

Perkembangan Anatomis dan Kajian Histokimia Ovulum Steril Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Anatomical Development and Histochemical Study of Steril Ovule Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Wanda Aulia Pamungkas^{1,*}, Siti Susanti²

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

*Corresponding Author: wandaaulia2019@mail.ugm.ac.id

Abstrak: Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman yang tumbuh dan tersebar di seluruh wilayah Indonesia. Tanaman ini banyak dibudidayakan karena bernilai ekonomis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perkembangan anatomis ovulum steril melinjo pada bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina dan mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada ovulum steril melinjo. Bahan yang digunakan adalah ovulum steril melinjo bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina. Pada pengamatan perkembangan anatomis ovulum steril melinjo dibuat preparat dengan metode paraffin, pewarnaan tunggal, dan diamati dengan mikroskop. Data anatomi ovulum dianalisis secara deskriptif. Pengamatan kandungan metabolit sekunder dilakukan melalui uji histokimia, kemudian diamati dengan mikroskop cahaya dan hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan OptiLab. Hasil pengamatan perkembangan anatomis diketahui bahwa pada umur ovulum steril melinjo yang berbeda terdapat perbedaan struktural pada jaringan penyusunnya, semakin dewasa ovulum steril melinjo, jaringan penyusunnya semakin terdegradasi. Hasil pengamatan uji histokimia menunjukkan bahwa ovulum steril melinjo mengandung senyawa metabolit sekunder fenol, flavonoid, terpenoid, tanin, dan alkaloid.

Kata kunci: histokimia; melinjo; metode paraffin; ovulum steril.

Abstract: In this section, the abstract must be written in English. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) is a plant that grows and spreads throughout Indonesia. This plant is widely cultivated because of its economic value. The purpose of this study was to determine the anatomical development of sterile melinjo ovule at the tip, middle and base of the female strobili and to determine the content of secondary metabolites in melinjo sterile ovule. The material used is sterile ovulum melinjo at the tip, middle and base of the female strobilus. In observing the anatomical development of sterile melinjo ovule, preparations were made using the paraffin method, single staining, and observed under a microscope. The anatomical data of the sterile ovule were analyzed descriptively. Observation of secondary metabolite content was carried out through histochemical tests, then observed with a light microscope and the results of the observations were documented using OptiLab. The results of observing anatomical development show that at different ages of melinjo sterile ovule there are structural differences in the constituent tissues. The results of observations on anatomical development show that at different ages the melinjo sterile ovule has structural differences in its constituent tissue, the more mature the melinjo sterile ovule, the constituent tissue is increasingly degraded. Histochemical test results showed that the sterile melinjo ovule contained secondary metabolites of phenols, flavonoids, terpenoids, tannins, and alkaloids.

Keywords: histochemical; melinjo; paraffin method; sterile ovule

Dikumpulkan: 30 November 2022

Direvisi: 15 Juni 2023

Diterima: 28 Agustus 2024

Dipublikasi: 30 Agustus 2024

Pendahuluan

Melinjo termasuk tumbuhan yang dapat tumbuh sepanjang tahun atau biasa disebut tumbuhan *perennial* (Barua *et al.*, 2015). Sebagian besar bagian tumbuhan melinjo bermanfaat bagi manusia, mulai dari batang, daun, bunga, dan biji. Spesies ini dikenal kaya akan turunan resveratrol. Seperti halnya ekstrak buah dan biji telah dilaporkan menunjukkan beberapa aktivitas farmakologis. Di beberapa wilayah di Indonesia tumbuhan melinjo dibudidayakan, untuk diolah menjadi produk olahan makanan yang memiliki nilai ekonomi tinggi guna meningkatkan pendapatan. Sebagai contoh melinjo biasa diolah menjadi emping karena memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi (Aliudin dan Dian, 2012).

Melinjo merupakan salah satu contoh anggota Gymnospermae atau kelompok tumbuhan berbiji terbuka. Gymnospermae umumnya bersifat heterospora, memiliki biji, dan memiliki arkegonia yang nyata secara struktural dan fungsional. Namun pada Gymnospermae tidak semua anggotanya memiliki arkegonia, contohnya pada genus *Gnetum*, *Welwitschia*, dan *Sequoia*. Biji pada anggota Gymnospermae seperti halnya pada melinjo proses pembentukan dan perkembangannya berada di dalam ovulum atau bakal biji. Melinjo memiliki dua macam jenis ovulum yaitu ovulum fertil dan steril. Ovulum fertil akan tumbuh dan berkembang menjadi biji. Ovulum steril dalam perkembangannya akan gugur.

Struktur anatomis ovulum steril melinjo kemungkinan berbeda dengan struktur ovulum pada umumnya (fertil). Hal ini dikarenakan struktur anatomi ovulum steril pada beberapa spesies menunjukkan struktur yang berbeda antara ovulum steril dan fertil. Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Haddad *et al.* (2019) yang mengamati struktur ovulum steril pada *Maytenus obtusifolia* menunjukkan bahwa struktur ovulum steril memiliki integumen yang mengalami degenerasi dengan lapisan parenkim yang rusak, dan tanpa diferensiasi endotelium. Penelitian yang dilakukan oleh Fu *et al.* (2014) pada ovule sterile *Brassica napus* juga menunjukkan bahwa struktur integumen luar ovulum steril *Brassica napus* tidak berkembang. Tumbuhan melinjo memiliki berbagai senyawa metabolit sekunder terutama pada bagian biji

dan daunnya yang mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Mukhlis, 2014; Tanamal dkk., 2017). Keberadaan senyawa aktif yang tersimpan dalam jaringan sekretori pada tumbuhan diamati menggunakan metode histokimia. Metode histokimia merupakan metode yang penting dalam proses analisis dan identifikasi beberapa senyawa metabolit dan juga untuk menentukan tempat disintesisnya masing-masing senyawa metabolit tersebut (Dubey and Trivedi 2012; Yadav *et al.*, 2021).

Pemanfaatan melinjo khususnya pada bagian ovulum steril melinjo belum banyak dilakukan dan hanya sebatas dimanfaatkan sebagai bahan sayuran. Oleh karena itu, penelitian mengenai perkembangan anatomis dan kajian histokimia ovulum steril melinjo ini dilakukan sehingga dapat memberikan informasi mengenai perkembangan anatomis ovulum steril melinjo pada setiap fase perkembangannya dan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ovulum steril melinjo, sehingga dapat memudahkan pemanfaatan kedepannya dan dapat bernilai ekonomis yang lebih tinggi. Penelitian ini dilakukan dengan dua metode yaitu metode *embedding/paraffin* dan histokimia. Pada pengamatan perkembangan anatomis ovulum steril melinjo dilakukan dengan membuat preparat awetan dengan metode parafin menurut Sass (1958), pewarnaan tunggal, dan diamati dengan mikroskop. Pengamatan kandungan metabolit sekunder dilakukan melalui uji histokimia, kemudian diamati dengan mikroskop cahaya dan hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan OptiLab.

Bahan dan Metode

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli - Oktober 2022, di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Fak.ultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain botol flakon, pinset, jarum preparat, pipet tetes, kuas, cawan petri, scalpel, gelas benda, gelas penutup, silet, gelas ukur, oven, mikrotom putar, *hot plate*, *staining jar*, botol-botol penyimpanan larutan dan reagent, mikroskop cahaya, dan optilab.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ovulum steril melinjo yang diperoleh dari pohon

melinjo di Desa Jetis, Kecamatan Loano, Kabupaten Purworejo, Provinsi Jawa Tengah dan beberapa larutan untuk mengamati perkembangan anatomis ovulum steril melinjo dan untuk melakukan uji histokimia. Bahan larutan yang digunakan untuk mengamati perkembangan anatomis ovulum steril melinjo yaitu alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 100%, larutan fiksatif FAA (terdiri dari campuran formalin 5 ml, asam asetat glasial 5 ml, dan alkohol 70% 90 ml), larutan xilol, parafin, Kanada balsam, safranin 1% dalam alkohol 70%. Bahan kimia yang digunakan untuk uji histokimia yaitu larutan 10% FeCl₃, larutan 5 % CuSO₄, larutan 5% NaOH, larutan K₂CrO₄, dan reagen Dragendorff.

Cara Kerja

1. Pembuatan Preparat Anatomis Ovulum Steril Melinjo Menurut Sass (1958)

Sampel ovulum steril melinjo dimasukkan ke dalam botol flakon. Diisi dengan larutan fiksatif (FAA). Fiksasi dilakukan selama 24 jam dalam suhu ruang. Pada hari kedua dilakukan pencucian dan dehidrasi terhadap sampel. Setelah 24 jam larutan FAA dibuang lalu diganti alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 100% I, dan alkohol 100% II masing-masing selama 30 menit. Dehidrasi selesai dilanjutkan proses dealkoholisasi. Sampel ovulum dipindahkan ke dalam larutan alkohol-xilol berturut-turut dengan perbandingan alkohol-xilol 3:1, 1:1, 1:3, xilol I, xilol II masing-masing selama 30 menit. Sampel ovulum dimasukkan ke dalam campuran xilol:parafin 1:9 selama 24 jam di dalam oven dengan temperatur 57^o C.

Pada hari ketiga campuran xilol/parafin dibuang diganti dengan parafin murni. Dilakukan inkubasi selama 24 jam pada temperatur 57^o C. Pada hari ke empat parafin yang telah digunakan dibuang dan digantidengan parafin murni yang baru. Setelah ± 1 jam dibuat balok. Sampel ovulum ditanam dalam kotak karton yang berisi parafin cair, dan diaturposisinya sehingga tepat berada di tengah dan terselubungi oleh parafin dan dibiarkan membeku. Pada hari ke lima parafin dilepaskan dari kotak karton, dilakukan pemotongan dengan hati-hati. Ditempel pada kayu (holder) menurut arah sayatan dan sebagian blok parafin dicairkandengan sklalpel yang telah dipanasi. Blok parafin yang berisi ovulum dipotong menggunakan mikrotom putar (*rotary microtom*) dengan tebal irisan ± 8 µm. Hasil

potongan direkatkan pada gelas benda yang telah diolesi dengan campuran albumin:gliserin (1:1) dan ditetesi air. Gelas benda diletakkan diatas *hot plate* sampai pita parafin merenggang. Pada hari ke enam setelah pita parafin merenggang dilakukan deparafinisasi dengan cara gelas benda yang berisi pita parafin drendamdalam *staining jar* secara bertingkat dengan larutan xilol I, xilol II, alkohol:xilol (1:3), alkohol:xilol(1:1), alkohol:xilol (3:1), alkohol 100% I, alkohol 100% II, alkohol 95%, alkohol 80%, dan alkohol 70% masing-masing selama 3 menit. Setelah itu gelas benda dimasukkan ke dalam pewarna safranin 1% dalam alkohol 70% selama 1 jam. Dehidrasi dilakukan secara bertingkat dengan alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol95%, alkohol 100 % I, dan alkohol 100% II masing-masing diinkubasi selama 1 menit. Dealkoholisasi dilakukan secara bertingkat dengan alkohol:xilol (3:1), alkohol:xilol (1:1), alkohol:xilol (1:3), xilol I, dan xilol II masing-masing diinkubasi selama 1 menit. Irisan ovulum ditetesiKanada balsam dan ditutup dengan gelas penutup. Preparat dikeringkandi atas *hot plate* dengan temperatur 45^o C hingga kanada balsam kering.Di bagian kiri gelas penutup dilekatkan etiket dan diberi keterangan.

2. Pengamatan Perkembangan Anatomis Ovulum Steril Melinjo

Preparat ovulum steril melinjo yang telah dibuat dengan metode parafin diamati dengan digunakan mikroskop cahaya. Pengamatan dilakukan untuk melihat perkembangan anatomi ovulum steril. Perkembangan anatomi ovulum steril difoto dengan Optilab.

3. Uji Histokimia Ovulum Steril Melinjo

Uji Histokimia dilakukan dengan membuat preparat segar ovulum steril melinjo yang dipotong melintang menggunakan silet. Setiap potongan melintang diuji menggunakan berbagai reagen untuk masing-masing golongan senyawa metabolit sekunder, yaitu sebagai berikut :

3.1. Fenol

Ovulum steril melinjo dipotong secara melintang dengan menggunakan silet. Potongan melintang ovulum steril melinjo diletakkan pada gelas benda, lalu diberi satu tetes larutan K₂CrO₄. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu ditutup dengan gelas benda dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dan didokumentasikan

dengan Optilab. Hasil uji positif ditandai dengan warna kuning kecoklatan (Badria and Abaelmaaty, 2020; Linggawati et al., 2022).

3.2. Terpenoid

Ovulum steril melinjo dipotong secara melintang dengan menggunakan silet. Potongan melintang ovulum steril melinjo diletakkan pada gelas benda, lalu diberi satu tetes larutan 5 % CuSO₄. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu ditutup dengan gelas benda dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dan didokumentasikan dengan Optilab. Hasil uji positif ditandai dengan warna kuning hingga kuning kecoklatan (Andriya, 2016; Rahayu dkk., 2021; Linggawati et al., 2022).

3.3. Flavonoid

Ovulum steril melinjo dipotong secara melintang dengan menggunakan silet. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu diletakkan pada gelas benda, lalu diberi satu tetes larutan 5% NaOH. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu ditutup dengan gelas benda dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dan didokumentasikan dengan Optilab. Hasil uji positif ditandai dengan warna kuning (Badria and Walaa, 2020).

3.4. Alkaloid

Ovulum steril melinjo dipotong secara melintang dengan menggunakan silet. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu diletakkan pada gelas benda, lalu diberi satu tetes larutan Dragendorf. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu ditutup dengan gelas benda dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dan didokumentasikan dengan Optilab. Hasil uji positif ditandai dengan warna jingga-coklat (Rismawati dkk., 2018).

3.5. Tanin

Ovulum steril melinjo dipotong secara melintang dengan menggunakan silet. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu diletakkan pada gelas benda, lalu diberi satu tetes larutan 10% FeCl₃. Potongan melintang ovulum steril melinjo lalu ditutup dengan gelas benda dan didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dan didokumentasikan dengan Optilab. Hasil uji positif ditandai dengan warna hijau, biru tua atau hitam jika positif tanin (Sa'adah 2010; Sari dkk., 2015).

Hasil dan Pembahasan

A. Morfologi Ovulum Melinjo

Bunga betina melinjo tersusun dalam strobilus dengan jumlah ovulum steril yang lebih besar dibandingkan ovulum fertil. Bunga betina melinjo memiliki bentuk yang memanjang dan beruas-ruas; setiap ruas memiliki beberapa ovulum fertil dan steril, dengan bentuk lebih membulat, memiliki tepi rata dan lancip (Gambar 8, c, d). Bunga betina pada melinjo berwarna hijau-hijau kekuningan dengan struktur strobilus yang bertangkai, dan setiap collar berbentuk cincin tunggal. Pada setiap *collar* terdapat sekitar 4-5 ovulum steril melinjo dan 1-2 ovulum fertil melinjo (Gambar 8).

Bunga melinjo mengalami perubahan bentuk dan ukuran selama proses perkembangannya. Meskipun tidak mencerminkan perkembangan dan umur, perubahan ukuran dan massa sel menunjukkan adanya pertumbuhan dan perkembangan. Pada penelitian ini digunakan beberapa ovulum steril melinjo dari bagian pangkal, tengah, dan ujung strobilus betina untuk mengetahui struktur anatomi dan perkembangan ovulum steril melinjo serta mengetahui berbagai macam kandungan metabolit sekunder yang ada di dalamnya. Strobilus betina memiliki ciri-ciri morfologi seperti terlihat pada Gambar 8.



Gambar 1. Morfologi strobilus betina melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Keterangan: a: internodus, b: nodus, c: ovulum steril, d: ovulum fertil.

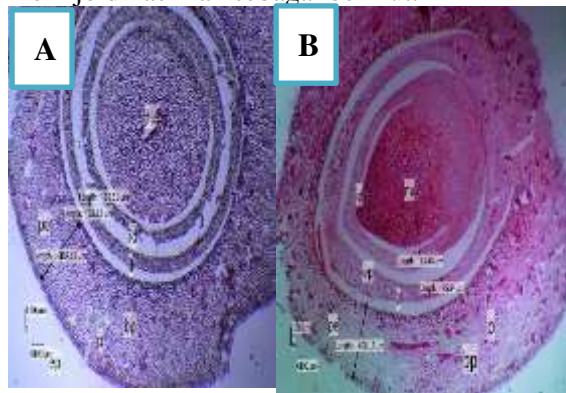
Berdasarkan pengukuran yang dilakukan pada enam buah strobilus diperoleh rata-rata panjang strobilus yaitu 7,3 cm, dengan rata-rata panjang internodus yaitu 0,66 cm, rata-rata panjang nodus 0,26 cm, rata-rata panjang ovulum steril 0,3 cm, dan rata-rata diameter ovulum steril 0,2 cm. Pada penelitian ini digunakan ovulum steril dengan warna hijau kekuningan (Gambar 8). Ovulum steril yang digunakan yaitu pada bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina melinjo. Panjang rata-rata ovulum steril melinjo bagian

ujung yaitu 0,34 cm dan rata-rata diameternya 0,2 cm. Panjang rata-rata ovulum steril melinjo bagian tengah yaitu 0,38 cm dan rata-rata diameternya 0,2 cm. Panjang rata-rata ovulum steril melinjo bagian pangkal yaitu 0,4 cm dan rata-rata diameternya 0,26 cm.

B. Anatomis Ovulum Steril Melinjo

Anatomi merupakan suatu ilmu yang mempelajari bentuk dan struktur dari suatu organ, sistem organ, dan organisme baik pada tumbuhan maupun hewan (Yusupovna, 2020). Suatu organ tersusun oleh jaringan. Jaringan tersusun oleh sekelompok sel yang memiliki tugas dan fungsi yang sama. Suatu spesies tumbuhan dapat memiliki anatomi yang berbeda antara satu spesies dengan spesies yang lain. Hal ini dipengaruhi oleh adanya faktor, baik faktor internal maupun faktor eksternal. Pada pengamatan anatomis ovulum steril melinjo dihasilkan sebagai berikut:

Pada pengamatan anatomis ovulum steril melinjo dihasilkan sebagai berikut:



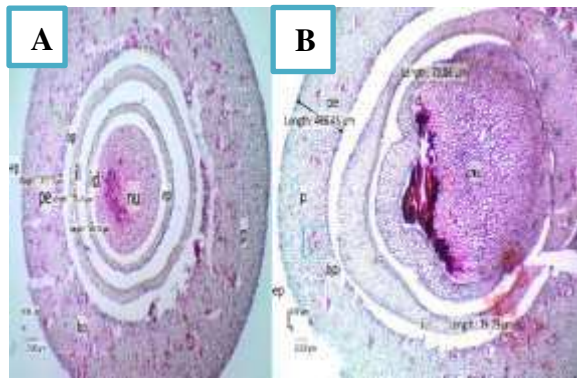
Gambar 2. Ovulum steril melinjo (*Gnetum gnemon* L.) bagian ujung strobilus betina. A. penampang lintang ovulum steril melinjo, B. penampang bujur ovulum steril melinjo. Keterangan: ep: epidermis, id: integumen dalam, il: integumen luar, nu: nuselus, pe: perianthium.

Berdasarkan Gambar 2. pada hasil tersebut menunjukkan bahwa penampang bujur tersusun dari perianthium yang memiliki tebal 466,17 μm , integumen luar memiliki tebal 76,94 μm , integumen dalam memiliki tebal 65,46 μm , dengan bentuk dan ukuran sel yang seragam (Gambar 2B, id). Integumen dalam terbentuk lebih tipis dibandingkan bagian pada integumen luar. Pada ovulum bagian ujung/ ovulum muda ini menunjukkan nuselus dengan lapisan dermal yang masih menyatu (Gambar 2B, nu). Pada penampang melintang juga tersusun dari

perianthium, integumen luar, integumen dalam, dan perianthium. Perianthium memiliki tebal 458,15 μm , integumen luar memiliki tebal 65,13 μm , dan integumen dalam dengan tebal 60,51 μm . Pada bagian perianthium dikedua penampang ditemukan adanya berkas pengangkut (Gambar 2 A, B, bp). Ovulum steril melinjo pada bagian ujung tidak ditemukan adanya *pollen chamber*. *Pollen chamber* merupakan suatu ruangan yang terbentuk pada ujung nuselus, berfungsi untuk menampung polen yang belum masak serta untuk menjaga viabilitas polen.

Perianthium dari suku Gnetales terdiri dari dua pasang *connats bracts*. Hal ini dianalogikan bahwa perianthium dari Angiospermae primitif memiliki persamaan dengan perianthium pada *Gnetum* (Thompson, 1916). Pada tahapan ini integumen luar mulai berkembang. Integumen dalam berkembang dari primordium *annular* setelah berkembangnya integumen luar, dan ovula masih memiliki lapisan dermal yaitu epidermis yang belum menyatu (Gambar 2B). Nuselus itu sendiri menjadi massa sel penyusun megasporangium yang dikelilingi oleh satu lapis sel epidermis. Pada ovulum steril bagian ujung perkembangan nuselus untuk lapisan dermalnya juga masih teramati menyatu (Gambar 2B, nu).

Pada mulanya genus *Gnetum* memiliki cincin yang umumnya berdiferensiasi secara merata dan berorientasi secara horizontal sehubungan dengan sumbu pada strobilus. Cincin annular pada mulanya terdiri dari lapisan dermal dan subdermal. Namun, lapisan dermal tersebut menunjukkan hasil pembelahan sel periklinal setelah pembentukan cincin annular. Hasil pertumbuhan tersebut dikarenakan adanya aktivitas mitosis di setiap sel penyusunnya. Pada *Gnetum* memiliki ciri yang khas karena memiliki dua integumen, sehingga berbeda dengan kelompok lain pada Gymnospermae yang memiliki integumen tunggal. Hal ini membuktikan bahwa sebagian struktur ovula strobilus betina pada *Gnetum* memiliki kemiripan dengan ovula Angiospermae (Thompson, 1916).



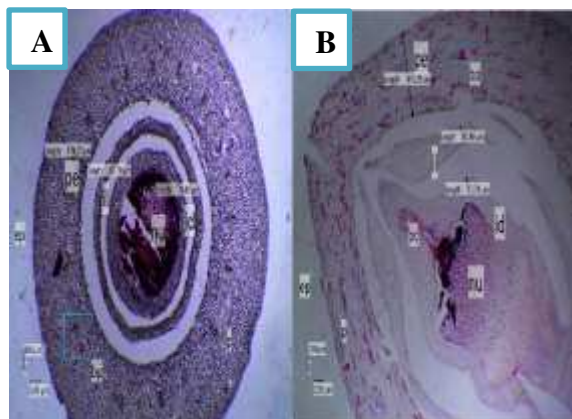
Gambar 3. Ovulum steril melinjo (*Gnetum gnemon* L.) bagian tengah strobilus betina. A. penampang lintang ovulum steril melinjo, B. penampang bujur ovulum steril melinjo. Keterangan: ep: epidermis, id: integumen dalam, il: integumen luar, nu: nuselus, pe: perianthium.

Berdasarkan pada Gambar 3. hasil preparat penampang lintang yang teramat terdapat perianthium yang memiliki tebal $469,77 \mu\text{m}$, dan pada penampang bujur memiliki tebal $468,45 \mu\text{m}$. Perianthium tersusun dari jaringan parenkim, epidermis tipis dibagian luar, dan terdapat berkas pengangkut di bagian dalamnya (Gambar 3A, 10 B, pe). Perianthium merupakan jaringan berdaging tebal dan lunak, pada *Gnetum* bunga betina memiliki perianthium tubular (Gambar 3A, 3B, pe). Penampang lintang memiliki tebal integumen luar $75,19 \mu\text{m}$ dan tebal integumen dalam $68,33 \mu\text{m}$ (Gambar 3A, il; id). Penampang bujur memiliki tebal integumen luar $79,29 \mu\text{m}$ dan tebal integumen dalam $70,86 \mu\text{m}$ (Gambar 3B, il; id). Pada kedua penampang menunjukkan bahwa struktur integumen luar lebih tebal dan tersusun dari jaringan sklerenkim yang kompleks, memiliki bentuk dan ukuran sel yang seragam (Gambar 3A, 3B, il). Integumen dalam pada kedua penampang menunjukkan struktur yang lebih tipis dibandingkan integumen luar dan perianthium (Gambar 3A, 3B, id). Nuselus terdiri dari satu lapis sel epidermis yang tepat disebelah dalam integumen dalam (Gambar 3A, 3B, nu). Pada kedua penampang menunjukkan bahwa nuselus bagian ujung mengalami degradasi, sehingga strukturnya rusak.

Struktur yang mengalami kerusakan ini yaitu pada bagian ujung nuselus yang dekat dengan *pollen chamber*. Nuselus merupakan dinding megasporangium (Nugroho dkk., 2005). Nuselus juga berperan sebagai jaringan nutritif bagi embrio (Nugroho dkk., 2005). *Pollen chamber*

merupakan suatu ruangan yang terbentuk pada ujung nuselus, yang memiliki fungsi untuk menampung polen yang belum masak serta untuk menjaga viabilitas polen sebelum membentuk gamet-gamet jantan. Struktur nuselus yang mengalami degradasi kemungkinan menyebabkan sifat ovula steril. Hal tersebut dikarenakan ovulum berperan sebagai dinding megasporangium, selain itu nuselus juga berperan sebagai jaringan nutritif bagi embrio. Bagian ujung nuselus yang mengalami kerusakan, kemungkinan juga mempengaruhi fungsi dan struktur *pollen chamber* sehingga tidak sempurna. Struktur *pollen chamber* yang tidak sempurna, hal ini kemungkinan yang menyebabkan sifat ovulum menjadi steril. Hal tersebut dikarenakan *pollen chamber* tidak berfungsi dengan baik, sehingga tidak dapat menjaga polen yang belum masak serta tidak dapat menjaga viabilitas polen. Sehingga bakal biji (ovula) tidak dapat berkembang lebih lanjut menjadi biji, dan sifat ovula menjadi steril.

Ovulum memulai perkembangan awalnya sebagai suatu tonjolan kecil yang disebut nuselus. Nuselus yang bersifat parenkimatis terletak pada sebelah dalam integumen (Gambar 3A, 3B, nu). Integumen dalam berawal seperti alur yang berupa cincin, kemudian mengalami pertumbuhan ke arah ujung nuselus, namun tidak mengalami pertumbuhan pada bagian basal mikropil ovulum. Sedangkan integumen luar terbentuk pada jaringan protoderm yang posisinya lebih rendah. Perkembangan selanjutnya sama dengan integumen dalam. Sebagian besar tumbuhan, integumen luar tidak mencapai mikropil. Pada ovulum anantropus pertumbuhan integumen yaitu asimetri. Berdasarkan hasil pengamatan *Gnetum gnemon* L., memiliki dua integumen atau bitemik (Gambar 3A, 3B, il, id). Pada umumnya bentuk ovula muda yaitu sub globuse atau mendekati globular, tetapi berubah menjadi ovoid dengan diameter terbesar di bagian sub basal pada tahap dewasa.



Gambar 4. Ovulum steril melinjo (*Gnetum gnemon* L.) bagian pangkal strobilus betina melinjo (*Gnetum gnemon* L.). A. penampang lintang ovulum steril melinjo, B. penampang bujur ovulum steril melinjo. Keterangan: ep: epidermis, id: integumen dalam, il: integumen luar, nu: nuselus, pe: perianthium, pc: *pollen chamber*.

Berdasarkan Gambar 4. pada preparat penampang lintang teramati perianthium dengan tebal 478,25 μm , integumen luar memiliki tebal 82,79 μm , dan integumen dalam memiliki tebal 76,00 μm . Pada preparat bujur teramati perianthium yang memiliki tebal 470, 28 μm , integumen luar memiliki tebal 80,46 μm , dan integumen dalam memiliki tebal 72,28 μm . Perianthium merupakan jaringan berdaging tebal dan lunak (Gambar 4 A, B, pe). Pada kedua penampang terlihat bahwa perianthium tersusun dari jaringan parenkim, epidermis tipis dibagian luar, dan terdapat berkas pengangkut di bagian dalamnya (Gambar 4 A, B, pe). Integumen luar lebih tebal dibandingkan integumen dalam. Integumen luar tersusun dari jaringan sklerenkim yang kompleks, memiliki bentuk dan ukuran sel yang seragam (Gambar 4 A, il). Pada kedua penampang ovulum steril bagian pangkal juga menunjukkan bahwa nuselus bagian ujung dekat dengan *pollen chamber* mengalami degradasi atau mengalami kerusakan struktur (Gambar 4 B, nu). Struktur nuselus yang tidak sempurna, hal ini kemungkinan yang menyebabkan sifat ovulum menjadi steril. Hal tersebut dikarenakan nuselus sebagai dinding megasporangium dan berperan sebagai jaringan nutritif bagi embrio tidak berfungsi dengan baik. Hal ini kemungkinan yang menyebabkan bakal biji (ovula) tidak dapat berkembang lebih lanjut menjadi biji, dan sifat ovula dikatan steril.

Integumen luar meningkat secara sekunder, hal tersebut dikarenakan adanya pembelahan dan

permanjangan pada bagian subdermalnya (Gambar 4 A, il). Bagian dari integumen dalam mengelilingi nuselus tetap tipis dan tidak berdiferensiasi (Gambar 4 A, 4 B, id). Integumen luar terdiri dari jaringan yang bersifat sklerenkimatis (Gambar 4 A, B, il). Berkas pengangkut terdapat di perianthium (Gambar 4 A, B, bp). Berkas pengangkut pada perianthium terdiri dari xilem dan floem. Floem tersusun atas sel-sel yang berbentuk bulat. Xilem terletak di bagian sebelah dalam floem, dan tersusun dari sel-sel yang mengalami lignifikasi.

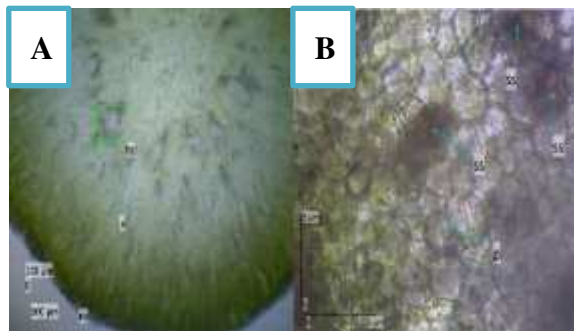
Pada bagian tengah ovulum terdapat nuselus (Gambar 2 A, B, 3A, B, 4A, B, nu). Nuselus merupakan jaringan yang membentuk kandung lembaga. Satu ovulum memiliki satu nuselus. Nuselus dibedakan menjadi tiga tipe yaitu krasinuselat, tipe krasinuselat semu, dan tipe tenuiselat. Tipe krasinuselat merupakan tipe nuselus dimana sel arkesporial (sel hipodermal) membelah secara transversal, menghasilkan dua sel, sel bagian luar atau sel parietal primer dan sel bagian dalam atau sel sporogen. Tipe krasinuselat semu merupakan tipe nuselus ketika sel-sel arkesporial berkembang dari lapisan sub-hipodermal. Nuselus tipe tenuiselat merupakan tipe nuselus ketika sel sporogen (sel hipodermal) merupakan sel hipodermal sehingga sel sporogen berbatasan langsung dengan epidermis nuselus (Rudal *et al.*, 2008). Berdasarkan tipe tersebut famili Gnetaceae termasuk tipe krasinuselat

C. Distribusi Senyawa Metabolit Sekunder pada Ovulum Steril Melinjo

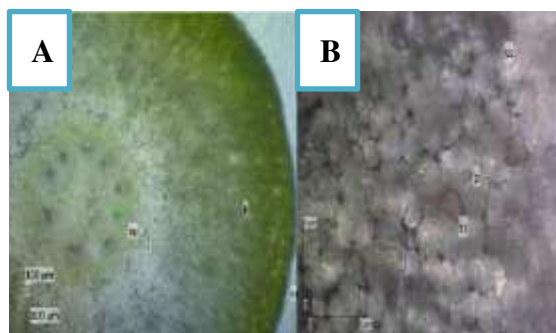
Pada penelitian ini dilakukan uji histokimia pada ovulum steril melinjo pada bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina. Pengujian ini dilakukan untuk mendeteksi distribusi senyawa metabolit sekunder berupa senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan tanin. Pengujian senyawa fenol menggunakan larutan K_2CrO_4 dan hasil positifnya berwarna kuning kecoklatan (Badria and Aboelmaaty, 2020; Lingawati *et al.*, 2022). Pengujian senyawa flavonoid menggunakan larutan 5% NaOH dan hasil uji positif ditandai dengan warna kuning (Badria and Walaa, 2020). Pengujian senyawa alkaloid menggunakan larutan Dragendorff dan hasil uji positif ditandai dengan warna jingga-coklat (Rismawati dkk., 2018). Pengujian senyawa terpenoid menggunakan larutan CuSO_4

5% dan hasil uji positif ditandai dengan warna kuning hingga kuning kecoklatan (Andriya, 2016; Rahayu dkk., 2021; Linggawati *et al.*, 2022). Pengujian senyawa tanin menggunakan larutan 10% FeCl₃ dan hasil uji positif ditandai dengan warna hijau, biru tua atau hitam jika positif tanin (Sa'adah 2010; Sari dkk., 2015).

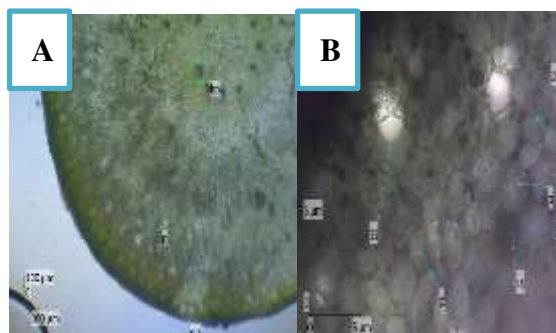
Metabolit sekunder merupakan suatu kelompok senyawa yang keberadaannya spesifik untuk takson tertentu dan tidak mutlak diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan makhluk hidup, tetapi memainkan peranan dalam interaksi dengan makhluk hidup lain maupun dengan lingkungannya sehingga memiliki peranan dalam menjamin kelangsungan hidup makhluk hidup tersebut di alam (Verpoorte, 2000; Nugroho, 2017). Berdasarkan pengamatan mikroskopis yang dilakukan pada beberapa sample ovulum steril melinjo pada strobilus betina bagian ujung, tengah, dan pangkal menunjukkan bahwa ovulum steril melinjo mengandung senyawa metabolit sekunder berupa fenolik, flavonoid, terpenoid, tanin, dan alkaloid. Persebaran senyawa metabolit sekunder tersebut berada pada bagian epidermis dan parenkim.



Gambar 5. Uji histokimia senyawa fenolik pada ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.



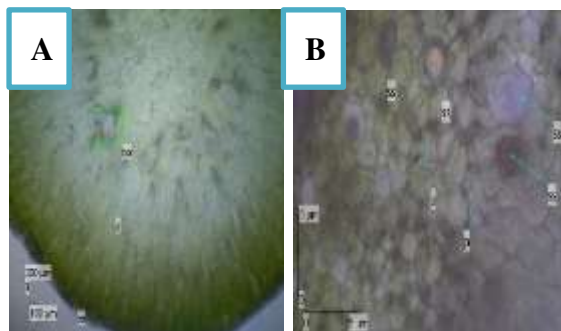
Gambar 6. Uji histokimia senyawa fenolik pada ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.



Gambar 7. Uji histokimia senyawa fenolik pada ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

Hasil positif ovulum steril melinjo yang mengandung senyawa fenolik ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi kuning kecoklatan setelah direaksikan dengan larutan K₂CrO₄ (Gambar 5, 6, 7, B). Gambar 5, 6, 7, A menunjukkan penampang lintang ovulum steril melinjo kontrol. Pada kontrol tidak menunjukkan reaksi positif mengandung fenolik. Hal tersebut dikarenakan pada kontrol hanya ditetesi akuades sehingga tidak terjadi proses reaksi. Ovulum steril melinjo bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina yang positif mengandung senyawa fenolik yaitu tersebar pada bagian parenkim perianthium. Jenis jaringan sekretori internal yang teramati berupa sel sekretori (Gambar 5, 6, 7, B, ss). Sel sekretori merupakan sel idioblas yaitu sel yang memiliki ukuran, bentuk, dan kandungan isi yang berbeda dari sel-sel lainnya dalam satu jaringan.

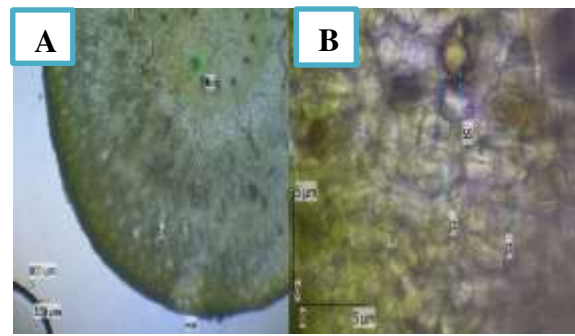
Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jaringan yang positif mengandung senyawa metabolit sekunder berupa fenolik pada ovulum steril melinjo yaitu pada bagian parenkim perianthium dan jenis jaringan sekretorinya berupa sel sekretori (Gambar 5, 6, 7, ss). Penelitian yang dilakukan oleh Ummah (2022) pada biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada bagian epidermis, berkas pengangkut, dan parenkim menunjukkan hasil positif senyawa fenolik dan jenis jaringan sekretorinya berupa sel sekretori. Pada penelitian yang dilakukan ini juga menunjukkan bahwa pada jaringan parenkim perianthium terdapat pulasan berwarna kuning kecoklatan setelah ditetesi dengan larutan K_2CrO_4 dan dидiamkan sekitar 15 menit (Gambar 5, 6, 7, p). Senyawa fenolik pada tumbuhan berperan dalam berbagai proses seperti melindungi tumbuhan dari berbagai macam patogen, memberi warna, aroma, dan berperan dalam *stress resistance* dan berbagai proses fisiologis lainnya (Zhang *et al.*, 2022). (Zhang *et al.*, 2022). Selain itu senyawa fenolik juga berperan bagi manusia. Hal tersebut dikarenakan senyawa fenolik memiliki aktivitas sebagai antioksidan, anti mikroba, anti kanker, anti inflamasi (Zhang *et al.*, 2022).



Gambar 8. Uji histokimia senyawa flavonoid pada ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.



Gambar 9. Uji histokimia senyawa flavonoid pada ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

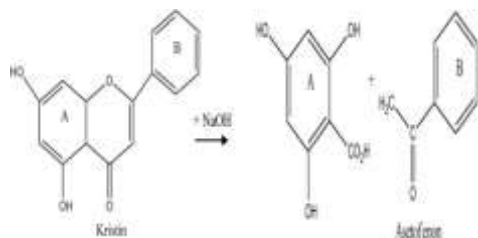


Gambar 10. Uji histokimia senyawa flavonoid pada ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

Hasil positif ovulum steril melinjo yang mengandung senyawa flavonoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi kuning setelah direaksikan dengan larutan 5% NaOH (Gambar 8, 9, 10, B). Gambar 8, 9, 10, A menunjukkan penampang lintang ovulum steril melinjo kontrol. Pada kontrol tidak menunjukkan reaksi positif mengandung flavonoid. Hal tersebut dikarenakan pada kontrol hanya ditetesi akuades sehingga tidak terjadi proses reaksi. Ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina yang positif mengandung flavonoid yaitu tersebar pada bagian parenkim perianthium (Gambar 8, B, p). Ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina yang positif mengandung flavonoid yaitu tersebar pada bagian epidermis dan parenkim perianthium (Gambar 9, B, p). Pada ovulum steril melinjo bagian pangkal

strobilus betina yang positif mengandung flavonoid yaitu tersebar pada bagian epidermis, parenkim perianthium (Gambar 10, B, e, p). Dari pengamatan yang dilakukan teramati dengan jelas jenis jaringan sekretori pada ovulum steril melinjo yaitu berupa sel sekretori yang berbentuk poligonal (Gambar 8, 9, 10, ss). Sel sekretori merupakan sel yang bersifat idioblas dan tunggal, dan dapat memiliki bentuk serta ukuran yang berbeda dengan sel disekitarnya (Nugroho, 2017).

Penelitian yang dilakukan oleh Ummah (2022) pada biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada bagian epidermis, berkas pengangkut, dan parenkim juga menunjukkan hasil positif senyawa flavonoid, dengan jenis jaringan sekretori berupa sel sekretori. Pada penelitian ini juga menunjukkan hasil positif mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid. Senyawa flavonoid ditemukan pada bagian epidermis dan parenkim perianthium, dengan jenis jaringan sekretori internalnya berupa sel sekretori. Hasil tersebut ditunjukkan dengan adanya pulasan berwarna kuning pada penampang lintang ovulum steril melinjo yang telah ditetesi dengan larutan 5 % NaOH dan didiamkan sekitar 15 menit. Terbentuknya pulasan warna berwarna kuning karena terjadi sistem konjugasi dari gugus aromatik (Desandi, 2014; Kusnadi dan Egie, 2017). Suatu sample yang mengandung flavonoid ketika diuji dengan NaOH akan terbentuk pulasan warna kuning. Hal tersebut karena senyawa flavonoid mengalami penguraian oleh basa (NaOH) menjadi molekul seperti asetofenon yang berwarna kuning yang diakibatkan oleh adanya pemutusan ikatan pada struktur isoprena.



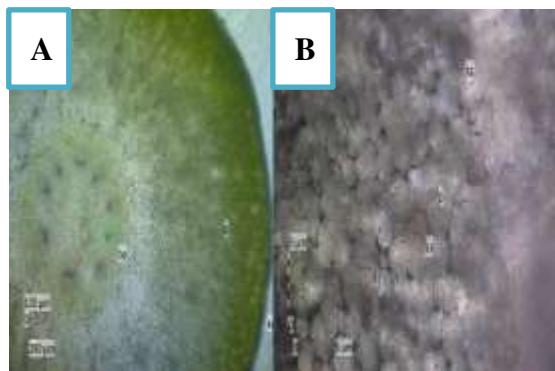
Gambar 11. Reaksi flavonoid dengan NaOH (Kusnadi dan Egie, 2017).

Adanya pulasan warna kuning pada ovulum steril melinjo setelah ditetesi larutan 5% NaOH, hal tersebut menunjukkan bahwa ovulum steril melinjo mengandung senyawa flavonoid

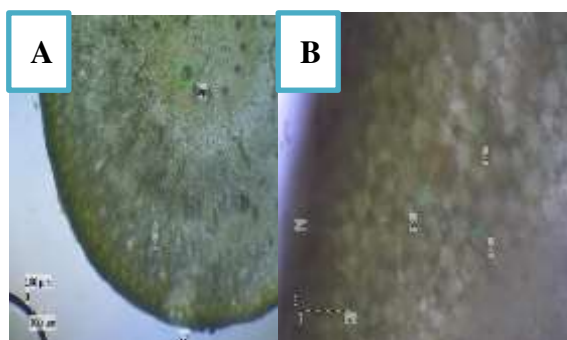
(Gambar 8, 9, 10, B). Senyawa flavonoid termasuk kelompok senyawa fenol yang tersebar di berbagai tumbuhan seperti halnya pada buah-buahan, sayuran, kulit batang, akar, batang, bunga, teh, dan biji-bijian (Panche *et al.*, 2016). Senyawa flavonoid memiliki peranan penting dalam berbagai proses tumbuhan seperti dalam proses pemberi warna (pigmentasi), membantu menarik polinator, memberi warna pada bunga, membantu persebaran biji, membantu perkecambahan spora, melindungi tumbuhan dari tekanan biotik dan abiotik yang kurang menguntungkan, melindungi tumbuhan dari pancaran sinar UV, berperan sebagai molekul sinyal, sebagai senyawa alelopati, phytoalexins, membantu melindungi dari berbagai mikroba yang kurang menguntungkan (Panche *et al.*, 2016). Selain itu senyawa flavonoid juga berperan bagi manusia. Hal tersebut dikarenakan senyawa flavonoid memiliki aktivitas sebagai *anti-oxidative*, *anti-inflammatory*, *anti-mutagenic*, dan *anti-carcinogenic* (Panche *et al.*, 2016). Senyawa flavonoid juga memiliki aktivitas sebagai antikanker, antimikrobia, antiviral, *anti-angiogenic*, antimalaria, *antioxidant*, *neuroprotective*, antitumor, dan *anti-proliferative agents* (Ullah *et al.*, 2021).



Gambar 12. Uji histokimia senyawa terpenoid pada ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.



Gambar 13. Uji histokimia senyawa terpenoid pada ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

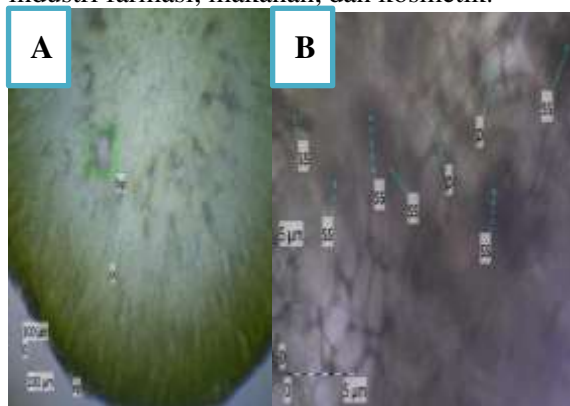


Gambar 14. Uji histokimia senyawa terpenoid pada ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

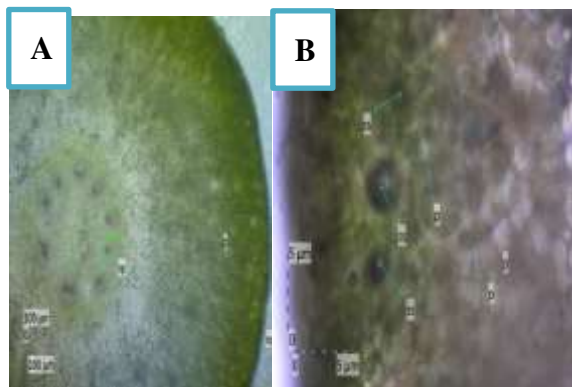
Hasil positif tersebut ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi kuning sampai kuning kecoklatan setelah direaksikan dengan larutan 5% CuSO_4 (Gambar 12, 13, 14, B). Gambar 12, 13, 14, A menunjukkan penampang lintang ovulum steril melinjo kontrol. Pada kontrol tidak menunjukkan reaksi positif mengandung senyawa terpenoid. Hal tersebut dikarenakan pada kontrol hanya ditetesi akuades sehingga tidak terjadi proses reaksi. Ovulum steril melinjo bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina yang positif mengandung terpenoid yaitu pada bagian parenkim perianthium (Gambar 12, 13, 14, B, p). Jenis jaringan sekretori internal yang teramati yaitu berupa sel sekretori dengan bentuk poligonal (Gambar 12, 13, 14, ss).

Penelitian yang dilakukan oleh Adhityasmara dkk., (2020) pada ekstrak kulit melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menunjukkan bahwa kulit melinjo

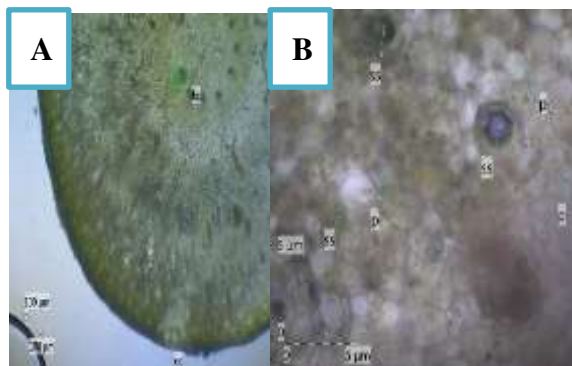
mengandung terpenoid. Terpenoid berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kuntorini dkk.,(2020) menunjukkan bahwa senyawa terpenoid tersebar di bagian epidermis, korteks, parenkim, dan berkas pengangkut. Hasil penelitian yang dilakukan juga menunjukkan bahwa pada jaringan parenkim perianthium mengandung senyawa terpenoid (Gambar 12, 13, 14, B, p). Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya pulasan warna kuning kecoklatan setelah penampang lintang ovulum steril melinjo ditetesi dengan larutan 5% CuSO_4 dan didiamkan sekitar 15 menit (Gambar 12, 13, 14, B). Hal tersebut menunjukkan bahwa ovulum steril melinjo mengandung senyawa terpenoid. Terpenoid merupakan suatu senyawa yang paling melimpah di alam dan berasal dari jalur asam mevalonat (MVA) yang terdiri dari sejumlah unit struktural isoprena (C_5) (Yang *et al.*, 2020). Terpenoid banyak ditemukan di alam dengan berbagai struktur dan keragaman yang luas. Peranan senyawa terpenoid bagi tumbuhan yaitu berperan dalam respon terhadap lingkungan dan proses fisiologis. Adapun kandungan senyawa terpenoid memiliki aktivitas antitumor, anti-inflamasi, antibakteri, antivirus, antimalaria, meningkatkan penyerapan transdermal, mencegah dan mengobati penyakit kardiovaskular, dan memiliki aktivitas hipoglikemik (Yang *et al.*, 2020). Bagi manusia senyawa terpenoid banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi, makanan, dan kosmetik.



Gambar 15. Uji histokimia senyawa tanin pada ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.



Gambar 16. Uji histokimia senyawa tanin pada ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

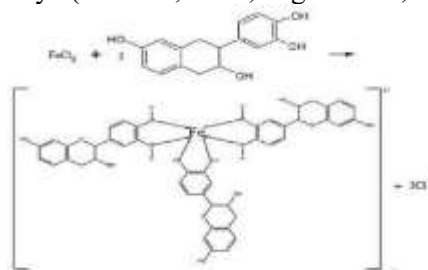


Gambar 17. Uji histokimia senyawa tanin pada ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

Hasil positif tersebut ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi hitam setelah direaksikan dengan larutan 10% FeCl_3 (Gambar 15, 16, 17, B). Gambar 15, 16, 17, A menunjukkan penampang lintang ovulum steril melinjo kontrol. Pada kontrol tidak menunjukkan reaksi positif mengandung tanin. Hal tersebut dikarenakan pada kontrol hanya ditetesi akuades sehingga tidak terjadi proses reaksi.

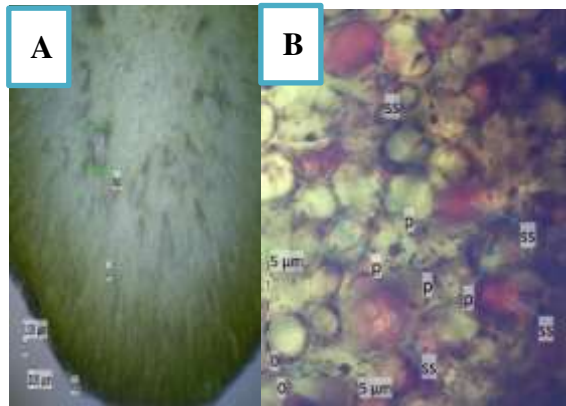
Ovulum steril melinjo bagian ujung, tengah, dan pangkal strobilus betina yang positif mengandung tanin yaitu pada bagian parenkim perianthium (Gambar 15, 16, 17, B, p). Jenis jaringan sekretori yang teramati berupa sel sekretori (Gambar 15, 16, 17, B, ss). Ovulum steril melinjo positif mengandung tanin (Gambar 15, 16, 17, B). Hasil tersebut ditunjukkan dengan adanya pulasan berwarna hitam kebiruan pada

penampang lintang ovulum steril melinjo setelah ditetesi dengan larutan 10 % FeCl_3 dan didiamkan sekitar 15 menit (Gambar 15, 16, 17, B). Terbentuknya pulasan warna hitam kebiruan karena tanin akan bereaksi dengan ion Fe^{3+} membentuk senyawa kompleks trisianoferitrikalium (III). Suatu sample yang mengandung tanin ketika diuji dengan FeCl_3 akan terbentuk pulasan warna hijau, biru tua atau hitam (Sa'adah 2010; Sari dkk., 2015). Pembentukan senyawa kompleks antara tanin dengan FeCl_3 , hal tersebut karena adanya ion Fe^{3+} sebagai atom pusat dan tanin memiliki atom O yang memiliki pasangan elektron bebas yang bisa mengkoordinasikan ke atom pusat sebagai ligannya (Sa'adah, 2010; Ergina dkk., 2014).

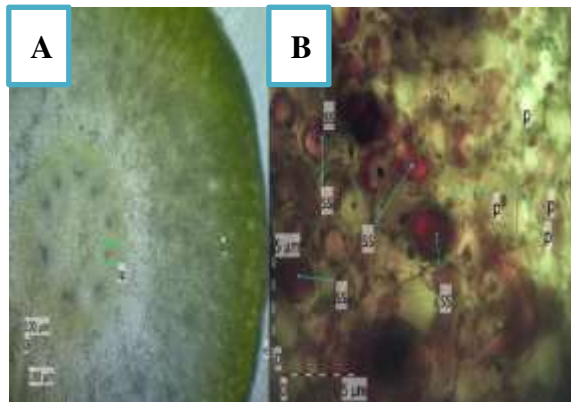


Gambar 18. Reaksi antara Tanin dan FeCl_3 (Sa'adah, 2010; Ergina dkk., 2014).

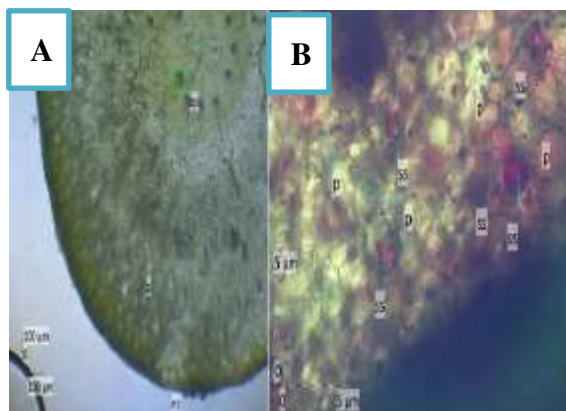
Adanya pulasan warna hitam pada ovulum steril melinjo setelah ditetesi larutan 10% FeCl_3 , hal tersebut menunjukkan bahwa ovulum steril melinjo mengandung senyawa tanin. Tanin merupakan salah satu jenis senyawa metabolit sekunder yang sebagian besar ditemukan di tumbuhan dan memiliki fungsi melindungi tumbuhan dari predator serta memiliki peranan dalam mengatur pertumbuhan tumbuhan (Das *et al.*, 2020). Pada tumbuhan, tanin ditemukan pada batang, daun, buah, biji, tunas, dan akar (Das *et al.*, 2020). Tanin berfungsi sebagai agen pertahanan, melindungi tumbuhan dari sinar UV, fungi, patogen, insekta, dan herbivora (Das *et al.*, 2020).



Gambar 19. Uji histokimia senyawa alkaloid pada ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian ujung strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.



Gambar 20. Uji histokimia senyawa alkaloid pada ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian tengah strobilus betina perbesaran 40x; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

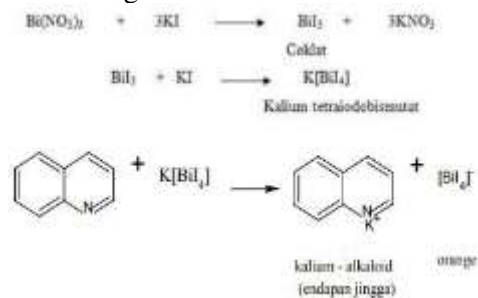


Gambar 21. Uji histokimia senyawa alkaloid pada ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina. A, kontrol ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina; B, hasil ovulum steril melinjo bagian pangkal strobilus betina

perbesaran 40x betina; bp: berkas pengangkut, ep: epidermis, p: parenkim, ss: sel sekretori.

Hasil positif tersebut ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi jingga-coklat, setelah direaksikan dengan larutan Dragendorff (Gambar 19, 20, 21, B). Gambar 19, 20, 21, A, menunjukkan penampang lintang ovulum steril melinjo kontrol. Pada kontrol tidak menunjukkan reaksi positif mengandung senyawa alkaloid. Hal tersebut dikarenakan pada kontrol hanya ditetesi akuades sehingga tidak terjadi proses reaksi.

Penelitian yang dilakukan oleh Ummah (2022) pada biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada bagian epidermis dan parenkim menunjukkan hasil positif senyawa alkaloid, dengan jenis jaringan sekretorinya berupa sel sekretori. Pada penelitian yang dilakukan pada ovulum steril melinjo juga menunjukkan hasil positif mengandung alkaloid dan jenis jaringan sekretori internal yang teramati berupa sel sekretori (Gambar 19, 20, 21, B, ss). Hasil tersebut ditunjukkan dengan adanya pulasan berwarna jingga-kecoklatan pada penampang lintang ovulum steril melinjo setelah ditetesi dengan larutan Dragendorff dan dibiarkan sekitar 15 menit (Gambar 19, 20, 21, B, ss). Pulasan warna jingga kecoklatan tersebut berupa kalium alkaloid. Pada uji alkaloid dengan larutan Dragendorff, nantinya nitrogen pada senyawa alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ .



Gambar 22. Reaksi antara senyawa alkaloid dengan larutan Dragendorff (Ergina dkk., 2014).

Adanya pulasan warna jingga kecoklatan pada ovulum steril melinjo setelah ditetesi larutan Dragendorff, hasil tersebut menunjukkan bahwa ovulum steril melinjo mengandung senyawa alkaloid (Gambar 19, 20, 21, B). Alkaloid merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang mengandung cincin nitrogen dan sebagian besar prekursor alkaloid berupa asam

amino (Heinrich *et al.*, 2021). Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai bagian tumbuhan seperti akar, kulit batang, ranting daun, bunga dan biji (Ningrum dkk., 2016). Alkaloid memiliki beberapa fungsi bagi tumbuhan, antara lain melindungi tumbuhan dari herbivora/predator dan mengatur pertumbuhan (Heinrich *et al.*, 2021). Alkaloid juga berperan sebagai senyawa pertahanan tumbuhan terhadap suatu penyakit. Alkaloid juga telah dimanfaatkan manusia dalam bidang kesehatan, antara lain sebagai anestesi, agen *cardioprotective*, dan agen anti inflamasi (Heinrich *et al.*, 2021).

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pada umur ovulum steril yang berbeda terdapat perbedaan struktural pada jaringan penyusunnya, semakin dewasa umur ovulum steril maka jaringan penyusunnya semakin terdegradasi dan ovulum steril melinjo (*Gnetum gnemon* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa fenol, flavonoid, terpenoid, tanin, dan alkaloid.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada Laboratorium Struktur Perkembangan Tumbuhan yang telah memfasilitasi terlaksananya penelitian ini.

Referensi

- Adhityasmara, D., Yustisia Dian, dan Beki Nugraheni. 2020. Aktivitas antihiperurisemia mikroenkapsulasi ekstrak kulit melinjo (*Gnetum gnemon* L.) secara in vivo. *Parapemikir*, 9(1): 1-6.
- Aliudin dan Dian, A. 2012. Nilai tambah emping melinjo melalui teknologi produksi konvensional di Desa Menes Kecamatan Menes Kabupaten Pandeglang. *AGRIKA*, 6(1): 23-33.
- Andriya, N. 2016. *Analisis struktur anatomi dan histokimia tiga varietas Kumis Kucing (Orthosiphon aristatus (Blume) Miq.)*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Annissa, S., Ida M., dan Lina I. 2020. Perbandingan metode analisis instrumen HPLC dan UHPLC: *Article Review. Farmaka*, 17(3): 189-197.
- Badria, F. A., and Aboelmaaty. 2020. Chemical, biochemical, genetics, and physiological

role of secondary metabolites of medical plants via utilization of plant histochemical techniques. *Asian Journal of Phytomedicine and Clinical Research*, 8(1): 12-28.

- Barua, C., Haloi P., and Barua, I. C. 2015. *Gnetum gnemon* Linn.: A comprehensive review on its biological, pharmacological, and pharmacognostical potentials. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(3): 531-539.
- Benkova E., Michniewichz M., Sauer M., Tiechmann T., Seifertova D., Jurgens G., Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115: 591-602.
- Bhat, R., dan Yahya, B., N. 2014. Evaluating melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed flour quality as a base for development of novel food products and food formulations. *Food Chemistry*, 156: 42-49.
- Conn HJ. 1989. *Biological stains: a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Das, A. K., Md. Nazrul, Md. Omar Faruk, Md. Ashaduzzaman, Rudi Dungani. 2020. Review on tannins: extraction processes, applications and possibilities. *South Africa Journal of Botany*, 135: 58-70.
- Davies, J.P. 1995. *Plant Hormones: Their nature, occurrence, and function*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Desandi Y, Andi. 2014. *Ekstraksi dan Uji Filokimia (Sonneratia alba)*. Laporan Penelitian. Bandung : Universitas Padjadjaran. Hal :5.
- Dewi, C., Rohula Utami, dan Nur Her. 2012. Aktivitas antioksidan dan antimikroba ekstrak melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 5(2): 74-81.
- Dickinson, W.C. 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Tokyo: Academic Press.
- Dubey, W. and Trivedi, P. 2012. Histochemical localization of lipids, secondary metabolites and lignin in healthy and Meloidogyne incognita, infected okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Ind. J. Plant Sci*, 1: 91-100.
- Ergina, Siti Nuryanti, dan Indarini. 2014. Uji kualitatif senyawa metabolit sekunder pada

- daun palado (*Agave angustifolia*) yang diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. *J. Akad. Kim*, 3(3): 165-172.
- GBIF. 2021. *Gnetum gnemon* L., GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-06-17.
- Gahan PB. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction*. Orlando: Academic Pres.
- Gemedé, H.F., & R. Negussie. 2014. Antinutritional Factors In Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 3(4): 284-89.
- Gersbach, P., S.G. Wyllie, and V. Sarafis. 2001. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany*, 88: 521-525.
- Gomez, M.D., Daniel V., Raquel S., Miguel A. 2016. Gibberellins regulate ovule integument development by interfering with the transcription factor ATS. *Plant Physiology*, 172: 2403-2415.
- Gunarso, W. 1989. Mikroteknik. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor.
- Hamim, Zahrul Romadlon, dan Dorly. 2019. Perkembangan morfo-anatomi bunga, buah, dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) sebagai tanaman penghasil biodisel. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 5(1):1-10.
- Haycraft, C., and Jeffrey S. 2001. Development of sterile ovules on bisexual cones of *Gnetum gnemon* (Gnetaceae). *American Journal of Botany*, 88(7): 1326- 1330.
- Heinrich, M., Jeffrey M., and Vafa. 2021. Alkaloids used as medicines: structural phytochemistry meets biodiversity-an update and forward look. *Molecules*, 1836 (26): 1-18.
- Heras, B., Rodriguez, L. Bosca, A. M. Villar. 2003. Terpenoids: sources, structure elucidation, and therapeutic potential in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(1): 53-56.
- Hijazi, M., Maha A., Kamal B., Maamoun Fatfat, Hala Gali, Abdalla E. 2018. Alkaloids of *Papaver libanoticum* and their cytotoxic activity. *Records of Natural Products*, 12(6): 611-618.
- Huo, C., Nan D., and Yingjuan Su. 2019. PacBio long-read sequencing reveals the transcriptomic complexity and Aux/IAA gene evolution in *Gnetum* (Gnetales). *Forests*, 10: 1-22.
- Ickert and Susanne. 2016. The Gnetales: Recent insight on their morphology, reproductive biology, chromosome numbers, biogeography, and divergence times. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(1): 1-16.
- Ikuta, Shinichiro Saito, Hiroko Tani, Tomoki Tatefuji, Ken Hashimoto. 2015. Resveratrol derivative-rich melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract improves obesity and survival of C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(12): 2044-2049.
- iNaturalist . 2022. iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2022-06-17. <https://www.gbif.org/occurrence/3090966569>.
- iNaturalist contributors, iNaturalist (2022). iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2022-11-20. <https://www.gbif.org/occurrence/3698409319>.
- Kavitha, V.U., and Balasubramanian K. 2020. Tannins for wastewater treatment. *SN Applied Sciences*, 1081(2): 1-21.
- Kiernan JA. 1999. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. Oxford & Boston: Butterworth-Heinemann.
- Kelen, M., Ebru C., Songul S., Guleren O. 2004. Separation of abscisic acid, indole-3- acetic acid, gibberelic acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and rose oil (*Rosa damascena* Mill.) by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Turk J. Chem*, 28: 603-610.
- Kunarto, Sutardi, Supriyanto, Chairil Anwar. 2019. Optimasi ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik pada biji melinjo kerikil (*Gnetum gnemon* L.) menggunakan response surface methodology. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 8(3): 1-7.

- Kuntorini, E., Dewi N., dan Eny Dwi. 2020. Anatomical structure and terpenoid content of Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff) leaves. *BIO Web of Conferences*, 20: 1-5.
- Kurniawati, B., dan Hamim. 2009. Physiological responses and fruit retention of carambola fruit (*Averrhoa carambola* L.) induced by 2,4-D and GA3. *Hayati J Biosci*, 16: 9-16.
- Kusnadi, K., dan Egie T. 2017. Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L.) dengan metode refluks. *Pancasakti Science Education Journal*, 2(1): 56-67.
- Kuusk, S., Sohlberg J.J., Fridborg I., Long J., Sundberg E. 2002. STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development*, 129: 4707-4717.
- Lestari, S., dan Muharfi. 2015. Karakterisasi fisikokimia kerupuk melinjo sebagai upaya diversifikasi produk olahan melinjo. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*, 1: 131-135.
- Linggawati, A., Maryani, Andika P., Diah Rachmawati. 2022. Anatomical and histochemical responses of vetiver grass (*Chrysopogen zizanioides* L. Roberty) to phytoremediation ability of liquid batik waste. *Environment and Natural Resources Journal*, 20(4): 359-368.
- Masyita, A., R.M. Sari., A.D. Astuti., B. Yasir., N.R. Rumata., T.B. Emran., F. Nainu., & J. Simal-Gandara. 2022. Terpenes and Terpenoids as Main Bioactive Compounds of Essential Oils, Their Roles in Human Health and Potential Application as Natural Food Preservatives. *Food Chemistry*, 10(3): 1-14.
- Mu'azu, N., Nabeel J., Mukarram Zubair, Omar Alagha. 2017. Removal of phenolic compounds from water using sewage sludge-based activated carbon adsorption: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1094(14): 1-33.
- Ningrum, R., E. Purwanti, & Sukarsono. 2016. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Batang Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) Sebagai Bahan Ajar Biologi Untuk SMA Kelas X. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*, 2(3): 231-236
- Nishiumi, S., Shingo M., Kyuichi K., Kohta O. 2011. Dietary flavonoids as cancer preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in bioscience*, 4(3): 1-19.
- Noor, A., Ristiana E., dan Akhmad Rafi'i. 2015. Pendeteksian karbohidrat (mukus) pada jaringan lunak karang masif (*Porites* sp.) di perairan Kota Bontang Provinsi Kalimantan Timur. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*, 20(2): 90-98.
- Nugroho, L.H., Purnomo, dan Issirep Sumardi. 2012. *Struktur dan Perkembangan Tumbuhan*. Jakarta: Penebar Swadaya. pp:134.
- Nugroho, L.H. 2017. *Struktur dan Produk Jaringan Sekretori Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Nurmila, H. Sinay, dan Theoilus W. 2019. Identifikasi dan analisis kadar flavonoid ekstrak getah angkana (*Pterocarpus indicus* Willd) di Dusun Wanath Kecamatan Leihitu Kabupaten Maluku Tengah. *Biopendix*, 5(2): 65-71.
- Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 47(5): 1-15.
- Pradani, H.R. 2020. Peran ethylene dalam pertumbuhan dan pengembangan tanaman. *Anterior Jurnal*, 19(2): 123-129.
- Rahayu, T., R.IA. Pratiwi., & N.J. Mubarakati. 2021. Profil Metabolit Daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) Berdasarkan Analisis Histokimia dan *In Silico*. *Jurnal Metamorfosa*, 8(1): 156-165.
- Rawlinson, C., Lars G., Joel P., Karam B., Robert D. 2015. A rapid method for profiling of volatile and semi-volatile phytohormones using methyl chloroformate derivatisation and GC-MS. *Metabolomics*, 11: 1922-1933.
- Rismawati, Eva M., dan Daniel. 2018. Uji fitokimia ekstrak metanol daun *Macaranga hullettii* King ex Hook. f. 2018. *Jurnal Atomik*, 3(2):91-94.
- Rosydiati, dan Ela K. 2019. Karakterisasi puncak kromatogram dalam *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) terhadap perbedaan fase gerak, laju air, dan penambahan asam dalam analisis indole acetic acid (IAA). *KANDAGA*, 1(2): 65-73.
- Sa'adah, L., 2010. *Isolasi dan identifikasi senyawa tanin dari daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.)*. Naskah Skripsi.

- Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Samanta, A., Gouranga D., and Sanjoy K. 2011. Roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech*, 6(1): 12-35.
- Sari, P., Wiwik Susanah, dan Ni Made Puspawati. 2015. Identifikasi dan uji aktivitas senyawa tanin dari ekstrak daun trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr) sebagai antibakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). *JURNAL KIMIA*, 9(1): 27-34.
- Sass J.E. 1958. *Botanical microtechnique*. Iowa: Iowa State Coll Pr.
- Seo, M., Yusuke J., and Yuji Kamijaya. 2011. Profiling of Hormone and related metabolites in seed dormancy and germination studies. *Methods in Molecular Biology*, 773: 99-110.
- Shindo, S., Keiko S., Ryosuke S., Kunihiro U., Mitsuyasu H. 2001. Characterization of a *Floricaula/ Leafy* homologue of *Gnetum parvifolium* and its implications for the evolution of reproductive organs in seed plants. *Int. J. Plant Sci*, 162(6): 1199-1209.
- Singla, R., Ashok K., Arun G., Ramesh K., Marco F., Sara M., Moawiya A., Masnat Al. 2019. Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5): 1397-1400.
- Sundbergh, E., and Lars O. 2009. Distinct and dynamics auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1:1-14.
- Suryani, E., dan Zulkarnain. 2021. Inventarisasi dan karakterisasi melinjo (*Gnetum gnemon*) di Kota Solok. *MENARA Ilmu*, 15(2): 29-36.
- Swain, S.M., Reid, J.B., Kamiya, Y. 1997. Gibberellins are required for embryo growth and seed development in pea. *Plant J*, 12: 1329-1338.
- Takaso, T., and Bouman, F. 1986. Ovule and seed ontogeny in *Gnetum gnemon* L. *The Botanical Magazine Tokyo*, 99(3): 241-266.
- Tatefuji T., Yanagihara M., Fukushima S., Hashimoto K. 2014. Safety assessment of mlinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract: Acute and sub chronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 67:230-235.
- Tetuko, K.A., Sarjana P., dan Munifatul I. 2015. Pengaruh kombinasi hormon giberelin dan auksin terhadap perkecambahan biji dan pertumbuhan tanaman Karet (*Havea brasiliensis* Mull. Arg). *Jurnal Biologi*, 4(1): 61-72.
- Thoday, M.G. 1921. Anatomy of the ovule and seed in *Gnetum gnemon*, with notes on *Gnetum furniculare*. *Annals of Botany*, 35(137): 37-53.
- Ullah, A., Sidra M., Syed L., Noreen K., Lubna G., Benjamin G., Abdul H., Mariusz J. 2020. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 5243 (25): 1-39.
- Ummah, K. 2022. *Distribusi anatomi metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan biji melinjo (Gnetum gnemon L.) pada tiga tingkat kematangan*. Naskah Skripsi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Fakultas Biologi.
- Verpoorte, R. 2000. *Secondary Metabolism*. In Verpoorte, R., & A.W. Alfermann (ed) *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, p: 1-19.
- Wang, H., Halqi Zhang, Fangfang Liang, Liu Cong, Linyan Song, Xieyu Li, Rui Zhai, Chengquan Yang, Zhigang Wang, Fengwang Ma, Lingfei Xu. 2021. PbEIL1 acts upstream of PbCysp1 to regulate ovule senescence in seedless pear. *Horticulture Research*, 59(8):1-12.
- Wattimena, G.A. 1992. *Bioteknologi tanaman*. Bogor: PAU Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Wilkins, M. 1989. *The physiology of plant growth and development*. Ed 2. New York: McGraw Hill. p: 55-77.
- Widodo dan Kalili. 2018. Evaluasi mutu biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menggunakan pengolahan citra digital. *Jurnal Teknik Pertanian Lampung*, 7(2):106-114.
- Wink, M. 2008. *Modern Alkaloids, Structure, Isolation Synthesis and Biology*. Jerman: Wiley, p: 1-24.
- Yaday, V., Namira A., Vijay Pratap, Gea G., Roberto Berni, Suhas Shinde, Gaurav Raturi, Rupesh Deshmukh, Luis M., Devendra Kumar, Durgesh Kumar. 2021. Histochemical techniques in plant science: more than meets the eye. *Plant Cell Physiol*, 62(10): 1509-1527.

- Yang, W., Xu Chen, Yanli Li, Shaofen Guo, Zhen Wang, Xiuling Yu. 2020. Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communication*, 15(3): 1-13.
- Yusupovna, C. Z. 2020. The development of the subject anatomy. *Proceedings of Online International Conference on Advances in Scientific Research and Developments*: 53-55.
- Zhang, Y., Ping Cai, Guanghai Cheng, and Yongqiang Zhang. 2022. A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. *Natural Product Communication*, 17(1): 1-14.