air mengalir (24 jam)

Selanjutnya dilakukan tahapan pewarnaan, dehidrasi, penjernihan dan *mounting*, seperti berikut, ini:

1. Warnai dengan safranin O % selama 5 menit.
2. Pindahkan ke alkohol 50% simpan selama 10 detik
3. Pindahkan ke alkohol 70% simpan selama 10 detik
4. Pindahkan ke alkohol 90% simpan selama 10 detik
5. Pindahkan ke alkohol 100% simpan selama 10 detik
6. Pindahkan ke alkohol 100%: N-butanol 100%=1:1 simpan selama 10 detik
7. Pindahkan ke n-Butanol 100% simpan selama 10 detik
8. Pindahkan ke Xylol 100%: N-butanol 100%=1:1 simpan selama 10 detik
9. Pindahkan ke xylol simpan selama 10 detik
10. Pindahkan sediaan sel-sel vasal pada gelas benda dan tetesi dengan enthelan.

ACARA VII HISTOKIMIA (*HISTOCHESTRY*)

Tujuan:

Membuat sediaan (preparat) mikrokimia (butir amilum, lignin, callose, tannin dan fruktosa)

Alat:

- | | |
|-------------------|-------------------------|
| 1. Silet | 8. Mikroskop |
| 2. Jarum preparat | 9. Pinset ujung runcing |
| 3. Kuas kecil | 10. Pipet |
| 4. Cawan petri | 11. Tissue |
| 5. Gelas penutup | |
| 6. Gelas benda | |

Penjernih Gelas Benda

Alkohol 96%

Pewarnaan/Ppereaksi:

Pewarnaan Iodine, Lugol's

Penghilang pewarnaan Sulfuric acid (50%):

Pewarnaan Laevulosa:

Mounting:

Aquades

Bahan:

Spesimen:

1. Akar, batang, daun pace (*Morinda catartica* L.)
2. Akar, batang, daun klicung (*Diospyros malabarica*)
3. Akar, batang, daun Panggal Buaya (*Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) D.C.)
4. Akar, batang, daun kelor (*Moringa oliafera* L.)
5. Akar, batang, daun sirsak (*Annona muricata* L.)

6. Akar, batang, daun Asam (*Tamarindus indica* L.)
7. Akar, batang, daun patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.)
8. Akar, batang, daun kaki kuda (*Centella asiatica* (L.) Urb.)

Tabel 5. Tahapan membuat histokimia pada Tumbuhan.

| No | Senyawa yang dicari | Reagen yang digunakan (Warna pereaksi) | Warna yang dihasilkan | Pustaka |
|----|-------------------------------|---|------------------------|---|
| 1 | Lipids | Sudan IV 0.1% | Orange-merah | |
| | Minyak, suberin, lilin, Kutin | Sudan Black B 0.1% (70% Alk) | Biru tua ayau hitam | Jansen, 1962 Ferreira, <i>et al.</i> , 2017 |
| 2 | Sequiterpenes Lactones | H ₂ SO ₄ 25% | Orange | |
| | Ca-Oxalat | H ₂ SO ₄ 25% | | Kalaskar, <i>et al.</i> , 2017 |
| 3 | Amilum | Lugol | Biru kehitaman | Jansen, 1962 Kuster & Vale, 2016 |
| 4 | Lignin di dalam dinding sel | Wiesner's test: a. Phloroglucinol 1% (Alk 95%) (5menit) b. HCl 18% (Aq) = 1:1, rendam 1-5 menit, tuang ke botol tampung. Mount + HCl 18% (Aq) | pink | Kisser and Lohwag, 1938 Johansen, 1940 Ferreira, <i>et al.</i> , 2017 |
| 5 | Alkaloid | Wagner reagent: I (1.27 gm) + KI (2gm)+Aq (100ml) | Coklat kemerah-merahan | Neelima, <i>et al.</i> , 2011 |
| | Senyawa fenolik | a. Ferric trichloride (FeCl ₃) 5%, b. (FeCl ₃) 3%,(5-15 menit) (polyphenol) | Hijau tua hitam | Johansen 1940 Ferreira, <i>et al.</i> , 2017 Perkin, <i>et al.</i> , 1897 |

Bahan mounting:

1. Aquades, atau lihat table.

Cara Kerja:

Melihat kandungan amilum dalam sel.

1. Iris melintang spesimen, letakkan pada gelas benda dan tetesi dengan larutan pereaksi warna *step by step* (lihat table), cuci menggunakan air mengalir, tutup dengan gelas penutup.
2. Periksa menggunakan mikroskop, butir yang berwarna ungu atau biru kehitaman menunjukkan kandungan senyawa yang ada di dalam jaringan spesimen. Foto senyawa di dalam jaringan tersebut.
3. Buatlah laporan proses pembuatan histokimia yang anda lakukan pada buku kerja dan tempelkan foto jaringan spesimen hasil perlakuan histokimia pada buku kerja.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferreira BG, R. Falcioni, L.M. Guedes & S.C. Avritzer. 2017. Preventing false negatives Histochemical detection of phenolics and lignins in PEG-Embedded plant tissues. *Journal of histochemistry & cytochemistry*, 65 (2) 105-116.
2. Kalaskar, M.G., A.U. Tatiya, J.J. Lamale & S.J. Surana. 2017. Morpho-anatomical studies of *Euphorbia heterophylla* Linn. Leaves.
3. Kuster, V.C & F.H.A. Vale, 2016. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. *Journal Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26: 673-678.
4. Mulyaningsih, T. 2016. Hand out workshop microscopic preparation of interxylary phloem. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mataram University.
5. Neelima, N., N.G. Devidas, M. Sudhakar, & J.V. Kiran. 2011. A Preliminary phytochemical investigation on the leaves of *Solanum xanthocarpum*. *IJRAP*, 2(3): 845-850.
6. O'Brien, T.P. dan M.E. McCully. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi PTY. LTD. Melbourne.
7. O'Brien, T.P., Sutasurya, L. A. and Goenarso, D. 1994. Hand out Microtechnique course. Mataram University, Mataram.
8. Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry. San Francisco: W.H. Freeman.
9. Johansen, D. A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
10. Peacock, P. and S. Bradbury, 1973. Peacock's elementary microtechnique. 4th edts. The Pitman Press, Bath. Great Britain.
11. Perkin AG. 1897. The yellow colouring principles of various tannin matters. *J Chem Soc London*. Pp: ;71:1131-8