

Karakter Anatomi Daun dari Kultur Tunas *Artemisia annua* L.

Leaf Anatomical Characters from Shoot Culture of Artemisia annua L.

Juliarni^{1*}, Hamami Alfasani Dewanto¹, dan Tri Muji Ermayanti²

Diterima 5 Juli 2007/Disetujui 29 Oktober 2007

ABSTRACT

Artemisia annua L. produce artemisinin, an endoperoxide sesquiterpene lactone, which is effective against resistant strains of *Plasmodium falciparum*, the malarial parasite. Artemisinin in foliar tissue are localized entirely in subcuticular space of capitate glandular trichomes. This research was performed to investigate the anatomical structures especially glandular trichomes which associated with artemisinin production in leaves of five different shoot culture clones (A, B, C, D, and E clones). Observation of anatomical characters of leaves was done by making cross-section, while observation of trichomes was performed using Scanning Electron Microscopy. The leaves of five clones showed bifacial anatomical structure. The leaf thickness of E clone was the highest (96.8 μm), while those of four other clones were relatively the same ranging from 62.8 μm to 66.6 μm . Glandular trichomes were distributed throughout the lamina of leaves with the highest distribution in adaxial parts of the leaves. The size of uppermost secretory cells of glandular trichomes was relatively the same in five clones observed. There were variations in density of glandular trichomes in five clones observed. A and B clones had higher density of glandular trichomes i.e. 56.9 and 60.5/mm², while three other clones had density which range from 43.0 to 49.7/mm². It was suggested that A and B clones were the potential clones in producing artemisinin in vitro due to their larger leaf size and higher density of glandular trichomes.

Keywords : *Artemisia annua*, shoot culture, anatomical structure of leaf

PENDAHULUAN

Artemisia annua L. merupakan tanaman obat dari famili Asteraceae yang sudah lama digunakan di Cina sebagai obat antimalaria (Klayman, 1985). Tanaman ini mengandung senyawa terpenoid kompleks, antara lain senyawa seskuiterpen lakton yang dikenal dengan artemisinin (Marco dan Barbara, 1990). Artemisinin adalah senyawa yang efektif untuk jenis-jenis malaria yang resisten terhadap kuinin dan klorokuin serta malaria serebral yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* (Paniego dan Giuletti, 1994). Turunan dari artemisinin juga dapat berfungsi sebagai pestisida (Duke, 1991). Menurut van Geldre *et al.* (1997) artemisinin yang dihasilkan oleh *A. annua* disintesis di akar dan diakumulasikan di daun dan bagian tanaman lainnya. Kandungan artemisinin daun mencapai 89% dari kandungan total yang terdapat pada tanaman. Daun *A. annua* tertutup oleh trikoma kelenjar dan trikoma non-kelenjar (Duke dan Paul, 1993), pada ruang subkutikular trikoma kelenjar tersebut artemisinin diakumulasikan (Duke *et al.*, 1994).

Produksi artemisinin dari *A. annua* dipengaruhi oleh iklim, kondisi tanah, umur tanaman (Klayman, 1985) dan variasi genetik (Paniego dan Giuletti, 1994). Untuk keperluan ekstraksi, 1 ton daun *A. annua* kering dapat menghasilkan 5-6 kg artemisinin, keperluan ini dapat dipenuhi dengan menanam lebih dari 40 ha lahan pertanian (Hien dan White, 1993). Teknik kultur jaringan khususnya kultur tunas adalah salah satu alternatif untuk penyediaan bibit *A. annua* dengan kualitas dan kuantitas yang dapat dijaga.

Penelitian kultur tunas yang telah dilakukan oleh Ermayanti *et al.* (2005) menghasilkan 5 klon tunas yang berbeda berdasarkan ciri morfologi dan tata letak daun. Sejauh ini diketahui terdapat perbedaan kandungan artemisinin pada kelima klon tunas tersebut (klon A 0.069%, B 0.171%, C 0.028%, D 0.006%, dan E 0.008% bobot kering). Menurut Duke *et al.* (1994) pada biotipe *A. annua* yang tidak terdapat trikoma kelenjar tidak ditemukan artemisinin ataupun artemisiten. Karakter anatomi yang berhubungan dengan kandungan artemisinin, khususnya ada atau tidaknya trikoma kelenjar pada kelima tipe klon tersebut belum pernah diteliti.

¹ Departemen Biologi, FMIPA, IPB E-mail : juliarni wibowo@yahoo.co.id

(*Penulis untuk korespondensi)

² Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong Bogor

Penelitian ini bertujuan mempelajari karakter anatomi daun khususnya tipe, ukuran, dan kerapatan trikoma kelenjar. Dengan mengenali ciri-ciri anatomi daun hasil kultur tunas, informasi dasar mengenai hubungan antara karakter anatomi dengan kandungan artemisinin dapat diketahui sehingga produksi artemisinin secara *in vitro* dapat ditingkatkan. Data struktur anatomi daun ini dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan daun dengan kandungan artemisinin yang tinggi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan mulai Maret sampai Desember 2004 bertempat di laboratorium Anatomi dan

Morfologi Tumbuhan, FMIPA, IPB dan Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong.

Produksi daun dari lima tipe klon tunas. Lima tipe klon tunas *A. annua* (Tabel 1) dari stok kultur yang ditanam pada media MS (Murashige dan Skoog, 1962) tanpa zat pengatur tumbuh, dipindahkan ke media MS baru untuk perbanyak. Tunas pucuk sepanjang 2-2.5 cm dipisahkan dari tunas induknya, kemudian ditanam pada media MS padat. Kultur diinkubasi di dalam ruang kultur yang mempunyai suhu ruang antara 26-27°C dengan penyinaran lampu TL (*Tungsten Lamp*) secara kontinyu. Setelah berumur 5 minggu, daun kelima (dihitung dari tunas terminal) yang tumbuh dari kultur tunas siap digunakan untuk pengamatan ciri anatomi.

Tabel 1. Ciri morfologi lima klon tunas *A. annua*

Klon	Ciri morfologi
A	Daun tersusun roset, helai daun berbagi menyirip (<i>pinnatipartitus</i>), daun berukuran paling besar (rata-rata luas daun = 30.2 mm ²), warna daun hijau tua, petiol paling panjang (rata-rata panjang petiol = 10 mm), dan ditemukan daun penumpu.
B	Daun tersusun selang-seling, helai daun berbagi menyirip (<i>pinnatipartitus</i>) daun berukuran besar (rata-rata luas daun = 19.9 mm ²), warna daun hijau tua, petiol panjang (rata-rata panjang petiol = 5 mm), memiliki ruas pendek.
C	Daun tersusun selang-seling, helai daun bercangap menyirip (<i>pinnatifidus</i>), helai daun meruncing dan berukuran kecil (rata-rata luas daun = 6.2 mm ²), warna daun hijau kekuningan, petiol pendek (rata-rata panjang petiol = 3 mm), membentuk percabangan lateral yang banyak.
D	Daun tersusun selang-seling, helai daun bercangap menyirip (<i>pinnatifidus</i>), daun berukuran sedang (rata-rata luas daun = 10.7 mm ²), warna daun hijau, petiol pendek (rata-rata panjang petiol = 3 mm), memiliki ruas batang terpanjang,
E	Daun tersusun selang-seling, helai daun bercangap menyirip (<i>pinnatifidus</i>), daun berukuran paling kecil (rata-rata luas daun = 5.4 mm ²), warna daun hijau kekuningan, petiol sangat pendek (rata-rata panjang petiol = 2 mm), memiliki ruas batang pendek.

Pengamatan struktur anatomi daun hasil kultur tunas. Struktur anatomi daun yang diteliti meliputi struktur anatomi sayatan paradermal dan transversal daun. Pengamatan paradermal daun dilakukan dengan bantuan mikroskop elektron payaran (*Scanning Electron Microscope/SEM* tipe JSM 5200). Tahapan persiapan sampel daun adalah sebagai berikut: daun utuh diprafiksasi didalam larutan glutaraldehid 2.5% selama 12 jam pada suhu 4°C; kemudian dipascafiksasi didalam larutan *tannic acid* 2% selama 1 jam pada suhu 4°C; selanjutnya sampel daun dicuci dengan larutan bufer *cacodylate* sebanyak 4 kali, masing-masing tahapan pencucian berlangsung selama 15 menit pada suhu 4°C; setelah itu sampel daun dicuci dengan akuades selama 15 menit pada suhu 4°C. Proses dehidrasi dilakukan dengan seri larutan etanol 50%, 75%, 85%, 94% dan alkohol absolut. Sampel daun yang telah dehidrasi kemudian dikering-bekukan (*freeze drying*) didalam larutan t-butanol selama 3 jam, setelah sebelumnya direndam didalam larutan t-butanol selama 10 menit sebanyak dua kali. Spesimen selanjutnya direkatkan pada *stub* menggunakan perekat karbon, disepuh dengan emas (*metal coating*), kemudian

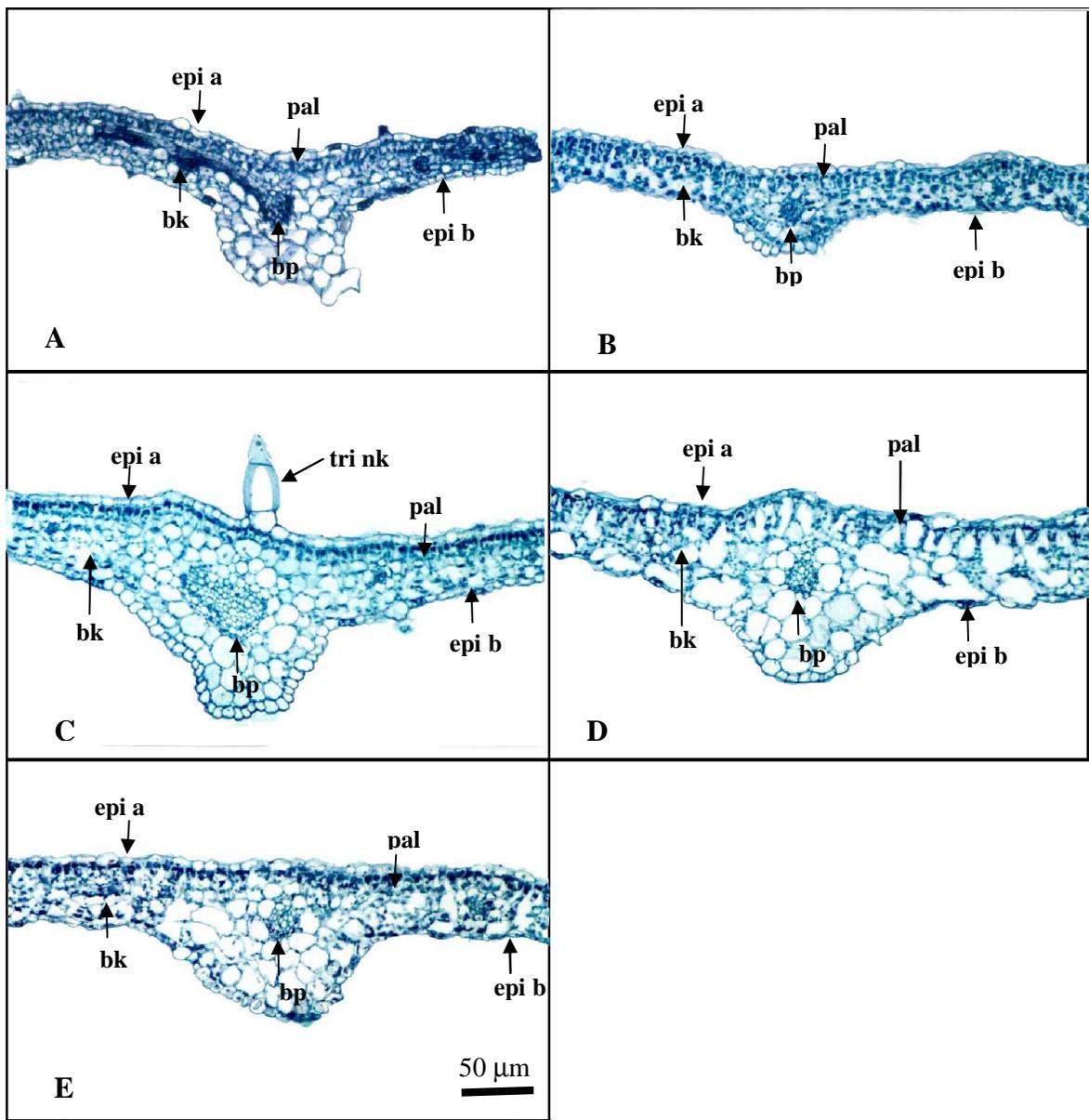
diamati dengan SEM. Irisan transversal daun dibuat menurut metode parafin dengan campuran larutan alkohol-1-butanol-akuades sebagai dehidran (Nakamura, 1995). Daun yang telah difiksasi selama 24 jam didalam larutan FAA (formaldehid 37%: asam asetat glasial: etanol 70% = 5 : 5 : 90) dimasukkan ke dalam seri larutan dehidrasi ke-3 sampai ke-7. Infiltrasi parafin ke dalam jaringan dilakukan secara bertahap, kemudian jaringan ditanam didalam parafin. Selanjutnya blok parafin diiris setebal 10 µm menggunakan mikrotom putar (Yamato RV-240). Pita parafin yang terbentuk diwarnai dengan pewarnaan rangkap dua safranin 2% di dalam air – fast green 0.5% di dalam alkohol 95%. Pita parafin yang telah diwarnai diletakkan di gelas obyek, ditetesi dengan *canada balsam*, dan ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya obyek diamati dengan mikroskop cahaya (Nikon SE) dan difoto dengan fotomikroskop (Nikon Obtiphot 2).

Karakter anatomi daun yang diamati pada irisan melintang (transversal) adalah tebal helaian daun, tebal jaringan palisade dan bunga karang, dan tebal epidermis atas dan bawah, sedangkan karakter anatomi yang diamati pada arah paradermal (arah membujur) daun

adalah tipe trikoma, ukuran sel teratas dari sel sekretori trikoma kelenjar dan kerapatan trikoma kelenjar. Analisis data yang digunakan adalah statistika deskriptif (Mattjik dan Sumertajaya, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. annua memiliki tipe daun bifasial yaitu daun yang memiliki jaringan palisade hanya pada salah satu sisi. Walaupun ukuran dan bentuk jaringan penyusun daun agak berbeda, secara umum daun dari kelima klon tunas *A. annua* tersusun atas jaringan yang sama yaitu terdiri atas lapisan epidermis atas dan bawah, jaringan mesofil yang terdiferensiasi menjadi jaringan palisade dan bunga karang (Gambar 1).

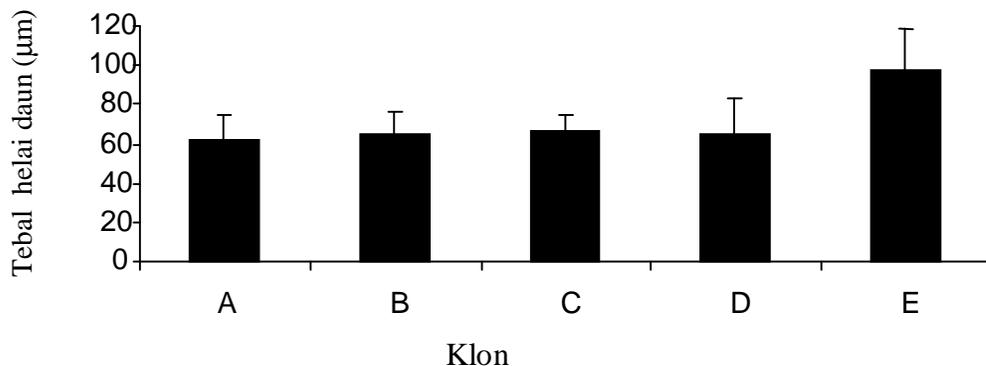


Gambar 1. Sayatan transversal daun kelima klon tunas *A. annua*.
 epi a : epidermis atas, epi b : epidermis bawah, pal : jaringan palisade, bk : jaringan bunga karang, bp: berkas pembuluh, tri nk : trikoma non-kelenjar.

Helai daun

Hasil penelitian menunjukkan bahwa klon E memiliki tebal helai daun paling besar yaitu 96.8 μm (Gambar 2). Hal ini disebabkan oleh jaringan palisade dan bunga karang yang dimiliki oleh klon E jauh lebih

tebal daripada jaringan palisade dan bunga karang empat klon lainnya . Tebal helai daun empat klon lainnya berturut-turut yaitu klon C 66.6 μm, klon B 65.4 μm, klon D 64.6 μm dan klon A 62.8 μm.

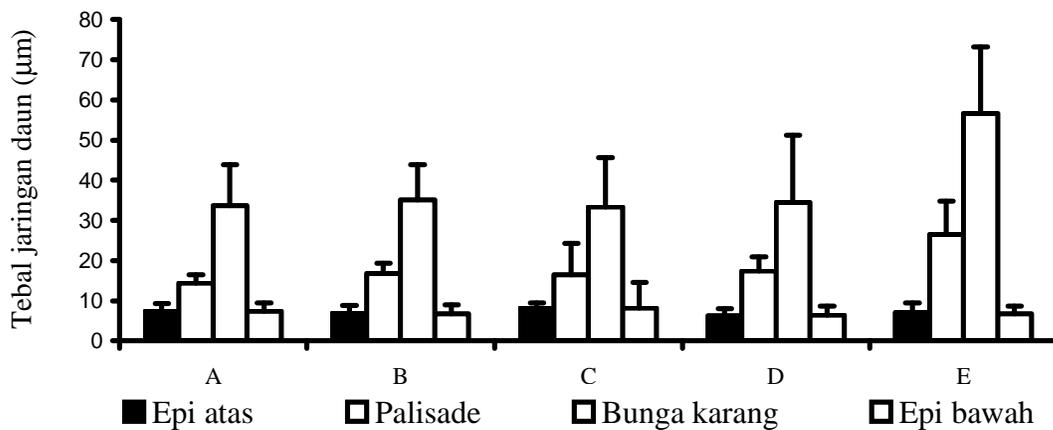


Gambar 2. Tebal helai daun kelima klon tunas *A. annua*.

Epidermis

Jaringan epidermis pada kelima klon tunas terdiri atas satu lapis sel (Gambar 1). Secara umum lapisan epidermis atas memiliki tebal relatif sama dengan epidermis bawah (Gambar 3). Tebal epidermis atas berkisar antara 6.3 – 8.1 μm, sedangkan epidermis bawah berkisar antara 6.4 – 8.1 μm . Lapisan epidermis

atas klon C memiliki tebal paling tinggi yaitu 8.1 μm, diikuti dengan klon A 7.3 μm, klon E 7.1 μm, klon B 6.9 μm dan klon D 6.3 μm. Tebal lapisan epidermis bawah klon C memiliki nilai tertinggi yaitu 8.1 μm , diikuti dengan klon A 7.3 μm, klon E dan B 6.7 μm dan klon D 6.4 μm.



Gambar 3. Tebal masing-masing jaringan daun lima klon tunas *A. annua*.

Jaringan Palisade

Jaringan palisade pada daun *A. annua* hanya terdapat pada salah satu sisi yaitu pada bagian atas atau adaksial daun (Gambar 1). Tebal jaringan palisade berkisar antara 14.4 – 26.5 μm (Gambar 3). Urutan tebal jaringan palisade dari yang terbesar ke yang

terkecil yaitu 26.5 μm (klon E), 17.4 μm (klon D), 16.7 μm (klon B), 16.5 μm (klon C) dan 14.4 μm (klon A). Sel-sel pada jaringan palisade umumnya berbentuk silindris, walaupun terlihat adanya sel - sel palisade yang agak membulat yang terdapat pada klon A.

Jaringan Bunga Karang

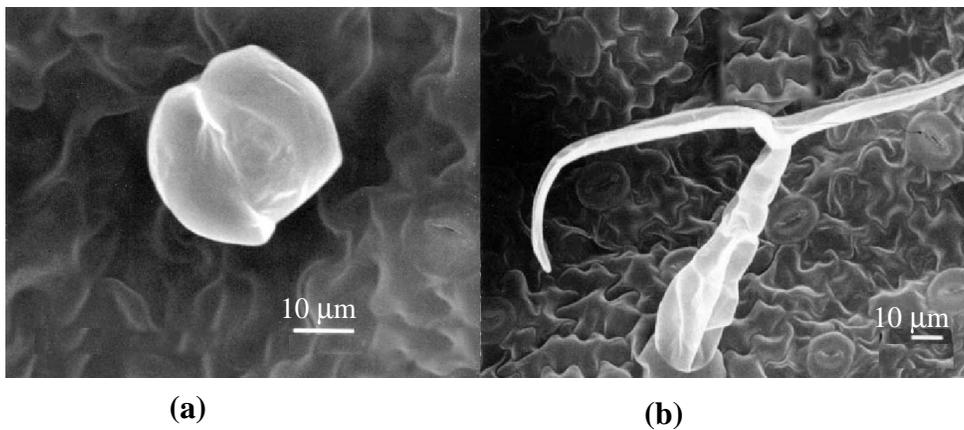
Tebal jaringan bunga karang tertinggi terdapat pada klon E sebesar 56.6 μm diikuti oleh klon B 35.1 μm , klon D 34.5 μm , klon A 33.7 μm dan klon C 33.3 μm . Sel-sel jaringan bunga karang pada klon A, B, C dan D tersusun rapat dengan ruang antarsel yang kecil, sedangkan pada klon E sel-sel jaringan bunga karangnya tersusun longgar sehingga menampakkan ruang antarsel yang lebih lebar (Gambar 1).

Trikoma

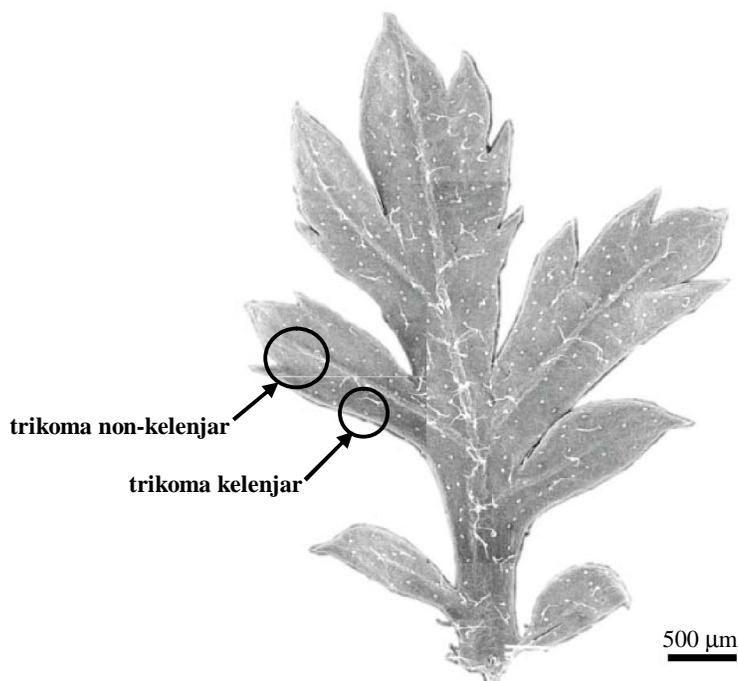
Trikoma merupakan penjurulan dari epidermis (Fahn, 1990). Terdapat dua macam trikoma pada daun tumbuhan yaitu trikoma kelenjar dan trikoma non-kelenjar. Masing-masing trikoma mempunyai fungsi

yang berbeda, trikoma non-kelenjar antara lain berfungsi sebagai penghalang masuknya patogen melalui stomata, sedangkan trikoma kelenjar berfungsi mengeluarkan metabolit sekunder (Fahn, 1979).

Daun *A. annua* memiliki dua macam trikoma yaitu trikoma kelenjar dan trikoma non-kelenjar (Gambar 4). Trikoma kelenjarnya terdiri atas sepuluh sel (multiseriat) meliputi dua sel basal, dua sel tangkai dan enam sel sekretori (Duke and Paul, 1993) yang tersebar merata pada helai daun (Gambar 5). Gambar 4a menunjukkan tampilan trikoma kelenjar dari atas. Trikoma non kelenjar juga merupakan trikoma multiseriat dengan kepala bercabang dua menyerupai huruf "T" (Gambar 4b) dan banyak ditemukan pada tulang daun daripada pada helai daun (Gambar 5).



Gambar 4. Trikoma kelenjar (a) dan non kelenjar (b) pada daun kelima *A. annua*.

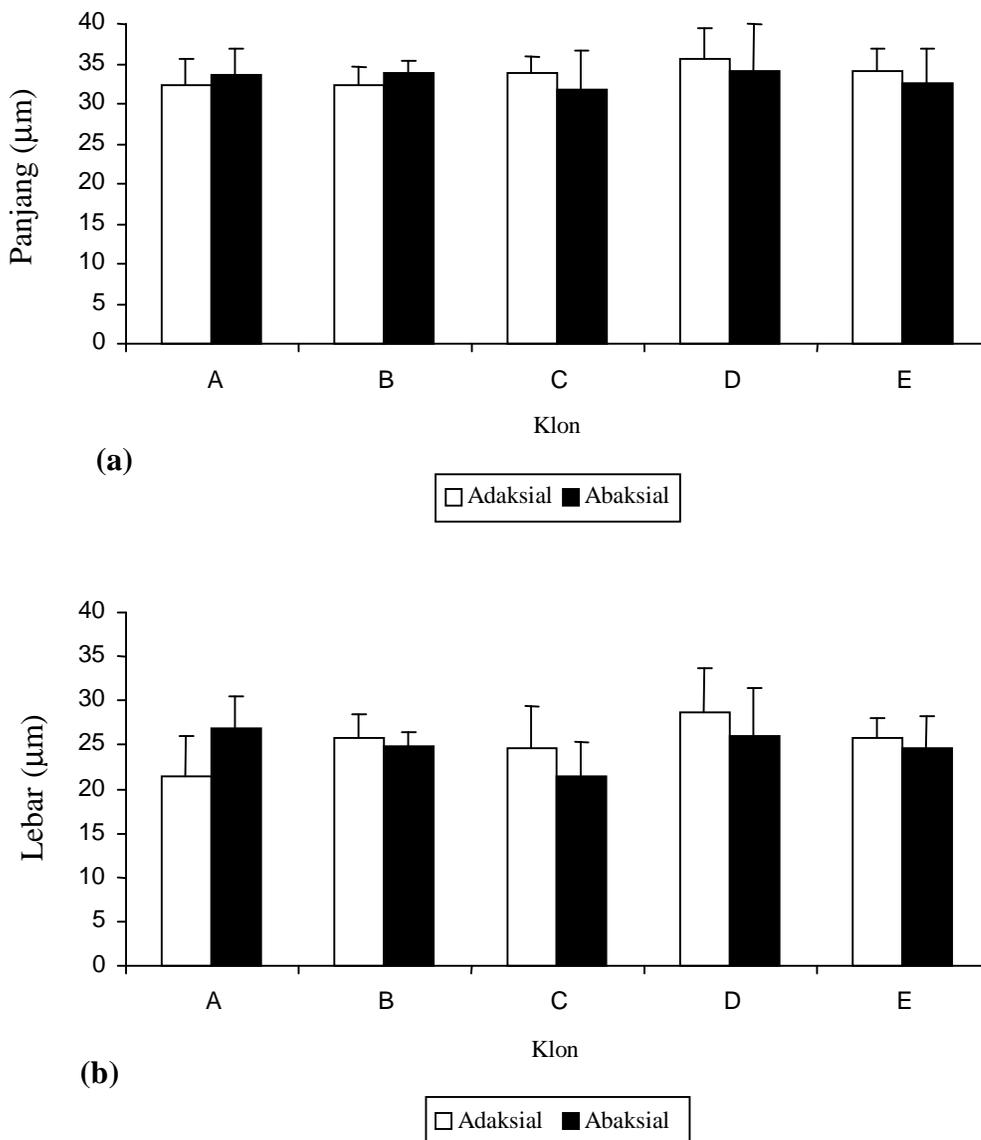


Gambar 5. Trikoma kelenjar dan non-kelenjar pada daun *A. annua*.

Menurut Duke *et al.* (1994) senyawa artemisinin diakumulasikan di ruang subkutikular trikoma kelenjar daun, selanjutnya menurut Ferreira dan Janick (1995) kutikula yang menutupi tiga pasang sel teratas dari sel sekretori (sel apikal) akan terpisah dari dinding sel selama perkembangan trikoma kelenjar dan akan membentuk suatu kantung yang terisi oleh artemisinin dan zat bioaktif lainnya. Setelah menggelembung maksimal, kantung tersebut pecah dan mengeluarkan isinya.

Ukuran sel teratas dari sel sekretori trikoma kelenjar pada daun kelima klon tunas yang diamati

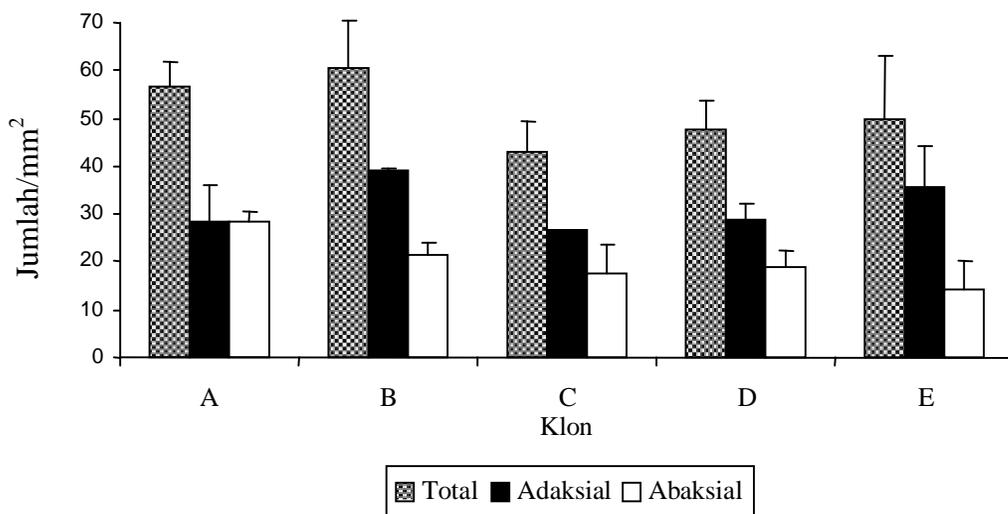
adalah sebagai berikut panjang sel sekretori memiliki nilai yang relatif seragam yaitu berkisar antara 32.4-35.7 μm untuk adaksial daun dan 31.8-34.0 μm untuk abaksial daun (Gambar 6a), sedangkan lebar sel sekretori memiliki nilai berkisar antara 21.5-28.7 μm untuk adaksial daun dan 21.5-26.8 μm untuk abaksial daun (Gambar 6b). Berdasarkan data ini diketahui bahwa perbedaan tipe klon tidak mempengaruhi ukuran panjang dan lebar sel teratas dari sel sekretori trikoma kelenjar.



Gambar 6. Panjang (a) dan lebar (b) sel teratas dari sel sekretori trikoma kelenjar pada lima klon tunas *A. annua*.

Kerapatan trikoma kelenjar pada bagian adaksial lebih tinggi dibandingkan dengan bagian abaksial daun (Gambar 7). Kerapatan trikoma kelenjar bagian adaksial berkisar antara 26.5-39.2 /mm². Klon B memiliki kerapatan paling tinggi yaitu 39.2 /mm², diikuti oleh klon E sebesar 35.5 /mm², klon D sebesar 28.6 /mm², klon A sebesar 28.5 /mm², dan klon C yaitu 26.5 /mm². Kerapatan trikoma kelenjar pada bagian abaksial

berkisar antara 14.2-28.4/mm² dengan urutan yaitu klon A 28.4 /mm², klon B 21.3 /mm², klon D 18.9 /mm², klon C 17.5 /mm² dan klon E 14.2 /mm² (Gambar 7). Kerapatan total trikoma kelenjar pada daun lima klon tunas berkisar antara 43.0-60.5 /mm². Nilai kerapatan total trikoma kelenjar dari yang terbesar ke yang terkecil yaitu klon B 60.5 /mm², klon A 56.9 /mm², klon E 49.7 /mm², klon D 47.5 /mm² dan klon C 43.0 /mm².



Gambar 7. Kerapatan trikoma kelenjar pada daun lima klon tunas *A. annua*.

KESIMPULAN

Daun kelima klon tunas *A. annua* merupakan daun bifasial yang tersusun dari jaringan epidermis atas, jaringan mesofil yang terdiferensiasi menjadi jaringan palisade dan bunga karang, serta jaringan epidermis bawah. Klon E memiliki tebal helai daun paling besar yaitu 96.8 µm, sedangkan empat klon lainnya memiliki tebal helai daun berkisar antara 62.8-66.6 µm. Tebal epidermis atas berkisar antara 6.3-8.1 µm dan tebal epidermis bawah berkisar antara 6.4-8.1 µm. Tebal jaringan palisade tertinggi terdapat pada klon E yaitu 26.5 µm, sedangkan pada empat klon lainnya nilainya berkisar antara 14.4-17.4 µm. Tebal jaringan bunga karang tertinggi terdapat pada klon E yaitu 56.6 µm, sedangkan pada empat klon lainnya nilainya berkisar antara 33.3-35.1 µm

Terdapat dua macam trikoma yaitu trikoma kelenjar dan non kelenjar. Klon A dan B memiliki kerapatan total trikoma kelenjar yang tinggi masing-masing sebesar 56.9 /mm² dan 60.5 /mm², sedangkan tiga klon lainnya memiliki nilai yang berkisar antara 43.0-49.7 /mm².

Klon A dan B berpotensi untuk dibudidayakan karena memiliki kerapatan trikoma kelenjar yang tinggi dan daun yang lebar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar, Dikti, Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini. Ungkapan terima kasih juga ditujukan kepada Erwin Al Hafiih dari Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong atas bantuannya dalam persiapan kultur tunas, Ibu Dra. Endang Purwaningsih dari Bagian Zoologi LIPI Cibinong atas bantuannya dalam preparasi sampel SEM dan Bapak Dr. Ir. Ronny Rachman Noor, MRur.Sc dari Fakultas Peternakan IPB atas bantuannya dalam pengamatan SEM.

DAFTAR PUSTAKA

Duke, S.O. 1991. Plant terpenoid as pesticides. *In* : Keeler, R.F., A.T. Tu (eds). Handbook of Natural

- Toxin, Toxicology of Plant and Fungal Compounds. Marcel Dekker, New York, p. 269-296.
- Duke, S.O., R.N. Paul. 1993. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. Int. J. Plant Sci. 154:107-118.
- Duke, M.V., R.N. Paul, H.N. Elsohly, G. Sturtz, S.O. Duke. 1994. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. Int. J. Plant Sci. 155: 365-372.
- Ermayanti, TM, E. Al Hafizh, Aryanti, L. Sutedja. 2005. Analisis kandungan artemisinin pada kultur tunas *Artemisia annua* L. dengan 5 karakter morfologi yang berbeda. Biota X : 154-160.
- Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press Inc. London.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. 4th Ed. Butterworth-Heinemann. London.
- Ferreira, J.F.S, J. Janick. 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. Int. J. Plant Sci. 156: 807-815.
- van Geldre E., A. Vergauwe, van den E. Eeckhout. 1997. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. Plants Mol. Biol. 33: 199-209.
- Hien, T.T., N.J. White. 1993. Tissue culture of *Artemisia annua* L – a potential source of an antimalarial drug (Qinghaosu). Lancet. 341: 603-608.
- Klayman, D.L. 1985. Qinghaosu (artemisinin) : an antimalarial drug from China. Science. 228:1049-1055.
- Marco, J.A., O. Barbera. 1990. Natural products from the genus *Artemisia*. In : Atta-ur-Rahman (ed). Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier. Amsterdam. p. 201- 264.
- Mattjik, A.A, I.M. Sumertajaya. 2002. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. IPB Press. Bogor.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 51: 473-479.
- Nakamura, T. 1995. Methods for cells and tissues observation. In : Hasiba, T, K. Hinata. A Manual Experiment for Plant Biology. Soft Science Publication. Tokyo. p. 15-21.
- Paniego, N.B, A.M Giuletti. 1994. *Artemisia annua* L. : dedifferentiated and differentiated cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36: 163-168.