

Research Article

Histokimia Kalus *Gyrinops versteegii* Provenan Beringin

Tri Mulyaningsih^{1*}, Rohmiati Saadah¹, Aida Muspiah¹, Erna Lestiana²

¹ Prodi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram.

² Prodi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram.

*Correspondence: Tri Mulyaningsih¹; trimulya@unram.ac.id

Citation: Mulyaningsih T., Saadah, R., Muspiah, A., Lestiana, E. (2023). Histokimia Kalus *Gyrinops versteegii* Provenan Beringin, SJBIOS, 2(1):7-13.

Editor: Tri Wahyu Setyaningrum

Received: July 18, 2023

Accepted: July 26, 2023

Published: July 31, 2023



Copyright: © 2023 Mulyaningsih T., et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Abstrak: Pohon penghasil gaharu yang paling terkenal dari suku Thymelaeaceae salah satu diantaranya adalah spesies dari marga *Gyrinops*, contohnya *G. versteegii* dan khususnya provenan Beringin. Pohon ini umumnya dapat ditemukan di kawasan Indonesia bagian timur, terutama yang tersebar di Pulau Lombok. Pohon ini dapat menghasilkan gubal gaharu, namun di alam sering dijumpai walaupun telah berusia puluhan tahun belum memproduksi gubal gaharu. Solusinya adalah menyeleksi bibit yang dapat menghasilkan gubal kelas super secara in vitro dengan observasi kandungan metabolit sekunder menggunakan metode histokimia. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui jenis kandungan senyawa metabolit primer dan sekunder yang terkandung di dalam jaringan kalus *G. versteegii* provenan Beringin. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Lanjut dan Laboratorium Imunologi FMIPA Universitas Mataram. Kalus yang dihasilkan dari daun *G. versteegii* provenan Beringin dibuat preparat histokimia. Hasil pengujian histokimia terhadap kalus daun *G. versteegii* provenan Beringin menunjukkan bahwa di dalam sel kalus tersebut mengandung metabolit primer berupa amilum dan senyawa metabolit sekunder: alkaloid, flavonoid, lipid, sesquiterpene dan terpenoid.

Keywords: histokimia, kalus, gaharu, *Gyrinops versteegii*, Lombok

PENDAHULUAN

Pohon Ketimunan (pohon penghasil gaharu yang tumbuh di pulau Lombok) atau *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke, memiliki 5 intraspesifik, salah satunya adalah *G. versteegii* var. *fuctiquadratus* atau provenan Beringin. Pohon gaharu provenan ini memiliki keunggulan pada gubal gaharunya yang memiliki kualitas terbaik, yaitu warna gubalnya hitam merata, aromanya wangi lembut dan sel-sel penyusun xilem paling rapat dan padat di antara varietas lainnya. Selain itu batang mudanya berwarna krem kehijau-hijauan [10-12].

Gubal gaharu memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan banyak manfaatnya. Menurut studi etnobotani di setiap negara gubal gaharu memiliki variasi kegunaan yang sedikit berbeda. Seperti gaharu di Cina digunakan sebagai obat gangguan pencernaan, afrodisiak, anodyne (penghilang rasa sakit), dan digunakan untuk mengobati asma, kanker tiroid, tumor paru-paru, kolik, diare, penyakit ginjal, serta digunakan sebagai tonik. Di Eropa, gaharu digunakan sebagai obat kanker dan gaharu diambil senyawa yang dapat memacu parfum menjadi lebih wangi dan tahan menempel pada tubuh lebih lama yaitu senyawa agarofuran; di India digunakan sebagai obat untuk usus [9, 12]. Di Jepang gaharu digunakan untuk



campuran berbagai obat (dalam pengobatan Kampo, sebagai obat penenang, analgesik dan pencernaan), sebagai obat tradisional seperti obat penenang, melindungi operasi organ vital seperti jantung, paru-paru dan hati, memelihara kesehatan perut, membantu sakit tenggorokan, dan detoksifikasi tubuh, kodo dan untuk bahan utama pembuatan *incense* [3,9,12,13]

Gubal gaharu *G. versteegii* memiliki komponen kimia antara lain noroxo-agarofuran, agarospirol, 3,4-dihydroxy-dihydrofuran, valerolactone, indol dan isolongifolene, coniferyl alcohol, guaiacol, catechol dan pyrogallol, veratrol, ambrox, p-methoxy-benzyl acetone, aquilochin, Jinkohol, jinkohol ermol, dan kusunol [13]. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun gaharu (*G. versteegii*) mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin dan polifenol, serta glikosida dan triterpenoid [20]. Senyawa bioaktif alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tannin dan terpen, diduga bersinergi meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag sebagai imunomodulator [19].

Golongan senyawa bioaktif terpenoid, flavonoid, fenolik dan tanin sebagai senyawa anti kanker pada sel Vero dan WiDR melalui jalur nekrosis dan apoptosis (Iriyanto, *et al*, 2016). Flavonoid tersebut memiliki antioksidan yang sangat kuat aktivitasnya dan berpotensi dikembangkan sebagai antioksidan alami [17]. Pada penelitian sejenis ekstrak kloroform daun tua *G. versteegii* memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan IC₅₀ 11,66 ± 2,11-g.mL⁻¹. Di sisi lain, ekstrak kloroform daun muda memiliki aktivitas sitotoksik tertinggi terhadap garis sel HeLa dengan IC₅₀ sebesar 22,71 ± 1,31g mL⁻¹, fraksi ini mengandung fenolik, flavonoid dan terpenoid sebagai senyawa bioaktif [14].

Daun pohon gaharu juga bermanfaat sebagai antibakteri yang ditunjukkan pada aktivitas antibakteri terbaik ekstrak etanol daun tua *G. versteegii* dan *A. beccariana* dengan nilai konsentrasi hambat minimum 0.50 mg/mL terhadap *Escherichia coli* dan 0.03 mg/mL terhadap *Staphylococcus aureus*. Dugaan golongan senyawa aktif pada kedua ekstrak terbaik secara berturut-turut masing-masing steroid dan flavonoid [21].

Dalam uji fitokimia daun *G. versteegii*, menunjukkan bahwa daunnya mengandung flavonoid, fenol, terpenoid dan radikal bebas [7]. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun gaharu (*G. versteegii*) mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin dan polifenol, serta glikosida dan triterpenoid [20]. Senyawa bioaktif alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tannin dan terpen, diduga bersinergi meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag sebagai imunomodulator [19]. Histokimia adalah cabang ilmu histologi yang berkaitan dengan identifikasi komponen kimia sel dan jaringan [8]. Bagaimana dengan kalus daun *G. versteegii* provenan Beringin, apakah juga mengandung senyawa metabolit seperti pada daun utuhnya, berdasarkan keterangan hal tersebut maka perlu diadakan penelitian histokimia kalus daun *G. versteegii* provenan Beringin.

METODE

Penelitian tentang histokimia kalus daun *G. versteegii* provenan Beringin dilakukan di Laboratorium Imunologi dan Biologi Lanjut, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram pada bulan Maret hingga bulan Oktober 2022.

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi bahan hidup: Kalus *G. versteegii* provenan Beringin yang dikulturkan pada media MS+1,5 mg/L 2,4D + 1 mg NAA + 5 mg BAP. Senyawa kimia: CuSO₄, alkohol Absolut, AlCl₃, gliserin, reagen Wagner, sudan III, FeCl₃, NaCO₃, asam benzoate, Aceton, Anillin Blue, asam asetat, FeCl₃, Gliserin, H₂O, H₂SO₄, HCH₃CO₂, HCl, Jodium, Kj, Lugol, Methylene Blue, Na₂CO₃, NaOH, NH₄OH, Phloroglucinol, Sudan III, timbal asetat, Toluidine blue O; Bahan habis lainnya: tissue, buku, kertas saring.

Alat yang digunakan untuk penelitian histokimia, yaitu mikroskop binokuler Primo star Zeiss, kamera, cawan petri, gelas penutup, gelas benda, pipet tetes, pinset, beaker glass 100ml, gelas ukur 100 ml, pipet ukur, karet penyedot pipet, gelas ukur 10 ml, 50 ml, 100ml, *water bath*, botol gelas specimen 10 ml, gunting spesimen, kuas kecil, pinset ujung runcing, isi cutter, silet baru dan timbangan analitik.

Prosedur kerja yang dilakukan adalah spesimen direndam dalam air dan bagian melintang diambil dengan menggunakan silet yang baru. Bagian (setidaknya 20 irisan untuk masing-masing prosedur) diwarnai menggunakan prosedur khusus yang disebutkan oleh Krishnamurthy (1988) untuk melokalisasi pati, lignin, tanin, alkaloid, saponin, sesquiterpene lactone, dan fenolik lainnya, serta total lipid.

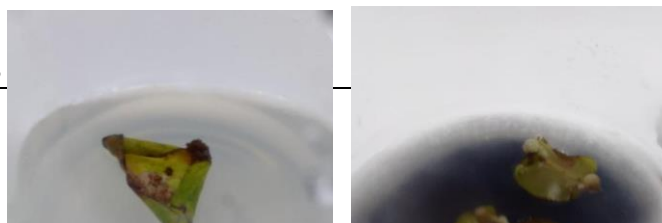
Alkaloid jejaknya diungkapkan menggunakan reagen Wagner (1,27 g yodium dan 2 g kalium iodida dalam 100 ml air suling), ditunjukkan adanya warna emas atau coklat kemerahan atau kuning [5, 6]. Flavonoid jejaknya diungkapkan dengan NaOH 10%, akan berwarna kuning keemasan [6]. Lipid jejaknya diungkapkan menggunakan Sudan III 0.5% (alkh 70%), direndam selama 20 menit, dibilas dengan cepat dengan alkohol 50% dan ditutup menggunakan gliserin untuk pengamatan, ditunjukkan warna biru, merah, merah muda, [8]. Pati jejaknya diungkapkan menggunakan larutan lugol (0,3 gr yodium dan -1.5 gr kalium iodida dilarutkan dalam 100 ml aquadest) selama dua menit dan dibilas dengan air suling, ditunjukkan dengan warna biru kehitaman [15,8]. Saponin jejaknya diungkapkan menggunakan setetes H₂SO₄ akan berwarna kuning selanjutnya berubah menjadi merah dalam waktu 30 menit akhirnya menjadi ungu atau biru hijau pada waktu singkat [8]. Sesquiterpen lakton jejaknya berwarna jingga yang diungkapkan menggunakan pereaksi H₂SO₄ 25%. Tannin jejaknya diungkapkan menggunakan larutan FeCl₃ 0.5% (0,1N HCl), di-mounting menggunakan Na₂CO₃ akan berwarna biru hijau kehitaman. Terpenoid jejaknya diungkapkan dengan pereaksi CuSO₄ 5%, terpenoid ditandai dengan warna kuning atau kuning kecoklatan [6].

HASIL DAN PEMBAHASAN

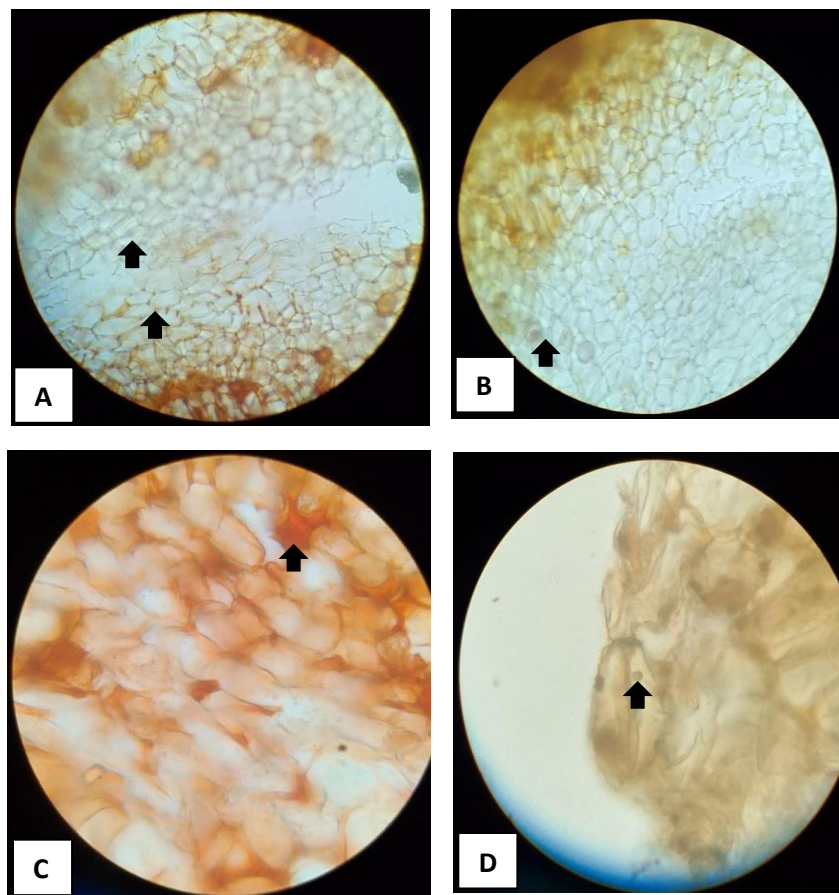
Potongan daun muda (kuncup daun yang baru membuka helaian daunnya), digunakan sebagai eksplan. Eksplan tersebut ditanam pada media MS ditambah 1 mg/L BAP dan 2 mg/L IBA tanpa arang aktif [4] dan satu media dengan formula sama namun diberi penambahan arang aktif. (Gambar 1).

Setelah delapan minggu setelah tanam, eksplan di kedua media tersebut menunjukkan adanya pertumbuhan kalus. Selanjutnya kalus dari media tanpa arang aktif dipanen untuk diuji secara histokimia untuk menemukan kandungan metabolit primer (amilum) (Gambar 2) dan metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, lipid, saponin, sesquiterpene lakton, tannin dan terpenoid (Gambar 2 dan 3).

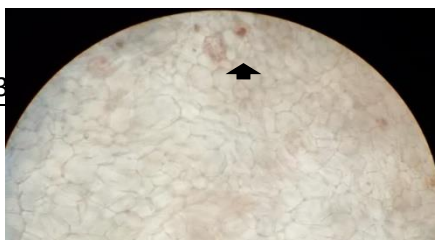
Alkaloid pada histokimia kalus jaringan daun *G. versteegii* provenan Beringin, ditunjukkan adanya jejak yang berwarna kuning pada Gambar 2A [5, 6]. Flavonoid pada Gambar 2B, ditunjukkan jejaknya berwarna kuning [6]. Lipid pada Gambar 2C, terdeteksi adanya warna merah bata [8]. Amilum pada Gambar 2D, terdapat di dalam sel jaringan kalus sebagai bintik berwarna biru kehitaman [15]. Senyawa metabolic sesquiterpene lakton dan tannin (Gambar 2F dan G) terdapat pada bagian perifer kalus yang menunjukkan warna jingga muda dan hijau kebiruan gelap [8]. Terpentin (Gambar 3H), sangat jarang, tampak berwarna kuning kecoklatan [6]. Saponin sangat jarang ditemukan pada jaringan kalus, saponin terdeteksi warna ungu [8]

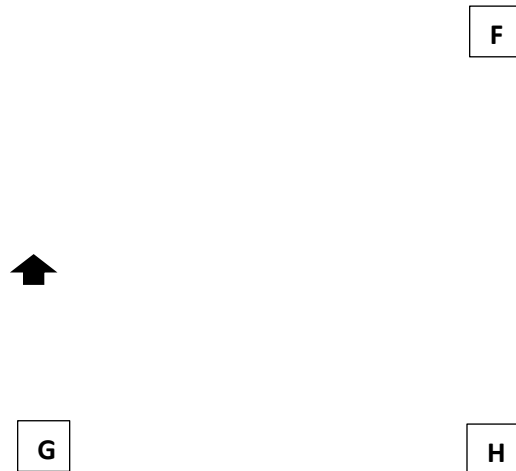


Gambar 1. Kalus jaringan daun *Gyrinops versteegii* provenan Beringin, umur 8 minggu setelah tanam.



Gambar 2. Histokimia kalus jaringan daun *Gyrinops versteegii* provenan Beringin. Keterangan: A. Alkaloid; B. Flavonoid; C. Lipid; D. Amilum, Jejak kandungan senyawa metabolit ditunjukkan oleh tanda panah.





Gambar 3. Histokimia kalus jaringan daun *Gyrinops versteegii* provenan Beringin. Keterangan: E. Saponin; F. Sesquiterpene Lactone; G. Tanin; H. Terpenoid, Jejak kandungan senyawa metabolit ditunjukkan oleh tanda panah.

Pada helaian daun *G. versteegii* provenan madu dan soyun secara histologi juga ditemukan kandungan alkaloid, flavonoid, lipid, amilum, pada sponge parenkim, palisade parenkim dan cortical parenkim midrib, sedangkan sesquiterpene lakton dan terpenoid ditemui pada jaringan epidermis. Namun pada helaian daun *G. versteegii* provenan madu dan soyun pada pengujian histokimia tidak ditemukan senyawa saponin [1,18]. Pada kalus *G. versteegii* provenan Beringin, walaupun belum terbentuk epidermis namun pada bagian perifer kalus yang masih kecil (diameter 0,5-0,9 cm) terdeteksi adanya senyawa terpenoid (Gambar 3G).

Skринing secara fitokimia kandungan metabolit primer (amilum) (Gambar 2D) dan metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, lipid, saponin, sesquiterpene lakton, tannin dan terpenoid) dapat ditemukan di dalam ekstrak daun *G. versteegii* [7,16].

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada jaringan kalus daun *G. versteegii* provenan Beringin pada uji histokimia menunjukkan adanya kandungan alkaloid, flavonoid, amilum, saponin, sesquiterpen lakton, tannin dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA



- [1] Febrianti, V. 2019. Histokimia helaian daun *Gyrinops versteegii* provenan Madu. PKL FMIPA Universitas Mataram, Mataram (tidak dipublikasi).
- [2] Johansen, D.A. (1940) Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Co.
- [3] Kristanti, A.N., M. Tanjung, O. P. Rahayu, E. Herdiana. 2017. Phenolic compounds from *Aquilaria microcarpa* stem bark. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 52(6): 1111-1115
- [4] Listiana, Bq. E., Sumarjan, Mulyaningsih, T., Roloff, M. and Schurr, U. 2021. Induction of Agarwood Olfactory Sesquiterpenes from *Aquilaria filaria* Callus Culture. *ASM Sc. J.*, 14, Special Issue 2, 2021 for ICST2017, 125-133
- [5] Mahendra, C., G. Manasa, B. L. Kiran, M. Murali, H. V. Girish, and M. S. Sudarshana. 2017. Phytochemical, Histochemical, and Antibacterial Screening of *Chenopodium anthelminticum* L. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 23 (3): 183–192.
- [6] Maghfiroh, L., T. Rahayu, & A. Hayati. 2018. Profil Histokimia dan Analisis *In Silico* Senyawa metabolit Sekunder pada Daun Zaitun (*Olea europaea* L.). *e-Jurnal Ilmiah Sains Alami (Known Nature)*, 1(1): 74 - 86
- [7] Mega, D.A. Swastini, 2010. Screening phytochemical and free antiradical activity of methanol leaf extract of gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Journal of Chemistry* 4 (2): 187-192.
- [8] Momin, R.K. and V.B. Kadam 2011. Histochemical investigation of different organs of genus *Sesbania* of marathwada region in Maharashtra. *Journal of Phytology*, 3(12): 31-34.
- [9] Mulyaningsih, T. 2021. Paradigma tradisional dalam pendayagunaan gaharu di Jepang. Yogyakarta: PT. NAS Media Indonesia
- [10] Mulyaningsih, T., D. Marsono, Sumardi & I. Yamada. 2015. Community of Eaglewood *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke. and the Diversity of Plant Species Associated in Western Lombok Forest. Paper of International Seminar on The Tropical Natural Resources 2015. Url: <https://www.researchgate.net/publication/301301497>, 2 Juni 2016.
- [11] Mulyaningsih, T., D. Marsono, Sumardi & I. Yamada. 2017. Keragaman Intraspesifik Gaharu *Gyrinops Versteegii* (Gilg.) Domke di Pulau Lombok Bagian Barat. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 14(1): 1-10.
- [12] Mulyaningsih, T., D. Marsono, Sumardi and I. Yamada. 2014. Selection of Superior Breeding Intraspecies Gaharu of *Gyrinops versteegii* (Gilg) Domke, *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 4: 485-92.
- [13] Noviyanti, E. Santoso, B. Wiyono, M. Turjaman. 2011. Study of eaglewood (gaharu) resulting from inoculation of *Fusarium* sp. on *Aquilaria microcarpa*, in: Proceeding of Gaharu Workshop Development Gaharu Production Technology a Forest Community Based Empowerment, R&D Centre for Forest Conservation and Rehabilitation FORDA, Ministry of Forestry, Bogor. pp. 53-76.
- [14] Nuringtyas, T.R., R. Isromarina, Y. Septia, L. Hidayati, N. Wijayanti, and S. Moeljopawiro. 2018. The antioxidant and cytotoxic activities of the chloroform extract of agarwood (*Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke) leaves on HeLa cell lines. *AIP Conference Proceedings* 2002, 020067 (2018), doi: 10.1063/1.5050163.
- [15] Oliveira, R. C. de, S. C.1. V. Filho, A. V. S. Bastos, J. M. Vasconcelos, and A. A. Rodrigues. 2015. Anatomical and histochemical analysis of vegetative organs of *Vernonia ferruginea* Less. (Asteraceae). *African Journal of Biotechnology*, 14(38): 2734-2739
- [16] Parwata, A., P. Manuaba, S. Yasa, Wita. 2016a. Gaharu Leaf Water Extract Reduce MDA and 8-OHdG Levels and Increase Activities SOD and Catalase in Wistar Rats Provided Maximum Physical Activity. *Bali Medical Journal*. 5(3): 79-83.



- [17] Parwata, A., Manuaba, P. and Yasa, S. 2018. The Potency of Flavonoid Compounds in water Extract *Gyrinops Versteegii* Leaves as Natural Antioxidants Sources. *Biomedical & Pharmacology Journal*. 11(3): 1501-1511.
- [18] Puspita, Bq. J. 2019. Histokimia helaian daun *Gyrinops versteegii* provenan Soyun. PKL FMIPA Universitas Mataram, Mataram (tidak dipublikasi).
- [19] Sulistyani, A., T. R. Nuringtyas, N. Wijayanti, 2016. The Immunomodulatory Activity of Leaves Extracts of Gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. and *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke In Vitro. Available at http://etd.repository.ugm.ac.id/home/detail_pencarian/103330. Date accessed: 02/03/ 2020.
- [20] Yanti, I G. A. A. D., D.A., Swastini, I.M. Kardena, 2020. Skrining fitokimia ekstrak metanol daun gaharu (*Gyrinops versteegii* (Gilg) Domke). *Jurnal Farmasi Udayana*, [2(4): 37-40. Available at: <<https://ojs.unud.ac.id/index.php/jfu/article/view/7403>>. Date accessed: 02/03/ 2020.
- [21] Zulfa, H.I. 2019. Aktivitas antibakteri ekstrak daun dan kulit buah tiga spesies pohon penghasil gaharu. Skripsi. Departemen Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor