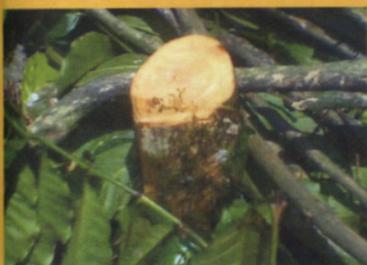




PROSIDING SEMINAR HASIL-HASIL PENELITIAN INSTITUT PERTANIAN BOGOR 2011



Mencari dan Memberi yang Terbaik

ISBN 978-602-8853-14-9



9 786028 8853149

Sekretariat

Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM - IPB)
Gedung Andi Hakim Nasoetion Lantai 3 Kampus IPB Dramaga Bogor 16680
Telp. +62251 8622093 +62251 8622709 Fax. +62251 8622323
Website : <http://lppm.ipb.ac.id>; Email : lppm@ipb.ac.id; ipb.lppm@yahoo.com

SUSUNAN TIM PENYUSUN

Pengarah : 1. Prof. Dr. Ir. Bambang Pramudya Noorachmat, M.Eng
(Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat IPB)
2. Prof. Dr. Ir. Ronny Rachman Noor, M.Rur.Sc
(Wakil Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Bidang Penelitian IPB)
3. Dr. Ir. Prastowo, M.Eng
(Wakil Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Bidang Pengabdian kepada Masyarakat IPB)

Ketua Editor : Dr. Ir. Prastowo, M.Eng

Anggota Editor : 1. Dr. Ir. Sulistiono, M.Sc
2. Prof. Dr. drh. Agik Suprayogi, M.Sc.Agr
3. Prof. Dr. Ir. Bambang Hero Saharjo, M.Agr

Tim Teknis : 1. Drs. Dedi Suryadi
2. Euis Sartika
3. Endang Sugandi
4. Lia Maulianawati
5. Muhamad Tholibin
6. Yanti Suciati

Desain Cover : Muhamad Tholibin

**Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian
Institut Pertanian Bogor 2011,
Bogor 12-13 Desember 2011**

**Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Institut Pertanian Bogor**

ISBN: 978-602-8853-14-9

Oktober 2012

KATA PENGANTAR

Salah satu tugas penting LPPM IPB adalah melaksanakan seminar hasil penelitian dan mendesiminasikan hasil penelitian tersebut secara berkala dan berkelanjutan. Pada tahun 2011, sekitar 225 judul kegiatan penelitian telah dilaksanakan. Penelitian tersebut dikoordinasikan oleh LPPM IPB dari beberapa sumber dana antara lain Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) IPB, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTi), Kementerian Pertanian (Kementan) dan Kementerian Negara Riset dan Teknologi (KNRT) dimana sebanyak 197 judul penelitian tersebut telah dipresentasikan dalam Seminar Hasil Penelitian IPB yang dilaksanakan pada tanggal 12–13 Desember 2011 di Institut Pertanian Bogor.

Hasil penelitian tersebut sebagian telah dipublikasikan pada jurnal dalam dan luar negeri, dan sebagian dipublikasikan pada prosiding dengan nama Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2011, yang terbagi menjadi 6 (enam) bidang yaitu:

- Bidang Pangan
- Bidang Energi
- Bidang Sumberdaya Alam dan Lingkungan
- Bidang Biologi dan Kesehatan
- Bidang Sosial dan Ekonomi
- Bidang Teknologi dan Rekayasa

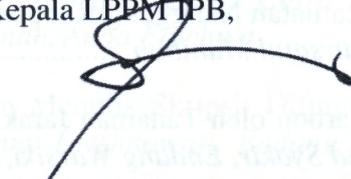
Melalui hasil penelitian yang telah dipublikasikan ini, maka runutan dan perkembangan penelitian IPB dapat diketahui, sehingga *road map* penelitian IPB dan lembaga mitra penelitian IPB dapat dipetakan dengan baik.

Kami ucapkan terima kasih pada Rektor dan Wakil Rektor IPB yang telah mendukung kegiatan Seminar Hasil-Hasil Penelitian ini, para Reviewer dan panitia yang dengan penuh dedikasi telah bekerja mulai dari persiapan sampai pelaksanaan kegiatan seminar hingga penerbitan prosiding ini terselesaikan dengan baik.

Semoga Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2011 ini dapat bermanfaat bagi semua. Atas perhatian dan kerjasama yang baik diucapkan terima kasih.

Bogor, September 2012

Kepala LPPM IPB,



Prof. Dr. Ir. Bambang Pramudya N., M.Eng
NIP 19500301 197603 1 001

DAFTAR ISI

SUSUNAN TIM PENYUSUN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv

BIDANG PANGAN

Halaman

Kelompok Usaha Bersama (KUB) Pengolah Ikan di Desa Cikahuripan Sukabumi - <i>Dadi Rochnadi Sukarsa, Uju Sadi, Pipih Suptijah</i>	1
Optimasi Reduksi Polisiklik Aromatik Hidrokarbon dalam Makanan Bakar Khas Indonesia dengan Memanfaatkan Bumbu Lokal serta Pengaturan Jarak dan Lama Pemanasan Menggunakan <i>Response Surface Methodology</i> - <i>Hanifah Nuryani Lioe, Yane Regiana, Rangga Bayuharda Pratama</i>	12
Pengaruh Pemberian Phytoestrogen pada Masa Kebuntingan dan Laktasi Terhadap Kinerja Reproduksi Anak - <i>Nastiti Kusumorini, Aryani Sismin S, A. Dinoto</i>	31
Study Peningkatan Kualitas Buah Manggis - <i>Roedhy Poerwanto, Yulinda Tanari, Susi Octaviani SD, Suci Primilestari, Darda Efendi, Ade Wachjar....</i>	46
Pengaruh Lingkungan (Sifat Fisik dan Kimia Tanah Serta Iklim) Terhadap Cemaran Getah Kuning Buah Manggis (<i>Garcinia Mangostana L.</i>) - <i>Roedhy Poerwanto, Martias, Syaiful Anwar, M. Jawal A. Syah</i>	61

BIDANG ENERGI

Rekayasa Bioproses Produksi Bioetanol dari Biomasa Lignoselulosa Tanaman Jagung: <i>Life Cycle Assessment (LCA)</i> dan Analisis Teknoekonomi - <i>Djumali Mangunwidjaja, Anas Miftah Fauzi, Sukardi, Wagiman</i>	77
---	----

BIDANG SUMBERDAYA ALAM DAN LINGKUNGAN

Penanaman Tanaman Penutup Tanah untuk Rehabilitasi Lahan Kritis di Sekitar Tambang Emas di Gunung Pongkor Melalui Kemitraan dengan Masyarakat di Kecamatan Nanggung Kabupaten Bogor - <i>Asdar Iswati, Enni Dwi Wahjunie, Khursatul Munibah</i>	91
Potensi Serapan Karbon oleh Tanaman Jarak Pagar di Indonesia - <i>Herdhata Agusta, Muhammad Syakir, Endang Warsiki, Fifin Nashirotn Nisya</i>	107

Pengembangan Fotobioreaktor Isacs untuk Kultivasi Mikroalga dengan Menggunakan Gas CO ₂ Murni dan Pemiskinan Nutrien - <i>Mujizat Kawaroe, Ayi Rachmat, Abdul Haris</i>	120
Perencanaan Kebun Wisata Pertanian Gunung Leutik Ciampea Bogor - <i>Nizar Nasrullah, Afra D.N. Makalew, Dewi Sukma, Tati Budiarti</i>	137
Pola RAPD, Aktivitas Trypsin Inhibitor dan A-Amylase Inhibitor pada Pohon Sengon (<i>Paraserianthes Falcataria</i>) yang Tahan Terhadap Serangan Hama Bektor (<i>Xystrocera Festiva</i>) - <i>Noor Farikhah Haneda, Ulfah Juniarti Siregar</i>	156
Pengembangan Jarak Pagar (<i>Jatropha Curcas</i> Linn.) dalam Sistem Agroforestry di Areal Perum Perhutani Unit III Jawa Barat dan Banten - <i>Nurheni Wijayanto, Lailan Syaufina, Istomo</i>	171
Identifikasi Trikoma Kelenjar untuk Produksi Artemisinin pada <i>Artemisia Annu</i> L.Menggunakan Pendekatan Molekular - <i>Utut Widyastuti, Juliarni, Yuli Widiastuti, Dania, Fajri</i>	185

BIDANG BIOLOGI DAN KESEHATAN

Efektivitas Fage Litik dari Lcrt Pada Pemecahan Sel Patogen Enterik <i>Salmonella sp.</i> Resisten Antibiotik - <i>Sri Budiarti, Iman Rusmana, Riri Novita Sunarti</i>	199
--	-----

BIDANG SOSIAL DAN EKONOMI

IbM Kelompok Tani Hutan Kopi, Desa Warga Jaya Kecamatan Sukamakmur, Kabupaten Bogor, Jawa Barat - <i>Ade Wachjar, Ani Kurniawati, Adiwirman</i>	211
Dampak Kebijakan dan Efektivitas HPP Gabah/Beras terhadap Kesejahteraan Petani Indonesia - <i>Ahyar Ismail, Eka Intan K.P., Novindra, Nuva</i>	225
Studi Indikator Kemiskinan pada Masyarakat dan Misklasifikasi Orang Miskin Menurut Kriteria BPS, Bank Dunia, dan Sajogyo - <i>Ali Khomsan, Arya Hadi Dharmawan, Saharrudin, Alfiasari</i>	241
Pengembangan Model <i>Millenium Eco-Village</i> : Optimalisasi Transaksi Pangan dan Energi Keluarga untuk Perbaikan Gizi - <i>Clara M. Kusharto, Ikeu Tanziha, Euis Sunarti, Siti Amanah, Anna Fatchiya</i>	255
Problematika Mahasiswa IPB dalam Menulis Skripsi: Ditinjau dari Sudut Pandang Kebahasaan - <i>Defina, Henny Krishnawati, Endang Sri Wahyuni, Krishandini, Mukhlas Ansori</i>	271

Internalisasi Biaya Eksternal dan Desain Sistem Pengelolaan Sampah Komunal (Studi Kasus Kawasan Hunian di Kota Bogor dan Cipinang Muara Jakarta) - <i>Eka Intan Kumala Putri, Rizal Bahtiar</i>	286
Analisis Transmisi Harga dalam <i>Supply Chain</i> Beras Indonesia - <i>Harmini, Rita Nurmalina, Ratna Winandi, Tintin Sarianti</i>	301
Penguatan Tata Kelembagaan dalam Penanganan Nelayan Tradisional di Wilayah Perbatasan Indonesia-Australia - <i>Luky Adrianto, Akhmad Solihin, Moch. Prihatna Sobari</i>	314
Strategi Komersialisasi Produk Hasil Inovasi Melalui Optimalisasi Model Kerjasama pada Badan Litbangtan - <i>Ma'mun Sarma, A. Kohar Irwanto, Nuning Nugrahani, Erlita Adriani</i>	330
IbM Kelompok Petani Ternak Ayam Lokal Langka dan Rawan Punah di Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur- <i>Maria Ulfah, Edit Lesa Adita</i>	346
Sistem Pengambilan Keputusan Cerdas untuk Peningkatan Efektivitas dan Efisiensi Manajemen Rantai Pasok Komoditi Pertanian dan Produk Agroindustri - <i>Marimin, Taufik Djatna, Suharjito, Retno Astuti, Ditdit N.Nugraha, Syarif Hidayat</i>	359
Persepsi dan Sikap Mahasiswa terhadap Pembelajaran Bahasa Indonesia di TPB IPB - <i>Mukhlas Ansori, Heni Krishnawati, Defina, Krishandini, Endang Sri Wahyuni</i>	373
Analisis Kepuasan Mahasiswa TPB terhadap Kualitas Layanan Dosen Bahasa Inggris MKDU Institut Pertanian Bogor - <i>Nilawati Sofyan, Irma Rasita Gloria Barus, Tonthowi Djauhari</i>	386
 BIDANG TEKNOLOGI DAN REKAYASA	
Rekayasa Biopolymer Hasil Samping Pabrik Tapioka (Onggok) sebagai <i>Enriched Soil Conditioner</i> : Tahap Sintesis Superabsorben - <i>Anwar Nur, Zainal Alim Mas'ud, Mohammad Khotib, Ahmad Sjahriza</i>	401
Rekayasa Proses Pembuatan dan Pemanfaatan Membran Ultrafiltrasi Selulosa Asetat dari Kayu Sengon - <i>Erliza Noor, Cut Meurah Rosnelly, Kaseno</i>	416
Desain dan Pengujian Kinerja Prototip-1 Mesin Kepras Tebu Tipe Pisau Rotari - <i>P.A.S. Radite, W. Hermawan, Joko W, M. Suhil, Safriandi, M. Habibullah</i>	431
Karakteristik dan Aktivitas Antioksidan Nanopartikel Ekstrak Kulit Mahoni Tersalut Kitosan - <i>Syamsul Falah, Sulistiyani, Dimas Andrianto</i>	441

Pengembangan Kualitas Perekat Likuida Tandan Kosong Sawit - <i>Surdiding Ruhendi, Tito Sucipto</i>	456
Pengembangan Sistem Informasi Berbasis Teknologi Informasi Untuk Pemberdayaan Petani Sayuran - <i>Sumardjo, Retno Sri Hartati Mulyandari</i>	472
Teknologi Separasi Bahan Aktif Temulawak Menggunakan Biopolimer Termodifikasi Berbasis Limbah Produksi Sagu - <i>Tun Tedja Irawadi, Henny Purwaningsih, Djarot S Hami Seno</i>	490
Teknologi True Shallot Seed (TSS) sebagai Bahan Tanam untuk Meningkatkan Produktivitas Bawang Merah - <i>Winarso Drajad Widodo, Roedhy Poerwanto, Nani Sumarni, Gina Aliya Sopha</i>	506
 INDEKS PENELITI	 viii

**BIDANG SUMBERDAYA ALAM
DAN LINGKUNGAN**

**IDENTIFIKASI TRIKOMA KELENJAR UNTUK PRODUKSI
ARTEMISININ PADA *Artemisia annua* L.MENGGUNAKAN
PENDEKATAN MOLEKULAR**

(Molecular Identification of Glandular Trichomes of *Artemisia annua* L. for
Artemisinin Production)

Utut Widyastuti^{1,2)}, Juliarni²⁾, Yuli Widiastuti³⁾, Dania²⁾, Fajri²⁾

¹⁾Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, LPPM IPB,

²⁾Dep. Biologi, Fakultas Matematika dan IPA, IPB,

³⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional

ABSTRAK

Produksi artemisinin yang merupakan zat bioaktif antimalaria pada tanaman *Artemisia annua* (Asteraceae) disekresikan oleh trikoma kelenjar yang telah mencapai kematangan fisiologi. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pada tahap pertumbuhan daun yang dapat menghasilkan trikoma kelenjar yang sudah mencapai kematangan fisiologi (berkembang sempurna) dalam jumlah besar serta melihat ekspresi dari gen *CYP71AV*, gen yang bertanggung jawab dalam biosintesis artemisinin. Pengamatan trikoma kelenjar pada beberapa tahapan pertumbuhan daun (kuncup, setengah membuka, lamina berkembang sempurna, dan daun tua sebelum gugur) menunjukkan bahwa baik pada aksesi ungu (genjah) maupun aksesi hijau (dalam) produksi artemisinin tertinggi terdapat pada stadia perkembangan daun setengah membuka dan ditandai dengan banyaknya trikoma kelenjar yang belum pecah. Ekspresi gen *CYP71AV* tertinggi pada aksesi hijau terdapat mulai daun kuncup dan maksimal pada daun setengah membuka, kemudian menurun pada daun membuka dan tidak terekspresi pada daun luruh. Sedangkan pada aksesi ungu ekspresi tertinggi hanya terdapat pada daun kuncup dan sedikit pada daun membuka. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka dianjurkan untuk memanen tanaman sebelum anthesis pada stadia daun setengah membuka sampai membuka.

Kata kunci: *Artemisia annua*, glandular trichomes, *CYP71AV* gene, gene expression.

ABSTRACT

Artemisia annua (Asteraceae) has a glandular trichome which secretes artemisinin, antimalarial substances. This research aimed to study the relation between glandular trichomes maturity with leaf development and expression of *CYP71AV* gene that responsible to biosynthesis of artemisinin during leaf development. Observation on development of glandular trichomes was done before anthesis (maximum vegetative growth) and at fourth stage of leaf development. Glandular trichomes in leaves in fourth stage development (leaf tip, half open leaf, maturity leaf, fall leaf) were studied. It has been observed that number of glandular trichomes were increased from half leaf open stage until leaf maturity stage in green accession, but in purple accession was increased until fall leaf stage. Artemisinin content analysis showed that half open leaf on both accession had higher content of artemisinin compare than other stage of leaves. Expression of *CYP71AV* gene was increased from leaf tip until half leaf open stage and decreased during leaf maturity and no expression on the fall leaf stage in green accession. But, in purple accession expression of *CYP71AV* gene only on half leaf open stage. Based on this results, it was suggested to harvest leaves of *A. annua* at half leaf open stage before anthesis.

Keywords: *Artemisia annua*, glandular trichomes, *CYP71AV* gene, gene expression.

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit yang meluas diberbagai negara. Penyakit malaria disebabkan oleh *Plasmodium* spp. merupakan satu dari sepuluh penyakit yang paling mematikan di dunia. Lebih dari 600 juta kasus di dunia terinfeksi malaria, dan menyebabkan 1.7 – 2.5 juta orang/tahun mengalami kematian. Empat puluh persen dari jumlah tersebut terdapat di negara berkembang, antara lain India, Indonesia, Amerika Latin dan negara-negara di Afrika (Graz *et al.* 2011). *Artemisia annua* L. (Asteraceae) merupakan tanaman obat yang sudah lama digunakan di Cina sebagai obat antimalaria (Klayman 1985). Tanaman ini mengandung senyawa terpenoid kompleks, salah satunya adalah artemisinin yang merupakan senyawa seskuiterpen lakton endoperoxide (Ferreira & Janick 1996). Artemisinin adalah senyawa yang efektif untuk membasmi jenis-jenis malaria yang resisten terhadap kuinin dan klorokuin serta malaria serebral yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* (Paniego & Giuletti 1994).

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 tanaman. Daun *A. annua* tertutup oleh trikoma kelenjar dan non-kelenjar (Duke & Paul 1993). Selain di daun trikoma kelenjar juga ditemukan di bunga (Ferreira & Janick 1995). Trikoma kelenjar terdiri atas lima pasang sel meliputi sepasang sel basal, sepasang sel tangkai dan tiga pasang sel sekretori (Duke & Paul 1993). Artemisinin diakumulasikan pada ruang subkutikular sel sekretori trikoma kelenjar.

Menurut Ferreira dan Janick (1995) Produksi artemisinin yang tinggi berhubungan erat dengan telah tercapainya kematangan fisiologi trikoma kelenjar. Kemampuan produksi artemisinin di lapang dan hubungannya dengan kematangan fisiologi trikoma kelenjar dari dua aksesori *A. annua* telah dilakukan pada dua aksesori yaitu ungu dan hijau. Hasil penelitian menunjukkan trikoma kelenjar tersebar merata pada helai daun. Pada bunga trikoma kelenjar terdapat pada braktea dan floret (bunga individu). Pada kedua aksesori sebelum antesis, daun-daun yang terletak di bagian atas cabang memiliki kerapatan total trikoma kelenjar lebih tinggi daripada daun-daun yang terdapat di bagian tengah dan bawah cabang. Sedangkan pada saat antesis kerapatan total trikoma kelenjar daun-daun di bagian bawah memiliki nilai yang

lebih tinggi daripada daun-daun di bagian tengah dan bagian atas cabang. Hasil analisis artemisinin menunjukkan pada kedua aksesori dan sebelum antesis, daun-daun di bagian tengah cabang memiliki kandungan artemisinin lebih tinggi daripada daun-daun di bagian atas dan bawah (UVB dan HUVB) cabang. Hal yang sama juga terlihat pada saat antesis, walaupun perbedaan jelas cukup terlihat pada aksesori hijau ungu daripada aksesori ungu (Juliarni *et al.* 2007).

Biosintesis artemisinin dimulai dengan konversi farnesil diposfat (FPP) menjadi artemisinin dengan bantuan enzim *amorpha-4,11-diene synthase* yang kemudian dilanjutkan dengan enzim *amorpha-4,11-diene hydroxylase*, *cytochrome P450 monooxygenase (CYP71AV1)* dan *artemisinic aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase* (Teoh *et al.* 2006). Penemuan tentang biosintesis artemisinin memberikan gambaran yang jelas bagaimana peranan senyawa amorpha-4,11-diene sebagai senyawa intermediate didalam biosintesis artemisinin (Bertea *et al.* 2005). Berdasarkan kelimpahan amorpha-4,11-diene di ekstrak dan kloning serta analisis ekspresi amorpha-4,11-diene diketahui bahwa merupakan sesquiterpene siklase (Wallart *et al.* 2001 dan Chang *et al.* 2000). Pada saat ini diketahui bahwa hidroksilasi menjadi senyawa antara artemisinin dikontrol oleh gen *CYP71AV1* yang berperan multifungsi sebagai sesquiterpene oxidase (Teoh *et al.* 2006)

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pada tahap pertumbuhan daun yang dapat menghasilkan trikoma kelenjar yang sudah mencapai kematangan fisiologi (berkembang sempurna) dalam jumlah besar serta melihat ekspresi dari gen *CYP71AV*, gen yang bertanggung jawab dalam biosintesis artemisinin

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel di Lapang

Daun dari dua aksesori *A. annua* yang terdapat di kebun percobaan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Solo, dipanen mulai dari saat kuncup sampai sebelum daun tersebut gugur (4 tahap). Sampel daun tersebut dipanen pada bagian tengah tajuk selama pertumbuhan vegetatif sebelum waktu antesis (Gambar 1 dan 2).

Penentuan kriteria tanaman yang digunakan untuk diamati kelenjar glandular trikoma adalah pada 3 cabang yang terletak pada sepertiga bagian dari tajuk pada tanaman yang memiliki pertumbuhan vegetatif maksimum, yaitu ditandai dengan munculnya kuncup bunga. Selanjutnya dari ketiga cabang yang memiliki pertumbuhan vegetatif maksimum (sebelum terjadi antesis) pada dua aksesori, yaitu hijau dan ungu (Gambar 1 dan 2) ditentukan tahapan perkembangan daun.



Gambar 1. Kriteria tanaman *Artemisia annua* L aksesori hijau. Tanda panah: kuncup bunga.



Gambar 2. Kriteria tanaman *Artemisia annua* L aksesori ungu. Tanda panah: kuncup bunga.

Penentuan tahapan perkembangan daun pada cabang tanaman terpilih. Tahapan perkembangan daun yang digunakan baik untuk penentuan kandungan artemisin maupun pengamatan kelenjar glandular trikoma diambil dari 4 tahap perkembangan daun, yaitu pucuk, daun setengah membuka, berkembang lebih

sempurna (maksimum) dan daun yang gugur (Gambar 3). Untuk penentuan kandungan artemisin dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (*TLC*) dan densitometer, maka diambil sebanyak 2 g daun dari semua tahap perkembangan daun. Sedangkan untuk pengamatan anatomi menggunakan *SEM* diambil 2 helai untuk setiap tahapan perkembangan, kemudian disimpan dalam larutan fiksatif. Selanjutnya daun akan diproses untuk pengamatan anatomi kelenjar glandular trikoma dengan *SEM*.



Gambar 3. Tahapan perkembangan daun tanaman *Artemisia annua* L. (a) kuncup, (b) setengah membuka, (c) berkembang sempurna dan (d) gugur.

Pengamatan Trikoma Kelenjar

Struktur anatomi trikoma kelenjar pada setiap tahap pertumbuhan daun diamati dengan menggunakan mikroskop elektron payaran (*SEM*). Persiapan preparat *SEM* adalah sebagai berikut: potongan daun diprafiksasi di dalam larutan glutaraldehid 2.5% selama 12 jam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan larutan bufer *cacodylate* sebanyak empat kali dengan masing-masing tahap berlangsung selama 15 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan *post*-fiksasi dengan memasukkan daun ke dalam larutan osmium tetroksida 2% pada suhu 4°C selama 1 jam. Selanjutnya daun dicuci dengan larutan bufer *cacodylate* sebanyak empat kali dengan masing-masing tahap berlangsung selama 15 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya sampel dicuci dengan akuades pada suhu 4°C selama 15 menit. Proses dehidrasi dilakukan dengan seri larutan alkohol yaitu pertama-tama daun direndam dalam larutan alkohol 50% sebanyak empat kali dengan masing-masing tahap berlangsung

selama 15 menit pada suhu 4°C, selanjutnya daun direndam dalam larutan alkohol 75% (*stop point*). Kemudian daun direndam di dalam larutan alkohol 85% selama 20 menit pada suhu 4°C. Sampel daun selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan alkohol 94% selama 20 menit pada suhu kamar, tahap terakhir adalah perendaman di dalam larutan alkohol absolut sebanyak dua kali dengan masing-masing tahap berlangsung selama 10 menit pada suhu kamar. Sampel daun yang telah didehidrasi kemudian dikeringbekukan di dalam larutan t-Butanol selama 3 jam setelah terlebih dahulu dimasukkan ke dalam larutan yang sama selama 10 menit sebanyak dua kali. Selanjutnya sampel daun dilekatkan pada *specimen stub* menggunakan perekat karbon, kemudian permukaannya disepuh dengan logam emas untuk kemudian diamati dengan SEM. Karakter anatomi yang diamati pada irisan paradermal adalah tahapan perkembangan, bentuk, ukuran dan kerapatan (jumlah/mm²) trikoma kelenjar.

Analisis Artemisinin

Analisis artemisinin dilakukan dengan bantuan alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) densitometri dengan $\lambda = 540$ nm. Sampel daun dan bunga dikeringkan di oven pada suhu 40°C sehingga kadar airnya mencapai kurang dari 10%. Kemudian sampel dihaluskan sehingga menjadi serbuk dan diayak dengan pengayak 40 mesh. Sampel serbuk daun dan bunga yang digunakan sebanyak 1000 mg. Selanjutnya sampel dimaserasi dengan 10 ml n-heksan selama 3 x 24 jam, disaring, dan dicuci dengan 10 ml n-heksan kembali. Ekstrak heksan kemudian diuapkan dengan vakum untuk mendapatkan ekstrak heksan pekat. Sampel kemudian dianalisis konsentrasi artemisininnya dengan menggunakan KLT. Sebagai standar digunakan artemisinin dari SIGMA USA. Sampel yang mempunyai nilai Rf yang mirip dengan standar artemisinin dilanjutkan analisisnya. Spot sampel pada plot silica gel (GF254) dihitung kadar artemisininnya dengan cara menghitung luas spot yang telah diukur oleh densitometer. Luas area yang diperoleh diplotkan ke kurva baku sehingga diperoleh kadar artemisinin dalam larutan.

Isolasi RNA total

Isolasi RNA dengan Metode Trizol.

Sebanyak 50-100 mg daun pada setiap stadia perkembangan yang telah tersimpan dalam aluminum foil di dalam freezer, diberi nitrogen cair langsung digerus dengan menggunakan mortar sampai halus berbentuk bubuk. Bubuk dicampur dengan 800 μ l Trizol (*Invitrogen*). Suspensi sel dipindahkan ke dalam ependorf, dan diinkubasikan pada suhu ruang selama kurang lebih 5 menit. Ke dalam ependorf tersebut, kloroform (200 μ l) dimasukkan dan suspensi sel divortex sampai tercampur. Campuran diinkubasikan pada suhu ruang selama 3 menit. Selanjutnya ependorf tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm (Jouan BR4i) dengan suhu 6 °C selama 15 menit. Cairan bagian atas diambil sebanyak minimal 60% dari volume Trizol. Supernatan tersebut dipindahkan ke dalam ependorf baru, dan ditambah dengan isopropil alkohol lalu diinkubasikan dalam suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu ependorf tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit dengan suhu 6 °C. Supernatan dari hasil sentrifugasi dibuang, dan endapannya diambil, kemudian ditambah dengan etanol 75%. Ependorf kembali disentrifugasi dengan kecepatan 5700 rpm selama 5 menit dengan suhu 6 °C. Etanol 75% dibuang, endapan dikeringkan dengan menggunakan vakum. Setelah kering endapan disuspensikan dalam 30 μ l H₂O-DEPC 0.1%.

Kuantitas RNA total dianalisis dengan menggunakan *spektrofotometer*, absorbansi diukur pada panjang gelombang 260 (λ_{260}), dan 280 (λ_{280}). Keutuhan RNA total dianalisis secara kualitatif menggunakan metode elektroforesis, dengan memigrasikan RNA pada gel agarosa di dalam bufer MOPS 1% (4,2 g/l 3-Morpholinopropanesulfonic acid (C₇H₁₅NO₄), 0,41 g/l Na-asetat, 0,37 g/l Na₂EDTA.H₂O).

Sintesis cDNA Total.

Sintesis cDNA total melalui transkripsi balik (RT) dilakukan dengan metode Suharsono *et al.* (2002). Sebanyak 500 ng RNA total dicampur dengan 4 μ l buffer (5x), 2 μ l 2 mM dNTP mix, 2 μ l 0.1 M dTT, 2 μ l primer oligo(dT), 0.2 μ l 0.1 U enzim *reverse transcriptase* (RT), dan H₂O-DEPC hingga volume akhir reaksi 20

µl. Kondisi RT adalah 10 menit suhu 30 °C, 50 menit suhu 42 °C, 5 menit suhu 95 °C.

Evaluasi keberhasilan sintesis cDNA total dilakukan melalui PCR dengan menggunakan primer β-aktin. PCR β-aktin dilakukan dengan mencampur 2 µl cDNA total, 2 µl buffer (10x), 1 µl 2 mM dNTPmix, 0.8 µl 25 mM MgCl₂, 0.1 µl 0.1 U enzim *taq polimerase*, 2 µl 10 pmol primer *forward* (F), 2 µl 10 pmol primer *reverse* (R), digenapkan dengan ddH₂O hingga 20 µl. Kondisi PCR adalah pra-PCR 95 °C 5 menit, denaturasi 94 °C 30 detik, *annealing* 56 °C 30 detik, ekstensi 72 °C 2 menit, siklus diulangi 30 kali, dan pasca-PCR 72 °C 5 menit. Apabila cDNA yang disintesis adalah murni yang tidak terkontaminasi DNA genom, maka PCR menghasilkan amplifikasi berukuran 450 pb. Apabila terkontaminasi DNA genom, maka produk hasil PCR berukuran 540 pb karena cetakan DNA genom yang diamplifikasi meliputi daerah ekson 1, intron dan ekson 2. Selain untuk melihat keberhasilan sintesis cDNA dan kemurnian cDNA dari kontaminan DNA genom, PCR β-aktin juga digunakan untuk menyetarakan konsentrasi cDNA pada berbagai perlakuan. primer aktin yang didesain dari kedelai (*Ac.TTTTV00450*) dengan primer *forward* tepat pada kodon awal (5' ATGGCAGATGCCGAGG ATAT3') dari ekson 1 dan primer *reverse* tepat pada daerah ekson 2 (5' CAGTTGTGCG ACCACTTGCA3'). Untuk mengetahui ukuran PCR β-aktin, dilakukan elektroforesis pada gel agarosa di dalam bufer elektroda TAE 1x (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA).

Analisis ekspresi gen CYP71AV1

Analisis ekspresi akan mengikuti metode Teoh et al. (2006) menggunakan primer 5'CACCATGGCACTCTCACTGACCAC dan 5'CTAGAAACTTGGAACGAGTAACAAC

HASIL DAN PEMBAHASAN

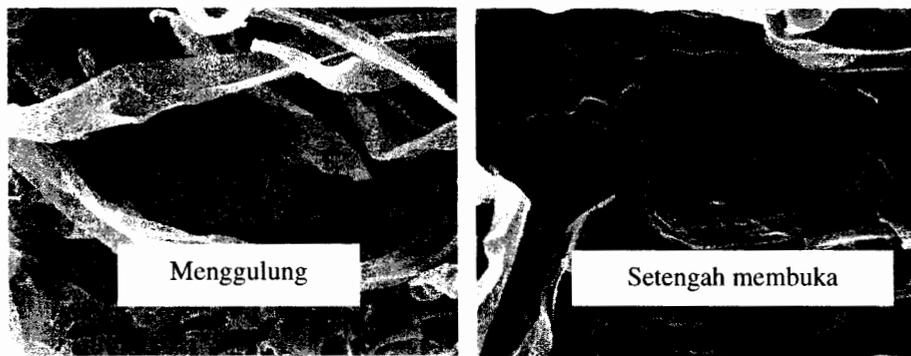
Hubungan antara Kerapatan Total Trikoma Kelenjar dan Kandungan Artemisinin

Pada kedua aksesori sebelum antesis, hasil analisis artemisinin menunjukkan pada daun setengah membuka baik pada aksesori hijau (H) maupun aksesori ungu (U)

memiliki kandungan artemisin yang tinggi dibandingkan dengan stadia perkembangan daun yang lain. Aksesori ungu memiliki kandungan artemisinin lebih tinggi dibandingkan dengan aksesori hijau, hal ini diduga berhubungan dengan kematangan fisiologi dari aksesori ungu yang merupakan tanaman genjah.

Berdasarkan kondisi fisiologi trikoma kelenjar yang terdapat pada setiap stadia perkembangan daun maka pada aksesori hijau jumlah trikoma kelenjar matang perluas daun lebih banyak dibandingkan dengan yang telah pecah mulai stadia pucuk, setengah membuka, membuka sempurna, sedangkan pada stadia luruh trikoma kelenjar lebih banyak dalam kondisi pecah (Tabel 1). Pada aksesori ungu jumlah trikoma kelenjar pecah perluas daun lebih banyak dibandingkan dengan yang matang pada semua stadia perkembangan daun, hal ini diduga berhubungan dengan sifat tanaman ini yang lebih genjah (Tabel 1). Banyaknya trikoma kelenjar matang di aksesori ungu pada stadia perkembangan daun setengah membuka diduga menyebabkan kandungan artemisinin pada daun aksesori ungu lebih banyak daripada aksesori hijau (Gambar 4 dan 5) karena kelenjar trikoma yang matang ini sebagai tempat penyimpanan senyawa metabolit sekunder (Ferreira dan Janick (1995)

Hubungan antara kerapatan total trikoma kelenjar dan kandungan artemisinin yang terdapat pada berbagai stadia perkembangan daun menunjukkan hal yang tidak sama antara aksesori hijau dan ungu. Pada aksesori hijau terlihat jumlah trikoma meningkat mulai dari stadia pucuk hingga daun membuka sempurna dan menurun pada saat daun luruh, sedangkan pada aksesori ungu jumlah trikoma cenderung meningkat sampai stadia daun luruh. Walaupun kandungan artemisin pada dua aksesori ini memiliki persamaan pola dimana meningkat pada stadia daun setengah membuka, tetapi hal ini agak berbeda pada pola jumlah trikoma antara kedua aksesori (Gambar 6). Jumlah trikoma yang cenderung meningkat pada daun luruh di aksesori ungu tidak berkorelasi dengan kandungan artemisinin, hal ini diduga karena banyaknya trikoma kelenjar yang telah pecah dibandingkan yang matang (Tabel 1). Sedangkan pada aksesori hijau pada stadia daun luruh jumlah trikoma yang menurun diduga menyebabkan pula kandungan artemisinin yang cenderung menurun, serta banyaknya trikoma kelenjar dalam keadaan pecah dibandingkan dengan kelenjar yang matang (Tabel 1).



Gambar 4. Kondisi trikoma kelenjar pada stadia daun menggulung dan setengah membuka yang terdapat pada abaksial aksesi hijau *A. annua*.



Gambar 5. Kondisi trikoma kelenjar pada stadia daun menggulung dan setengah membuka yang terdapat pada abaksial aksesi ungu *A. annua*.

Tabel 1. Rata-rata jumlah trikoma perluas daun total (jumlah/mm²) berdasarkan tahapan perkembangan trikoma pada berbagai stadia perkembangan daun aksesi hijau dan ungu.

Aksesi	Trikoma muda	Trikoma matang	Trikoma pecah
Hijau			
Daun menggulung (pucuk)	0	188	42
Daun setengah membuka	103	1183	823
Daun membuka sempurna	698	1409	1385
Daun luruh	0	962	1430
Ungu			
Daun menggulung (pucuk)	9	95	180
Daun setengah membuka	267	1365	1769
Daun membuka sempurna	391	1980	6247
Daun luruh	0	4129	8821

Tingginya kandungan artemisinin pada stadia pertumbuhan daun setengah membuka baik pada aksesi ungu maupun hijau di duga berhubungan dengan banyaknya kelenjar trikoma dalam keadaan matang sehingga kandungan senyawa

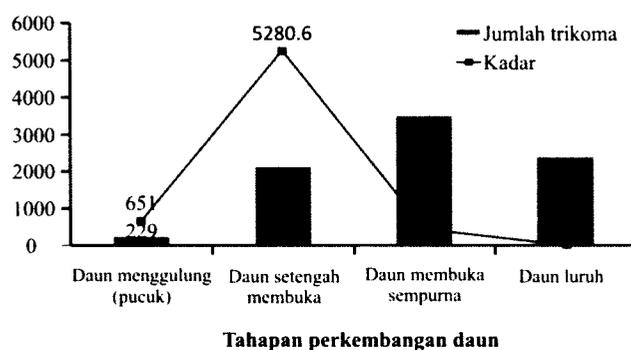
metabolit masih tersimpan dengan baik di kantong kelenjar. Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Gupta *et al.* (2002), yang mendapatkan bahwa kandungan artemisinin pada stadia daun yang lebih muda lebih tinggi dibandingkan dengan daun yang tua. Selain itu waktu pemanenan juga dapat menyebabkan perbedaan kandungan artemisinin yang terdapat pada daun. Daun yang dipanen pada musim hujan (Juli-September) menyebabkan terjadi peningkatan pada kandungan artemisinin di daun (Gupta *et al.* 2002). Walaupun daun yang diambil untuk dianalisa pada penelitian ini dilakukan pada bulan Juli dan menunjukkan kandungan artemisinin tertinggi pada stadia setengah membuka, hal ini belum dapat dikaitkan dengan adanya lingkungan musim hujan, karena pada bulan Juli belum banyak terdapat hujan di lokasi penelitian. Oleh karena itu akan sangat menarik untuk melihat perubahan musim hujan dan kering dengan waktu pembentukan artemisinin pada setiap perkembangan daun.

Aksesi ungu merupakan aksesi yang cepat berbunga (aksesi genjah), sedangkan aksesi hijau merupakan aksesi yang paling lama berbunga (aksesi dalam) sehingga mempengaruhi perkembangan trikoma kelenjar. Perkembangan trikoma kelenjar aksesi ungu lebih dahulu daripada aksesi hijau ungu sehingga akumulasi artemisinin pada trikoma kelenjar aksesi ungu diduga terjadi lebih awal daripada aksesi hijau ungu.

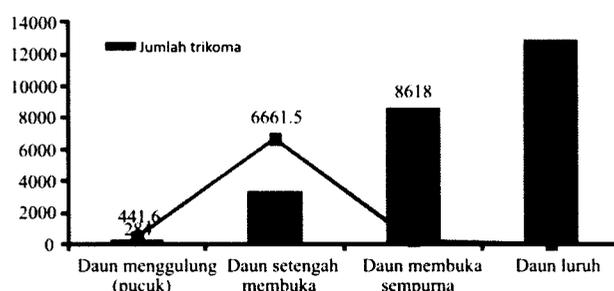
Analisis ekspresi gen *CYP71AV* pada berbagai stadia perkembangan daun.

Tahapan perkembangan daun yang digunakan baik untuk penentuan ekspresi gen *CYP* diambil dari 4 tahap perkembangan daun, yaitu pucuk, daun membuka, berkembang lebih sempurna (maksimum) dan daun yang gugur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa:

Ekspresi gen *CYP71AV* meningkat pada daun yang setengah membuka dan tidak terdapat ekspresi pada daun yang gugur pada aksesi hijau (Gambar 7), sedangkan pada aksesi ungu ekspresi gen *CYP71AV* hanya muncul pada saat daun setengah membuka dan sangat kecil sekali pada saat kuncup (data tidak ditampilkan).

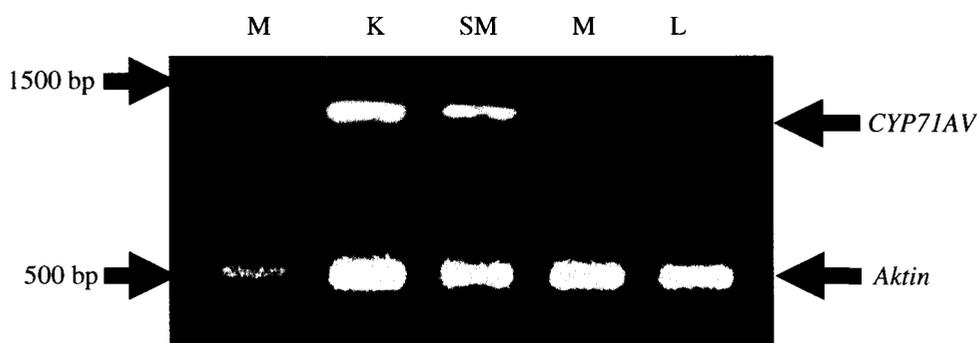


(a)



(b)

Gambar 6. Hubungan antara jumlah trikoma dan kadar artemisinin perluasan daun total (mm²) pada aksesori hijau (a) dan ungu (b).



Gambar 7. Ekspresi gen *CYP71AV* pada berbagai stadia perkembangan daun di aksesori hijau dan ekspresi gen aktin sebagai kontrol..M= Marker 1 kb, K= Kuncup, SM= Setengah membuka, M= Membuka penuh, L=Daun tua (luruh).

Hasil ekspresi gen *CYP71AV* yang diperoleh sesuai dengan kandungan artemisin yang diperoleh, dimana ekspresi gen ini mulai meningkat pada saat kuncup sampai setengah membuka dan mulai turun pada saat daun membuka penuh dan akan luruh (tua). Hal ini sedikit berbanding terbalik dengan jumlah trikoma dimana mana daun yang membuka penuh jumlah trikoma masih banyak,

tetapi karena sudah banyak dalam keadaan pecah sehingga menyebabkan kandungan artemisinin berkurang. Hasil ekspresi gen *CYP71AV* ini sejalan dengan penelitian Gupta et al. (2002) yang mendapatkan bahwa pada umumnya daun muda memiliki kandungan artemisinin lebih banyak dari daun tua.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh ini maka dianjurkan untuk memanen tanaman pada stadia daun setengah membuka karena artemisinin dan metabolit sekunder lainnya belum menguap keluar dari ruang subkutikular trikoma kelenjar seperti yang dilaporkan oleh Ferreira dan Janick (1995) yaitu kutikula yang menutupi tiga pasang sel teratas dari sel sekretori (sel apikal) akan terpisah dari dinding sel selama perkembangan trikoma kelenjar serta membentuk suatu kantung yang terisi oleh artemisinin dan zat bioaktif lainnya. Setelah menggelembung maksimal, kantung tersebut pecah dan mengeluarkan isinya .

KESIMPULAN

Produksi artemisin tertinggi diperoleh pada stadia daun setengah membuka yang ditandai dengan telah tercapainya kematangan fisiologi dari kelenjar trikoma serta ekspresi yang tinggi dari gen *CYP71AV*, yang merupakan gen yang bertanggung jawab dalam biosintesis artemisin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DP2M-DIKTI melalui DIPA-IPB yang telah memberikan dana penelitian kepada Utut Widyastuti dengan no kontrak DIPA IPB, 89/I3.24.4/SPK/BG-PD/2009 Tanggal 30 Maret 2009 dan Nomor:25/13.24.4/SPP/PF/ 2011 Tanggal, 28 Maret 2011. Terima kasih kepada Puslit Bioteknologi, LIPI yang telah memberikan bantuan fasilitas penelitian untuk SEM.

DAFTAR PUSTAKA

Bertea, CM, Freije, JR., van der Woude, H. Verstappen FW, Perk, L., Marquez, V., de Kraker J.W., Posthumus, M.A., Jansen, B.J., de Groot, A., Franssen, M.C. and Bouwmeester, H.J. 2005. Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta Med.* 71, 40-47.

- Chang, Y.J., Song, S.H., Park, S.H. and Kim, S.U. 2000 Amorpha-4,11 –diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involed in artemisinin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 383, 178-184.
- Duke SO, RN Paul. 1993. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci* 154: 107-118.
- Ferreira JFS, J Janick. 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *Int J Plant Sci* 156: 807-815.
- Ferreira JFS, J Janick. 1996. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. <http://www.Hort.Purdue.Edu/newcrop/proceedings1996/v3-578.html>. [2 Mei 2004].
- Geldre van E, Vergauwe A, Eeckhout van den E. 1997. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plants Mol Biol* 33: 199-209.
- Graz B, Kitua A, Malebo HM. 2011. To what extent can traditional medicine contribute acomplementary or alternative solution to malaria control programmes? *Malaria Journal* 10: 1-6.
- Gupta, SK., Singh, P., Bajpai, P., Ram, G., Singh G., Gupta, MM., Jain, DC., Khanuja SPS., Kumar S. 2002. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. *Ind. Crops Prod.* 16:217-224
- Juliarni, HA Dewanto, TM Ermayanti. 2007. Studi karakter anatomi daun dari kultur tunas *Artemisia annua* L. *Jurnal Agronomi* 21:8-12
- Klayman DL. 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 228 : 1049-1055
- Teoh. KH, Polichuk DR, Reed DW, Nowak G, Covello PS. 2006. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal *CYP71AV1*, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Letters* 580: 1411-1416
- Wallaart, T.E. Bouwmester, H.J., Hille, J., Poppinga, L. and Majjers , N.C. (2001) Amorpha-4,11 –diene synthase: cloning nad functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 212, 460-465.