



HISTOKIMIA TUMBUHAN

PENULIS
TRI MULYANINGSIH
ERNIN HIDAYATI
KURNIASIH SUKENTI
AIDA MUSPIAH
RINA KURNIANINGSIH

TRI MULYANINGSIH, DKK

HISTOKIMIA TUMBUHAN

Buku ini dibuat berdasarkan adanya isu strategis tentang penggalan manfaat tumbuhan untuk keperluan pembuatan obat kimiawi, obat tradisional ataupun jamu, pangan fungsional termasuk berbagai macam minuman seperti teh, minuman herbal, minuman imunomodulator, pewarna tekstil, bakterisida, fungisida, pestisida, antiherbivora dll. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat herbal terus meningkat, World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa sekitar 80% penduduk di dunia masih bergantung kepada obat-obatan herbal. Selama masa dekade terakhir, sistem obat-obatan secara tradisional sudah menjadi topik perbincangan dunia. Perkiraan saat ini menunjukkan bahwa, di banyak negara berkembang sebagian besar masyarakatnya mengandalkan tumbuhan obat sebagai kebutuhan untuk menjaga kesehatannya.

menunjukkan bahwa, di banyak negara berkembang

nasmedia
PENERBIT ANGGOTA IKAPI
Batua Raya No. 550 Makassar 90233
Tajem Baru No. 11 Yogyakarta 55281
+62812 1313 3800
redaksi@nasmediapustaka.id
www.nasmediapustaka.co.id
www.nasmedia.id



HISTOKIMIA TUMBUHAN

**TRI MULYANINGSIH
ERNIN HIDAYATI
KURNIASIH SUKENTI
AIDA MUSPTAH
RINA KURNIANINGSIH**



Sanksi Pelanggaran Hak Cipta
UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA

Ketentuan Pidana

Pasal 113

- 1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
- 2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- 3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- 4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

HISTOKIMIA TUMBUHAN

**TRI MUL?ANINGSIH
ERNIN HIDAYATI
KURNIASIH SUKENTI
AIDA MUSPIAH
RINA KURNIANINGSIH**



HISTOKIMIA TUMBUHAN

**Tri Mulyaningsih
Aida Muspiah
Kurniasih Sukenti
Ernin Hidayati
Rina Kurnianingsih**

Copyright © Tri Mulyaningsih, Dkk. 2021
All right reserved

Layout : Rizaldi Salam
Design Cover : Muhammad Alim & Yusuf Sumomulyo

Image Cover
Freepik.com

Cetakan Pertama, Maret 2021
xiv + 97 hlm; 14,5 x 20.5 cm
ISBN 978-623-6941-37-9

Diterbitkan oleh Penerbit Nas Media Pustaka

CV. Nas Media Pustaka

Anggota IKAPI

No. 018/SSL/2018

Jl. Batua Raya No. 550, Makassar 90233
Maguwoharjo, Sleman, Yogyakarta 55281

Telp. 0812-1313-3800

redaksi@nasmediapustaka.id

www.nasmediapustaka.co.id

www.nasmedia.id

Instagram : @nasmedia.id

Fanspage : nasmedia.id

Dicetak oleh Percetakan CV. Nas Media Pustaka

Isi di luar tanggung jawab percetakan

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	v
KATA PENGANTAR	ix
PENDAHULUAN	1
PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA	6
HISTOKIMIA ALKALOID	16
HISTOKIMIA KRISTAL CALSIUM OXALATE.....	22
HISTOKIMIA FLAVONOID	27
HISTOKIMIA GLUKOSIDA	34
HISTOKIMIA LEMAK (LIPID).....	36
HISTOKIMIA LIGNIN	42
HISTOKIMIA PATI (AMYLUM)	50
HISTOKIMIA PROTEIN	56
HISTOKIMIA SENYAWA FENOLIK (PHENOLIC COMPOUND).....	62
HISTOKIMIA RESIN DAN MINYAK ATSIRI.....	67
HISTOKIMIA SAPONIN	68
HISTOKIMIA SESQUITERPENE	71
HISTOKIMIA TANIN	74
HISTOKIMIA TERPENOID.....	81
DAFTAR PUSTAKA.....	87

DAFTAR GAMBAR

1. Alkaloid pada kulit buah <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun	20
2. Alkaloid pada batang <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun	20
3. Alkaloid pada helaian daun <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun	21
4. Kristal Ca-Oxalate di dalam daun dan kulit buah <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun. Keterangan: A. helaian daun, B. Kulit buah; tanda panah kristal Ca-Oxalate.....	26
5. Kristal Ca-Oxalate di dalam batang <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun. Keterangan: C. Jaringan korteks, E. Jaringan empulur; Pc. Parenkim korteks; PP. parenkim empulur; Rdc. Sel dilatasi jari-jari empulur; tanda panah kristal Ca-Oxalate.....	26
6. Flavonoid di dalam kulit buah <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Sayatan kulit buah + 10% NaOH (aq.)	33
7. Flavonoid di dalam batang <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Sayatan batang + 10% NaOH (aq.).....	33
8. Lemak/lipid di dalam helaian daun <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun. Keterangan: Ep. Epidermis, Pp. Palisade parenkim, Sp. Spons parenkim, Tanda panah pendek tetes lemak	40
9. Lemak/lipid di dalam kulit buah <i>Gyrinops versteegii</i> grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Sayatan melintang kulit buah + Sudan III 1M (alk 95%)	40

10. Lemak/lipid di dalam kaliks dan stipes *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang kaliks, B. Irisan melintang stipes, tanda panah adanya lemak.....41
11. Lignin di dalam batang *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Irisan melintang batang+ Lugols+Sulphate acid 25%, C. Irisan melintang batang + Phloroglucinol+HCl 18% (aq.)47
12. Lignin di dalam helaian daun *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Irisan melintang lamina+ Lugols+Sulphate acid 25%, nerve terwarnai coklat kemerahan, C. Irisan melintang lamina + Phloroglucinol+HCl 18% (aq.), nerve terwarnai ungu.....48
13. Lignin di dalam midrib daun *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Irisan melintang midrib + Lugols+Sulphate acid 25%, xylem terwarnai coklat kemerahan, C. Irisan melintang midrib + Phloroglucinol+HCl 18% (aq.), xylem terwarnai ungu.....48
14. Lignin di dalam tangkai daun *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Kontrol, B. Irisan melintang petiole + Lugols+Sulphate acid 25%, xylem terwarnai coklat kemerahan, C. Irisan melintang petiole + Phloroglucinol+HCl 18% (aq.), xylem terwarnai ungu.....49
15. Pati di dalam daun *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang midrib + Lugols, B. Irisan melintang lamina + Lugols, tanda panah, pati terwarnai biru kehitaman.....54
16. Pati di dalam tangkai daun dan endosperm biji *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang petiole + Lugols, B. Irisan melintang endosperm + Lugols, tanda panah, pati terwarnai biru kehitaman55

17. Pati di dalam batang *Gyrinops versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. Irisan melintang batang + Lugols , tanda panah, pati terwarnai biru kehitaman.....55
18. Protein di dalam batang *Gyrinops versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. Irisan melintang batang + air suling,
B. Irisan melintang batang + 10% HgCl₂-0.01%
Bromophenol Blue (aq), tanda panah, protein terwarnai biru tua59
19. Protein di dalam biji *Gyrinops versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. Irisan melintang batang + air suling,
B. Irisan melintang batang + 10% HgCl₂-0.01%
Bromophenol Blue (aq), tanda panah, protein terwarnai biru tua60
20. Protein di dalam tangkai daun *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: Irisan melintang petiole + 10% HgCl₂-0.01% Bromophenol Blue (aq), tanda panah, protein terwarnai biru tua.60
21. Protein di dalam daun *Gyrinops versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. Irisan melintang lamina + 10% HgCl₂-0.01% Bromophenol Blue (aq), B. Irisan melintang midrib + 10% HgCl₂-0.01% Bromophenol Blue (aq), tanda panah, protein terwarnai biru tua61
22. Protein di dalam kaliks dan stipes *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang kaliks + 10% HgCl₂-0.01% Bromophenol Blue (aq), B. Irisan melintang Stipes + 10% HgCl₂-0.01% Bromophenol Blue (aq), tanda panah, protein terwarnai biru tua61
23. Saponin di dalam kulit buah *Gyrinops versteegii* grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang kulit buah + air suling, B. Irisan melintang kulit buah + 25% H₂SO₄ (aq.)... 70

24. Saponin di dalam batang *Gyrinops versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. Irisan melintang batang + air suling,
B. Irisan melintang batang + 25% H₂SO₄ (aq.) 70
25. Sequiterpene lactone di dalam batang *Gyrinops versteegii*
grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang batang +
25% H₂SO₄ (aq.), tanda panah Sequiterpene lactone
terdeteksi warna jingga-merah bata 72
26. Sequiterpene lactone di dalam batang *Gyrinops versteegii*
grup Soyun. Keterangan: A. Irisan melintang kulit buah +
air suling, B. Irisan melintang kulit buah + 25% H₂SO₄
(aq.), tanda panah Sequiterpene lactone terdeteksi
warna jingga..... 73
27. Sequiterpene lactone di dalam Kaliks dan Stipes *Gyrinops*
versteegii grup Soyun. Keterangan: Irisan melintang
Kaliks dan Stipes + 25% H₂SO₄ (aq.), tanda panah
Sequiterpene lactone terdeteksi warna merah bata- jingga. 73
28. Tanin di dalam daun *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. menggunakan reagen Vanillin
(0.5% HCl); B. reagen 10% FeCl₃ (aq.) 79
29. Tanin di dalam tangkai daun *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. menggunakan reagen Vanillin
(0.5% HCl); B. Reagen 10% FeCl₃ (aq.)..... 79
30. Tanin di dalam kulit buah *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. menggunakan reagen Vanillin
(0.5% HCl); B. reagen 10% FeCl₃ (aq.) 80
31. Tanin di dalam kulit buah *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan: A. menggunakan reagen Vanillin
(0.5% HCl); B. reagen 10% FeCl₃ (aq.) 80

32. Terpenoid di dalam batang *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan: Irisan melintang batang + reagen Nadi,
tanda panah terpenoid84
33. Terpenoid di dalam helaian daun *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan : Irisan melintang lamina + reagen Nadi,tanda
panah terpenoid84
34. Terpenoid di dalam midrib daun *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan: Irisan melintang midrib + reagen Nadi, tanda
panah terpenoid85
35. Terpenoid di dalam midrib daun *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan : Irisan melintang midrib + reagen tembaga
sulfat, tanda panah terpenoid.....85
36. Terpenoid di dalam kulit buah *G. versteegii* grup Soyun.
Keterangan : Irisan melintang midrib + reagen Nadi, tanda
panah terpenoid86

PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah, atas ridho-Nya lah pembuatan buku yang berjudul: “Histokimia Tumbuhan”, dapat terselesaikan. Buku ini dibuat berdasarkan adanya isu strategis tentang penggalan manfaat tumbuhan untuk keperluan pembuatan obat kimiawi, obat tradisional ataupun jamu, pangan fungsional termasuk berbagai macam minuman seperti the, minuman herbal, minuman imunomodulator, pewarna tekstil, bakterisida, fungisida, pestisida, antiherbivora dll. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat herbal terus meningkat, World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa sekitar 80% penduduk di dunia masih bergantung kepada obat-obatan herbal. Selama masa dekade terakhir, sistem obat-obatan secara tradisional sudah menjadi topik perbincangan dunia. Perkiraan saat ini menunjukkan bahwa, di banyak negara berkembang sebagian besar masyarakatnya mengandalkan tumbuhan obat sebagai kebutuhan untuk menjaga kesehatannya. Meskipun obat modern sudah ada pada negara tersebut, namun harganya lebih mahal dan memiliki efek samping. Obat herbal lebih sering digunakan oleh masyarakat secara turun temurun di negara berkembang (Dorly, *et al.*, 2015). Di Indonesia dan dunia penyakit infeksius menduduki rangking ke 4, setelah penyakit jantung, Diabetes dan cancer.

Buku ini menyediakan tata cara penelitian yang berkaitan dengan farmakologi tentang histokimia, untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit primer dan sekunder di dalam sel atau jaringan dari berbagai tanaman. Prinsip kerja dari histokimia adalah mereaksikan senyawa target dari salah satu macam senyawa metabolit primer dan sekunder (substansi ergastik) dengan reagen khusus sehingga akan muncul warna spesifik yang merupakan indikator keberadaan senyawa target tersebut. Metode ini merupakan salah satu bentuk awal untuk

mengetahui jenis kandungan fitokimia dan lokasinya di dalam sel atau jaringan tumbuhan.

Dengan adanya buku ini penulis berharap dapat menjadi buku pegangan untuk mempermudah bagi para peneliti, dosen, mahasiswa untuk melakukan penelitian.

Buku ini kami persembahkan kepada
Kedua orangtua kami
Guru-guru kami
Suami
&
Anak-anak kami

PENDAHULUAN

Sudah sejak berabad-abad lama nenek moyang bangsa Indonesia telah mengenal tanaman obat baik yang berupa pengalaman yang diamalkan secara turun temurun, maupun tersimpan secara tertulis berupa buku pustaka, yang tersimpan di perpustakaan pada umumnya maupun pustaka khusus, seperti perpustakaan keraton yang tersebar diseluruh Indonesia.

Heyne (1987), telah memberikan kontribusi yang berharga pengetahuan tentang kemanjuran dari tanaman obat asli Indonesia. Dengan demikian banyak muncul pabrik jamu tradisional seperti jamu cap Djago, Jamu sido Muncul, Jamu Nyonya Menir, Jamu Air Mancur dan lain-lainnya. Jamu tersebut mempunyai ramuan dari tanaman obat yang berasal dari tumbuhan yang tumbuh di Indonesia.

Histokimia adalah cabang dari anatomi tumbuhan yang berhubungan dengan identifikasi bahan kimia komponen sel dan jaringan. Sehingga pengetahuan ini banyak digunakan untuk mendeteksi kandundungan metabolit primer dan sekunder atau substansi atau senyawa ergastik di dalam organ tumbuhan, untuk

PENDAHULUAN

keperluan pembuatan jamu, obat baik tradisional maupun modern, industri tekstil (warna tektil), pestisida, antiherbivora, antibakteri, antifungi dan lain-lain. Senyawa metabolit primer yang terkandung di dalam organ tumbuhan seperti pati, protein, lipid dan lain-lain dan contoh senyawa metabolit sekunder yang sering dijumpai di dalam organ tumbuhan antara lain adalah alkaloid, flavanoid, senyawa fenol, glukosida, kristal Ca-Oxalat, lignin, minyak atsiri, resin, saponin, sesquiterpene, tanin, terpenoid dan lain-lain.

Seperti pengendapan pati (amilum) di dalam tumbuhan terjadi secara luas di jaringan organ tumbuhan, pati tersebut dapat dideteksi lokasinya menggunakan metode ini. Tempat-tempat yang sangat umum pati terakumulasi di dalam biji, parenkim jaringan pembuluh darah sekunder di batang dan akar, umbi, rimpang dan jagung (Kadam, 1999). Pati dan protein adalah senyawa ergastik utama dari protoplas (Kuster, 1956), dan tannin adalah kelompok turunan fenol heterogen, biasanya terkait dengan glukosida. Tanin adalah sangat melimpah di daun (xilem) dari banyak tumbuhan (Kadam *et.al.*, 1996). Saponin adalah senyawa yang langka, tidak semua jaringan ditemukan. Lemak biasanya tersebar luas di dalam tubuh tumbuhan dan lemak biasanya terakumulasi dalam jumlah kecil dalam sel tumbuhan (Seifriz, 1936). Lemak merupakan bahan cadangan yang umum di dalam biji, spora dan embrio dan sel meristematik. Glukosida adalah produk degradasi karbohidrat, sedangkan alkaloid produk degradasi protein. Kebanyakan tumbuhan berkayu mengandung material obat yang berasal dari senyawa metabolit sekunder penting (Dhar *et.al.*, 1968).

Alkaloid biasanya terakumulasi di dalam sel perikarp, dari spesies *Solanum*, hal ini berhubungan dengan penggunaan tanaman tersebut sebagai obat tradisional untuk mengontrol diabetes (Farina, *et al.*, 2010). Alkaloid adalah prekursor dalam obat sintesis kortikosteroid (Goswami, *et al.*, 2003), yang mungkin terkait dengan rekomendasi buah *Solanum lycocarpum* sebagai anti inflamasi (Vieira, *et al.*, 2003)

PENDAHULUAN

dan kemungkinan terkait dengan rantai terpena dari glikokaloid steroid hipoglikemik (Yoshikawa, *et al.*, 2007). Asam klorogenat alkaloid menghambat aktivitas maltase di spesies

S. palinacanthum, dan menurunkan pelepasan glukosa ke dalam darah (Pereira *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011 dalam Matias *et al.*, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa ada kemungkinan untuk menggunakan spesies ini guna mengendalikan diabetes, yang belum dieksplorasi secara tradisional.

Alkaloid juga secara eksplisit diproduksi oleh genus *Psychotria*. *Psychotria* merupakan genus terbesar dalam tribus Psychotriaceae (Rubiaceae) yang meliputi kurang lebih 2000 spesies (David *et al.*, 2001 dalam Moraes, *et al.*, 2011). *Psychotria* adalah tumbuhan semak, atau tanaman kecil yang berkhasiat rempah, tersebar di daerah tropikal dan subtropikal (Taylor, 1996 dalam Moraes, *et al.*, 2011). Spesies dari genus tersebut hidup di lantai belantara, merupakan tumbuhan bawah yang menyenangi lingkungan teduh, dan lebih menyukai tanah yang relatif basah (Moraes, *et al.*, 2011).

Senyawa flavonoid berkhasiat sebagai anti mikroba, misalnya flavonoid yang terkandung dalam daun *S. paniculatum* (Pereira *et al.*, 2008 dalam Matias *et al.*, 2016). Akumulasi flavonoid dalam *S. paniculatum* juga berfungsi sebagai antioksidan (Ribeiro, *et al.*, 2007 dalam Matias *et al.*, 2016). Terkait dengan kandungan terpenoid, saponin, dan alkaloid di dalam *S. behulacea* tanaman ini, sehingga tanaman ini memiliki kasiat hipotensi (Ribeiro *et al.*, 2002 dalam Matias *et al.*, 2016).

Flavonoid juga merupakan antioksidan yang secara efisien dapat menangkap zat reaktif oksigen serta mengurangi ion besi *chelate* yang mengkatalisis. Hal ini tentunya dapat dijadikan acuan untuk pengembangan obat anti tumor (Ferreira, *et al.*, 2011).

PENDAHULUAN

Zat warna alami sering terkandung di dalam mahkota bunga, daun, batang dan akar tumbuhan. Seperti pada akar, kulit kayu, dan batang tanaman barberry (*Berberis aristata*) dapat digunakan sebagai bahan pewarna alami. Komponen utama dari pewarna ini adalah berberine yang merupakan alkaloid. Hal ini merupakan perwana dasar dan dapat digunakan untuk mewarnai sutra dan wol secara langsung. Pewarna tersebut menghasilkan warna kuning yang cerah dengan ketahanan terhadap cucian yang lebih baik dan relatif tahan luntur. Sutra dapat diwarnai setelah proses perawatan. Pewarna alami lain yang umum dijumpai adalah kurkumin, yaitu zat pewarna kuning pada rimpang kunyit, merupakan pewarna makanan dan bumbu masakan, termasuk ke dalam kelas metana diaroyl. (Saxena dan Raja, 2014).

Bentukan glukosida pada pigmen *emodin* dan *dermocycin* merupakan pewarna yang digunakan untuk fiber baik yang natural maupun sintesis dari properti, baik dengan kecepatan tinggi maupun rendah (Saxena dan Raja, 2014).

Kalsium oksalat merupakan agen potensial penyebab penyakit batu ginjal, kalsium oksalat menyatu dengan tubuh manusia melalui makanan yang berbasis pada tumbuhan. Pendekatan tradisional untuk menghindari tanaman perikarp yang kaya akan kalsium oksalat dan multi lapisan kulit dengan dinding lignifikasi telah memiliki, efek yang bermanfaat. Penemuan jamur dan bakteri yang mampu menghancurkan kalsium oksalat dan gen tanaman yang mampu meregulasi formasi kalsium oksalat dan kristalisasi telah menawarkan harapan untuk mengkonter toksisitas dari kalsium oksalat (Simon dan Nayagam, 2019).

Kandungan lignin pada tanaman dipengaruhi oleh polusi yang terkandung dalam atmosfer bumi. Semakin tinggi polusi maka semakin tipis kandungan lignin pada sebuah tanaman, begitu pula sebaliknya. Hal ini tentunya dapat digunakan sebagai acuan untuk mengetahui tingkat polusi suatu wilayah (Soukupova, *et al.*, 2000).

PENDAHULUAN

Tanaman *pubescens* yang mana terdapat saponin memiliki khasiat untuk pengobatan gangguan gastrointestinal, terutama tukak lambung dan diare.

Sesquiterpen lakton yang saat ini dianggap sebagai obat antimalaria paling efektif yang tersedia adalah Artemisinin. Banyak penelitian telah menilai kemanjuran pengobatan ACT dibandingkan dengan pengobatan lain (Price, *et al.*, 1996, Dondorp, *et al.*, 2009), dimana selalu menunjukkan bahwa artemisinin dan turunannya dapat mengurangi terjadinya infeksi plasmodium. Selain itu, sesquiterpen lakton ditemukan berperan dalam menghambat perkembangan sel tumor maupun kanker (Chadwick, *et al.*, 2013).

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

Uji histokimia pada prinsipnya adalah mereaksikan senyawa metabolit primer dan sekunder (substansi ergastik) dengan pereaksi khusus. Dalam mereaksikan senyawa ergastik dalam sel atau jaringan tanaman, tentu saja perlu ada cara khusus, yaitu organ tanaman yang akan diketahui kandungan senyawa ergastiknya perlu diiris tipis, agar senyawa tersebut dapat bereaksi dengan reagen yang akan digunakan.

Pengirisan organ tanaman untuk pembuatan sediaan guna penapisan histokimia ada dua metode, yaitu metode pengirisan tangan (*hand section*) dan pengirisan menggunakan alat yang disebut mikrotom.

Pembuatan sediaan untuk keperluan uji histokimia dapat digunakan tiga macam metode, yaitu: 1. Metode sediaan segar; 2. metode sediaan semi permanen dan 3. metode sediaan permanen;

1. Metode Sediaan segar

Pemotongan specimen segar tanpa proses fiksasi bertujuan untuk menghindari perubahan fisik dalam proses pengirisan. Kondisi

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

ini meskipun kondisi protoplasma akan mengalami sedikit perubahan tetapi secara kimiawi tidak berubah, sehingga ketika dilakukan penambahan tes reagen untuk mikrokimia/ histokimia akan dihasilkan relatif akurat (Sass, 1951).

2. Metode sediaan semi permanen

Metode semipermanen adalah suatu metode dalam pembuatan preparat/ sediaan yang menggunakan media penutup yang berbahan dasar liquid yang dapat mengawetkan sekaligus tidak mudah menguap, sehingga specimen tidak rusak dalam beberapa hari-2 minggu, untuk menggantikan air yang mudah menguap (Sass, 1951). Dalam membuat preparat semipermanen dapat digunakan metode kompilasi dari Maneval yang menggunakan beberapa macam mounting, yaitu (1) Lactophenol Aman yang memiliki formula: Phenol (melted) 20 cc, Lactic acid 20 cc, Glycerin 40 cc dan aquades 20 cc; (2) Mounting Phenol-Glycerin, formulanya: Phenol (melted) 20cc, Glycerin 40 cc dan aquades 40cc; (3) Mounting yang menggunakan pewarna seperti larutan 1% Cotton blue (aq.) atau 1% Anilin blue (aq.) atau 1% acid fuchin (aq.). Formulanya adalah sebagai berikut: Lactophenol 100cc, Asam asetat glasial 0 – 20 cc dan larutan pewarna 1-5 cc.

3. Metode sediaan permanen

Metode sediaan permanen ada dua metode yaitu metode irisan jaringan tidak tertanam dan metode irisan jaringan tertanam.

- a. Metode *sectioning unembedded tissues* (metode irisan jaringan tidak tertanam) menurut Sass (1951) menggunakan mounting gliserin-jelly, formula media mounting gliserin-jelly adalah: Gelatin 5 g, aquades 30 cc, Glyserin 35 cc dan Phenol (dilarutkan dengan 10 tetes aquades). Prosedurnya gelatin dilarutkan dalam aquades pada suhu 35°C, selanjutnya ditambah satu persatu formula, aduk hingga homogen.

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

Selanjutnya disaring selagi masing-masing menggunakan kertas saring atau kain sutera. Sebelum specimen ditutup dengan penutup Gliserin-Jelly, sebaiknya diberi pewarnaan terlebih dahulu, jika mau diwarnai. Selanjutnya di-dehidrasi menggunakan metode gliserin. Gelas benda yang kering dan bersih dipersiapkan untuk ditetesi larutan penutup gliserin-Jelly, selanjutnya dipanaskan di atas *water bath* pada suhu 35 °C hingga meleleh dan specimen diletakkan telah dehidrasi dengan gliserin murni dan gliserinnya telah diserap menggunakan kertas tissue, diletakkan di atas gliserin-Jelly yang telah meleleh. Specimen tersebut ditutup menggunakan gelas penutup secara perlahan, jika specimen tidak fragil, preparat disquash secara perlahan hingga preparat sangat tipis. Setelah jelly dingin, jelly diluar gelas penutup dibersihkan dan pinggiran gelas penutup diberi cairan selotif yang mudah mengering seperti Duco, entelan, Canada Balsam, Gum Arab dll. Selotif ini akan dapat membantu dapat mengawetkan specimen sehingga preparat dapat disimpan sampai beberapa tahun.

- b. Metode *sectioning embedded tissues* (metode irisan jaringan tertanam), berdasarkan bahan yang digunakan untuk meng-embed, metode ini dibedakan menjadi 3 metode, yaitu embed-parafin, embed-Polietelin Glikol (PEG) dan embed-resin.

Tahapan membuat preparat metode irisan jaringan tertanam paraffin, meliputi beberapa tahapan:

1. Tahap mematkan, mengawetka dan menyimpan jaringan/organ tanaman.

Tahapan ini sering dikenal dengan istilah fiksasi. Dalam proses fiksasi yang paling adalah mematkan

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

protoplasma. Penghentian proses kehidupan di dalam sel harus diminimalisir adanya gangguan structural di dalam sel dan distorsi susunan sel dalam jaringan. Larutan fiksasi selain dapat membunuh protoplasma juga dapat memperbaiki struktur tidak terjadi distorsi serta dapat membuat massa material cukup kuat untuk menahan penanganan yang diperlukan. Larutan fiksasi yang baik untuk memenuhi ketiga persyaratan tersebut biasanya tersusun dari beberapa senyawa. Larutan fiksasi tunggal yang biasa digunakan adalah Alkohol 70%, namun larutan tersebut tidak seutuhnya memenuhi ketiga persyaratan di atas.

Formula fiksasi yang sangat sering digunakan untuk memfiksasi sekaligus berfungsi menyimpan jaringan tumbuhan Larutan Fiksasi Formaldehyde Acetic Acid (FAA), formulasinya adalah 95% Ethyl alcohol 50 cc, Asam asetat glasial 5 cc, 37-40% Formaldehyde 10cc dan aquades 35cc. Ada juga FPA, dimana acetic acid diganti dengan Propionic acid. Larutan fiksasi ini sangat stabil, sangat bagus dalam proses pengerasan, sehingga specimen dapat disimpan untuk bertahun-tahun. Untuk itu larutan fiksatif ini sangat sesuai untuk menyumpun pucuk tanaman berkayu, batang herbaceous, dan akar tua. Adanya alcohol dalam konsentrasi yang cukup tinggi dapat membuat jaringan suculen tenggelam dan dengan kisaran konsentrasi asam asetat antara 2%-6%, ini dapat menyebabkan menghentikan proses pembengkakan pada protoplasma (Sass, 1951). Agar larutan fiksatif dapat masuk kedalam jaringan secara merata dan seluruh udara dalam jaringan dapat dikeluarkan maka diperlukan pemvakuman pada botol yang berisi specimen dan larutan fiksatif.

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

2. Tahap Dehidrasi untuk Penanaman (Embedding).

Menurut Berlyn & Mische (1976), tahapan dehidrasi untuk penanaman paraffin diawali dengan pemindahan specimen dari larutan fixative seperti FAA ke larutan Alkohol 30% dilanjutkan ke no 1 pada table 1 berikut ini.

Tabel 1. Tahapan Dehidrasi n-Buthyl alkohol (Berlyn & Mische, 1976).

No	n-Buthyl alkohol (n-Buthanol)	Alkohol	Aquades
1	10	20	70
2	15	25	60
3	25	30	45
4	40	30	30
5	55	25	20
6	70	20	10
7	85	15	0
8	100	0	0

Tahapan dehidrasi menurut Luo, *et al.* (2020), dapat dilakukan dengan urutan pemindahan specimen dari larutan fixative ke alcohol 30% selanjutnya ke no 1 pada table berikut.

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

Tabel 2. Tahapan Dehidrasi (Luo, *et al.*, 2020)

No	N-Butanol	Ethanol	Aquades	Waktu (jam)	Re-used
1	0	50	50	4	T
2	10	40	50	4	T
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

Catatan: N. tidak , Y. ya dapat; N-Butanol dapat digantikan dengan tertiary Butanol (t-Butanol).

Dari proses dehidrasi dilanjutkan proses infiltrasi yaitu proses memasukkah paraffin ke dalam jaringan secara perlahan. Prosen infiltrasi menurut Berlyn & Mische (1976), ada 12 tahapan sebagai berikut seperti pada table 3.

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

Tabel 3. Tahapan infiltrasi jaringan

No	% Alkohol 95%	% TBA	% Aquadest	Waktu (Jam)
1	30		70	1
2	40		60	1
3	50	10	40	1
4	50	20	30	1
5	50	35	15	1
6	50	50		1
7	25	75		1
8		100		1
9		100		1
10		100 ^a		1
11	Parafin cair murni pada suhu 56-58°C			7
12	Parafin cair murni pada suhu 56-58°C			7

Catatan: a. tertiary-buthyl alkohol = t-Buthanol (TBA):paraffin cair = 2 : 1

Proses dehidrasi yang dilanjutkan proses infiltrasi. Infiltrasi yang dilakukan oleh Luo, *et al*, (2020), tahapannya seperti berikut pada table 4.

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

Tabel 4. Infiltrasi specimen menurut (Lou, *et al.*,2020).

No.	N-Butanol/ t-butanol (TBA)	Parafin padat (pp) Parafin cair (pc)	Suhu	Waktu
1	50	50pp	40°C	1
2	50	50pc	50 °C	1
3		50pc	60 °C	24
4	0	100pc	60 °C	1
5	0	100pc	60 °C	24
6	<i>Embeding/ penanaman</i>			

Pertama spesimen dimasukkan dalam botol yang berisi $\frac{1}{2}$ botol TBA selanjutnya dimasukkan parafin padat yang volumenya sama dengan volume TBA, botol dimasukkan dalam oven yang bersuhu 40 °C selama 1 jam. Setelah satu jam dilihat volume cairan apakah berkurang? Bila berkurang ditambah parafin padat hingga sama dengan volume semula. Temperatur oven dinaikkan menjadi 50 °C, dan didiamkan hingga 1 jam. Setelah satu jam dan semua parafin telah cair, temperature oven di naikkan menjadi 60 °C, didiamkan hingga 24 jam atau sampai TBA dalam botol menguap semua. Selanjutnya parafin cair diganti dengan parafin cair yang baru seperti no 4 dan no 5 dalam table.

Proses infiltrasi selesai dilanjutkan proses *embedding* dengan menggunakan cetakan yang terbuat dari kertas tanggalan, aluminium foil atau cetakan plastik khusus. Dalam pendinginan parafin atau pembekuan parafin dengan sempurna, dibutuhkan waktu beberapa jam, untuk lebih aman proses pencetakan didiamkan selama 24 jam.

Proses pengirisan yang perlu diperhatikan adalah ketebalan sayatan, sudut mata pisau dan kebersihan pisau selama

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

pengirisan. Untuk menjaga kebersihan pisau, setiap selesai mengiris sebaiknya pisau dibersihkan dengan xylol, agar paraffin yang menempel hilang dan pisau bersih dari kotoran debu dan paraffin. Proses selanjutnya adalah penempelan pita paraffin pada gelas benda.

Tabel 5. Tahapan proses penghilangan paraffin pada sayatan spesimen (*dewax*).

No	Senyawa Kimia	Waktu (menit)
1	Xylol	10
2	Xylol	10
3	Xylol : Alkohol100%	5
4	Alkohol100%	5
5	Alkohol 95%	5
6	Alkohol 75%	5

Tabel 6. Tahapan proses pewarnaan ganda (*double staining*)

No	Senyawa Kimia	Waktu (menit)
1	Alkohol 50%	5
2	Safranin O 1% (Alk. 50%)	4-10
3	Alkohol 50%	1
4	Alkohol 75% Ethanol	1
5	Alkohol 95%	1
6	Fast Green	1-2
7	Alkohol 95%	1
8	Alkohol 100%	1

PEMBUATAN SEDIAAN UNTUK PENGUJIAN HISTOKIMIA

Tabel 7. Tahapan proses penjernihan (*Clearing*) dan penutupan (*mounting*).

No	Senyawa Kimia	Waktu (menit)
1	Alkohol 100%:N-Butanol	1
2	N-Butanol	1
3	N-Butanol: Xylol	1
4	Xylol	1
5	Mounting: Enthelan, Canada Balsam dll.	

Catatan: N-Butanol dapat diganti dengan t-Buthanol (TBA)

HISTOKIMIA ALKALOID

HISTOKIMIA

TERPENOID

Terpen / terpenoid merupakan salah satu kelas produk alami terbesar, karena keanekaragaman kimia luar biasa yang dapat muncul dari transformasi biokimia unit starter prenil difosfat yang relatif sederhana. Semua terpen / terpenoid terdiri dari kekuatan hidrokarbon yang dihasilkan dari berbagai jenjang prenil difosfat (rantai polimer dari unit prenil). Setelah ionisasi (penghilangan) dari gugus difosfat, sisa di antara karbokation alilik dapat dirujuk ke arah kimia kaskade yang kompleks dimana mengarah ke beragam kekuatan hidrokarbon linier dan siklis yang dapat dimodifikasi lebih lanjut dengan berbagai kelompok fungsional (misalnya, alkohol atau keton) dan substituen tambahan (misalnya gula atau asam lemak) (Jiang, *et al.*, 2016).

Terpenoid diproduksi oleh beragam genera tumbuhan alga dan spons. Sumber yang kaya terpenoid adalah genus *Eucalyptus*, yang memiliki daun yang merupakan bahan dasar (minyak esensial) dalam pembuatan minyak kayu putih. Komposisi kimiawi minyak esensial dan jumlahnya dari rerata terpen berbeda antar spesies dan bervariasi tergantung pada habitat pohon dan waktu panen daunnya (Jaeger dan Cuny, 2016).

HISTOKIMIA TERPENOID

Berkenaan dengan jaringan yang mensekresi terpenoid, Denissova (1975, dalam Fahn, 1988) mengklasifikasi menurut evolusi progresif jaringan tersebut. Ia membedakan empat jenis jaringan yang mensekresi terpenoid dan menyimpulkan bahwa jaringan tersebut awalnya berevolusi dari sel parenkim yang tidak terspesialisasi. Jenis-jenis ini adalah:

- 1) Jaringan sekretori endogen, dengan akumulasi intraseluler dari bahan yang disekresikan;
- 2) Jaringan sekretori endogen skizogen dengan akumulasi ekstraseluler dari bahan yang disekresikan;
- 3) Jaringan sekretori dengan lumen schizo-lysigenous;
- 4) Struktur kelenjar eksogen (trikoma kelenjar). Selain itu, Evaluasi histokimia dan fitokimia pada daun *P. guineense* dilakukan untuk mengungkapkan adanya senyawa melalui tindakan terapeutik yang terbukti, salah satunya terpenoid dimana didistribusikan melalui jaringan pada organ tersebut (Ferreira *et al.*, 2011).

Uji Histokimia dilakukan oleh Ferreira *et al* (2011) untuk mengetahui kandungan terpenoid pada daun tanaman jenis *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae). Uji histokimia dilakukan pada potongan melintang daun segar. Bagian yang dipotong secara manual tersebut kemudian dikenakan pewarna (stain) hexane untuk melokalisasi terpenoid.

Uji histokimia terpenoid dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa reagen, antara lain:

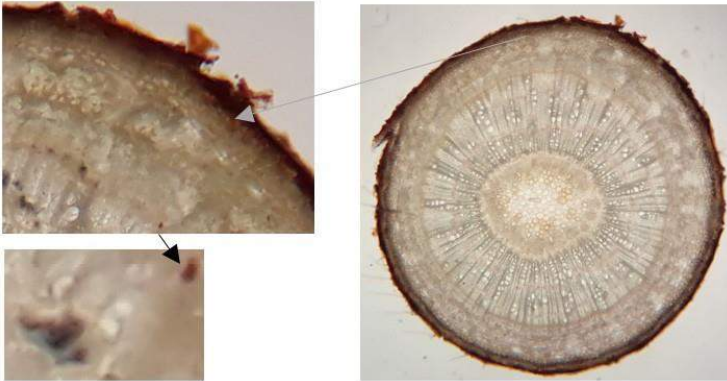
1. **Reagen NADI**, kehadiran terpenoid (essential oil) dan Antimony trichloride untuk mengetahui terpenoid steroid. Kontrol positif dilakukan seperti yang direkomendasikan oleh masing-masing penulis tes histokimia, yaitu menggunakan Reagen NADI, untuk

HISTOKIMIA TERPENOID

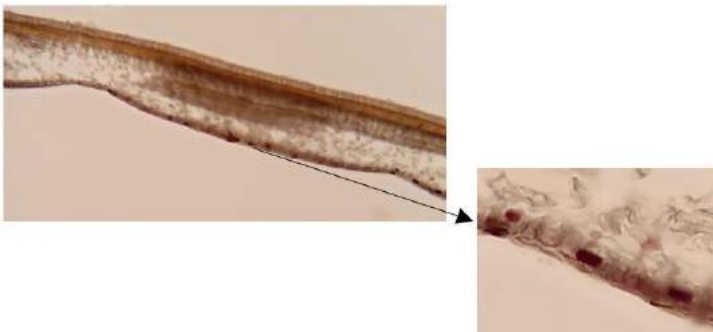
mendeteksi kehadiran terpenoid (essential oil) dan Antimony trichloride untuk mengetahui terpenoid steroid. Matias *et al.* (2015) untuk mengetahui kandungan terpenoid pada spesies *Solanum*, menggunakan reagen NADI. Kuster dan Vale (2016) dalam pengujian histokimia terpenoid dilakukan dengan metode preparat awetan yang menggunakan dua macam media penutup/ *mounting* pertama menggunakan media Paraplast untuk mendapatkan bagian yang lebih tipis dan dengan demikian meningkatkan visualisasi hasil. Kedua menggunakan media penutup/ *mounting* gliserin jeli.

2. Mercado dkk (2018) melakukan uji Histokimia pada spesies *Larrea* untuk mengetahui kandungan terpenoid. golongan utama senyawa kimia daun dan stipules diselidiki pada bagian transversal dari mikrotom dengan bahan segar. Daun segar dan stipula ditempatkan di antara penyangga lilin dental dan dipotong pada jarak 20-25 μm dengan rotasi mikrotom. Beberapa bagian diberi perlakuan dengan larutan 50% sodium hypochlorite dan dicuci dengan air suling, sebelum diwarnai dengan reagen NADI reagent untuk mendeteksi terpenoid.
3. **Reagen 5% CuSO₄**; Terpenoid jejaknya dapat diungkapkan dengan reagen 5% CuSO₄, adanya terpenoid ditandai dengan warna kuning atau kuning kecoklatan (Maghfiroh, *et al.*, 2018),

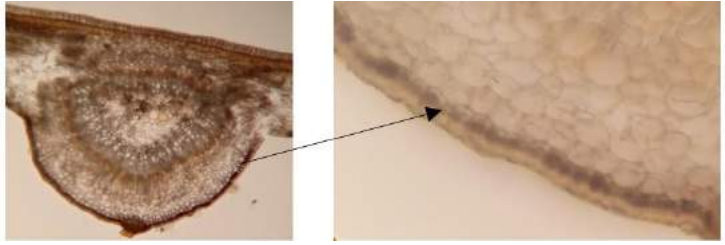
HISTOKIMIA TERPENOID



Gambar 33. Terpenoid di dalam batang *G. versteegii* grup Soyun. Keterangan: Irisan melintang batang + reagen Nadi, tanda panah terpenoid



Gambar 34. Terpenoid di dalam helaian daun *G. versteegii* grup Soyun. Keterangan : Irisan melintang lamina + reagen Nadi,tanda panah terpenoid.



Gambar 35. Terpenoid di dalam midrib daun *G. versteegii* grup Soyun. Keterangan: Irisan melintang midrib + reagen Nadi, tanda panah terpenoid.



Gambar 36. Terpenoid di dalam midrib daun *G. versteegii* grup Soyun. Keterangan : Irisan melintang midrib + reagen tembaga sulfat, tanda panah terpenoid.

