

## Peningkatan kandungan artemisinin melalui mutasi tunas *in vitro* tanaman obat *Artemisia cina*

### Improvement of artemisinin content through mutation of *in vitro* shoot cultures of *Artemisia cina* medicinal plant

Aryanti

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN

#### Abstrak

Perbaikan sifat tanaman melalui mutasi induksi menggunakan sinar gamma sudah dilakukan terhadap tunas *in vitro* tanaman obat *Artemisia cina*. Sebanyak 200 tunas *in vitro* *A.cina* pada media Murashige & Skoog (MS) tanpa hormon diirradiasi dengan dosis 10 Gy di Irradiator Gamma Chamber PATIR –BATAN. Kultur tunas iradiasi selanjutnya diperbanyak dan diseleksi. Galur mutan terseleksi dilanjutkan untuk diaklimatisasi dan di tanam di lahan percobaan di daerah Bogor dengan jarak tanam 0,5 x 1m. Telah diperoleh 21 galur dari 630 galur mutan *A.cina* yang ditanam di lahan percobaan. Pengamatan berupa morfologi tanaman berupa luas daun, tingi tanaman dan persentase tanaman berbunga dilakukan pada saat tanaman di lapangan. Kadar artemisinin dari tanaman ditentukan menggunakan alat KCKT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa galur mutan memiliki daun lebih luas dan beberapa galur mutan lebih pendek daripada tinggi tanaman induk. Persentase tanaman berbunga dicapai hingga 50,17% pada galur A31.1. Telah terjadi perbaikan sifat tanaman oleh sinar gamma yang ditunjukkan dengan meningkatnya kadar artemisinin pada galur mutan *A.cina*. Kadar tertinggi dicapai berturut-turut pada galur mutan A32a2, A32c1 dan A36.2 yaitu 21,03 mg/g, 19,99 dan 15,79 mg/g dibanding kandungan artemisinin pada tanaman induk hanya 0,40 mg/g. Persentase peningkatan pada galur A32a2, A32c1 dan A36.2 berturut-turut yaitu 51,58; 48,97 dan 38,48%.

**Kata kunci :** mutasi, tunas *in vitro*, artemisinin, *Artemisia cina*

#### Abstract

Improvement of plant traits through mutation induction of herbal medicine of shoots *Artemisia cina* *in vitro* have conducted by gamma rays. About 200 of *A.cina* shoots *in vitro* were cultured in Murashige & Skoog (MS) medium without phyto-hormone were irradiated by the dose of 10 Gy at Gamma Chamber in PATIR – BATAN. Irradiated shoot cultures were then multiplication and selected. The selected mutant lines have acclimatized and cultivated at distance of 0.5 x 1 m at Bogor region. 21 of mutant lines have been obtained from 630 *A.cina* mutant lines from field cultivation. The morphological observation i.e., leaves area, plants high and percentage of flower emerge have conducted when the plants were cultivated in the field. The artemisinin content of mutant lines and original plant have conducted by using HPLC. The result shown that the mutant lines had higher leaves area than original plant and some of mutant lines were shorter than original plant. The percentage of emerge flowers were reached 50.17% to be A31.1 mutant line. The improvement of plant traits by gamma rays was showed by increasing of artemisinin in *A.cina* mutant lines. The highest artemisinin content to be A32a2, A32c1 and A36.2 were found 21.03 mg/g, 19.99 and 15.79 mg/g respectively compared to the original plant

only 0.40 mg/g. The improvement of artemisinin content of mutant line A32a2, A32c1 and A36.2 were 52.25; 48.97 and 38.48% respectively.

**Key word :** mutation, shoots in vitro, artemisinin, *Artemisia cina*

## Pendahuluan

Semenjak klorokuin tidak lagi efektif mengobati malaria, maka pencarian obat baru pengganti klorokuin telah diupayakan. Obat baru tersebut adalah obat malaria berbasis artemisinin yang dikenal dengan *Artemisinin Combine Therapy* (ACT). Artemisinin termasuk kelompok sesquiterpen lakton, senyawa ini hanya terdapat di dalam tanaman *Artemisia sp.* dan kandungannya sangat rendah. Menurut Gupta *et al.*, (1996) kandungan artemisinin bervariasi tergantung tempat tumbuh yaitu pada tanaman *A. annua* yang tumbuh liar di India antara 0,01 sampai 0,11%, sedang pada kultur jaringan sekitar 0,03 – 0,11%. Beberapa metode telah dilakukan untuk meningkatkan kandungan senyawa tersebut termasuk cara semi sintetik melalui kultur tunas (Wallaart, *et al.*, 1999 Weather *et al.*, 2006), induksi akar melalui infeksi bakteri *Agrobacterium rhizogenes* (Weather, *et.al.*, 1994 dan Aryanti, *et al.*, 2001), perlakuan variasi pemupukan dan fotoperiod (Widiyastuti, *et al.*, 2007) dan iradiasi terhadap kalus *A. cina* (Aryanti, 2010), namun hasilnya masih belum memuaskan.

Mutasi induksi menggunakan sinar gamma telah berhasil memperbaiki sifat tanaman padi (Sobrizal and Ismachin, 2006) dan tanaman obat tapak dara (Syukur, 2000) dengan sifat lebih baik daripada tanaman induknya. Sinar gamma adalah gelombang elektromagnetik dan akan mengalami eksitasi dan ionisasi, energi dari proses eksitasi akan mengenai molekul air pada tanaman saat diiradiasi. Molekul air akan mengalami hidrolisis dan menghasilkan spur tidak stabil berupa oksidator dan reduktor yang akan menyerang DNA dan kromosom sehingga menimbulkan perubahan sifat pada tanaman yang dikenainya. Perubahan sifat yang diharapkan adalah tanaman dengan sifat lebih baik daripada tanaman induknya.

Pada penelitian ini telah dilakukan iradiasi terhadap tunas *in vitro* tanaman obat *Artemisia cina* dengan tujuan mendapatkan tanaman baru dengan morfologi lebih baik, berbunga lebih awal dan mengandung

artemisinin lebih tinggi daripada tanaman induknya. Galur mutan terpilih telah dilakukan penanaman pada daerah dengan ketinggian dibawah 500 m di atas permukaan laut (dpl).

## Metodologi

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tunas *in vitro* *Artemisia cina* yang dikultur pada media Murashige & Skoog (MS) tanpa penambahan hormon. Bahan kimia berkualitas pro analitik dari Merck.

Iradiasi dilakukan di Irradiator Gamma Chamber dengan dosis 10 Gy. Iradiasi dilakukan terhadap tunas *in vitro* berumur 2 minggu, setiap botol terdiri dari 5 tanaman dan diperlukan 40 botol untuk mendapatkan 200 eksplan iradiasi.

### Penanaman di Lahan Percobaan

Eksplan iradiasi selanjutnya diamati dan di sub kultur pada media MS tanpa hormon dan diseleksi sampai akhirnya di aklimatisasi dan ditanam pada lahan percobaan. Tanaman selama di lahan percobaan diamati berupa jumlah cabang, luas daun, tinggi tanaman, persentase tanaman berbunga dan kandungan artemisinin dari tanaman umur 4 bulan. Penanaman dilakukan pada lahan ukuran 4 x 5 m dengan jarak tanam 0,5 x 1 m dengan 3 kali ulangan untuk setiap galur. Lokasi tanam di daerah Bogor dengan ketinggian sekitar 300 m dpl.

### Penetapan Kadar Artemisinin

Kadar artemisinin ditetapkan mengikuti metode Sohly yang dimodifikasi yaitu penetapan kadar pada fraksi etil asetat menggunakan alat KCKT dengan kolom Bondapak dan pelarut asetonitril/air (7/3). Artemisinin murni digunakan sebagai baku pembanding untuk menetapkan kadar artemisinin pada setiap galur mutan.

## Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 630 galur mutan yang diseleksi telah diperoleh 21 galur dengan morfologi lebih baik daripada tanaman induknya. Dari 21 galur yang ditampilkan pada Tabel I menunjukkan bahwa hanya 1 galur yang memiliki tinggi tanaman tidak berbeda nyata dari tanaman induknya, namun ada galur mutan yang berbeda nyata lebih rendah daripada tanaman induknya.

Tabel I. Morfologi setiap galur mutan dan tanaman induk *Artemisia cina*

No.	Galur	Tinggi tanaman (cm)	Luas daun (Cm <sup>2</sup> )	Jumlah cabang	Tanaman berbunga (%)	Berat kering tanaman (g)
1	A12.1	62,20def	35,83k	23,00b	30,40c	170,16a
2	A16.2	63,07cde	71,17a	20,00de	31,53c	107,14e
3	A21.2	72,30a	39,20hi	17,00fg	14,59ijk	84,40h
4	A25.2	72,50a	43,17g	17,00fg	10,70l	78,93i
5	A26A1	65,00c	40,03h	22,17bcd	18,07fgh	63,15l
6	A29.1	55,67hi	28,07l	22,67bc	12,12kl	49,52m
7	A29A2	57,67h	45,33f	22,67bc	15,63hij	69,93k
8	A2A1	58,20gh	56,87c	12,00ij	25,03de	122,10c
9	A3.1	61,07ef	40,33h	16,33fg	27,26d	106,89e
10	A30A1	49,00k	38,00ij	6,27k	Tb	32,32o
11	A31.1	53,23j	58,33c	15,33gh	50,17a	88,16g
12	A32A2	54,00ij	50,70d	10,33j	Tb	46,44n
13	A32C1	61,00ef	52,40d	13,00hi	18,83fg	29,16p
14	A34.2	60,13fg	51,60d	28,00a	17,20gh	119,03d
15	A36.2	57,33h	48,00e	20,00de	23,03e	100,94f
16	A6B1	64,13cd	40,33h	21,00bcd	14,19jk	129,95b
17	A36C1	61,07ef	37,00jk	16,00g	4,22m	63,35l
18	A5B1	47,00k	37,00jk	18,67ef	Tb	47,92nm
19	A7.1	68,00b	57,67c	16,67fg	35,43b	27,25p
20	A7.2	55,90hi	52,43d	16,00g	12,11kl	73,11g
21	A8.3	60,17fg	60,15b	20,33cde	16,89ghi	74,07j
22	Induk	64,33cd	51,00d	13,00hi	17,62f	65,57l

Keterangan ; huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5 %. Untuk membedakan antar galur diuji dengan cara Duncan.

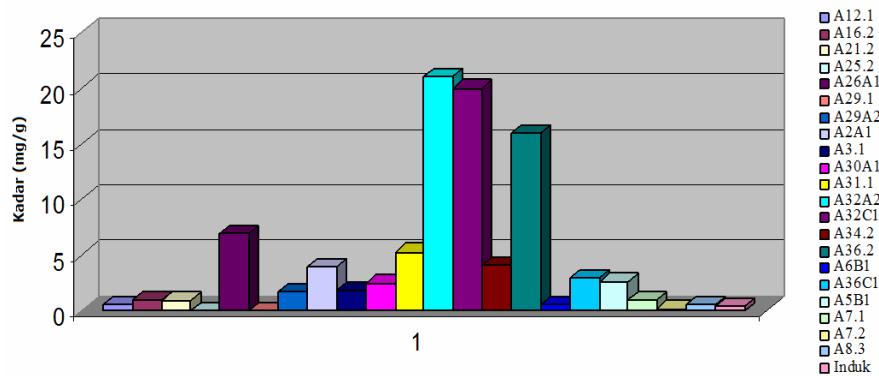
Tb : Tidak berbunga

Demikian juga dengan luas daun, ada galur mutan berdaun lebih kecil daripada tanaman induknya. Hal ini menunjukkan bahwa sinar gamma dapat mengakibatkan beragam penampilan tanaman karena radikal bebas merupakan spur tidak stabil akan menyerang disembarang ikatan pada DNA setiap individu tanaman. Tinggi tanaman tidak berkorelasi dengan jumlah cabang, dimana galur A25.2 dengan tinggi 72,50 cm hanya memiliki 17 cabang dibandingkan dengan galur A29.1 yaitu 23 cabang dengan tinggi tanaman 55,67 cm, sehingga galur ini kelihatan lebih kompak.

Luas daun dari galur mutan terpilih menunjukkan bahwa A16.2 memiliki luas daun yang sangat berbeda nyata dari induknya yaitu 71,17 Cm<sup>2</sup> dibanding induk hanya 51,00 Cm<sup>2</sup>. Galur ini merupakan galur dengan daun terlebar

dibanding galur lainnya. Daun adalah tempat terakumulasinya artemisinin karena pada bagian belakang daun terdapat trikoma tempat terdapatnya artemisinin. Pada galur mutan A16.2 luas daun sangat berbeda nyata dari galur lainnya namun tidak menunjukkan kadar artemisinin seperti pada galur A32c1. Hal ini dapat diasumsikan bahwa pada galur tersebut jumlah trikoma yang merupakan glandular tempat terakumulasinya artemisinin kurang dari jumlah trikoma dari galur mutan dengan kadar artemisinin lebih tinggi.

*Artemisia cina* merupakan tanaman semak menahun dengan ketinggian hanya sampai 15 cm dan berdaun menjari berwarna hijau, daun beraroma khas, bunga berwarna keputihan dan muncul umumnya pada umur 4 bulan pada daerah dengan ketinggian 1000 m dpl.

Gambar 1. Kadar artemisinin ( mg/g ) galur mutan dan tanaman kontrol *A.cina*.

Gambar 2. Morfologi galur mutan .

Galur mutan A36c1 berbunga lebih awal yaitu 2,5 bulan setelah masa tanam daripada galur mutan lainnya, namun persentase tanaman berbunga pada galur mutan tersebut lebih rendah dari galur mutan lainnya. Persentase galur mutan berbunga tertinggi terdapat pada galur A31.1 yaitu 50,17 %.

Kadar artemisinin pada setiap galur mutan umumnya lebih tinggi daripada tanaman induknya kecuali pada galur A7.2 dan A8.3 yaitu lebih rendah daripada tanaman induknya. Irradiasi dapat memperbaiki sifat tanaman baik secara morfologi (Tabel I) maupun kandungan artemisinin (Gambar 1). Pada Gambar 1 ditampilkan bahwa kadar artemisinin tertinggi dicapai hingga 21,03 mg/g pada galur mutan A32a2 dibanding induknya hanya 0,40 mg/g. Souret, *et al.*, (2003) melaporkan bahwa asam artemisinat dan asam dihidroartemisinat merupakan reaksi antara dalam pembentukan

artemisinin. Supaibulwatana et.al (2004) melaporkan bahwa callus *A.annua* yang diirradiasi dengan dosis 50 Gy telah meningkatkan kadar artemisinin dari 6,15 mg/g menjadi 17,15 mg/g. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Koobkokkrud et al., (2008) bahwa kultur tunas *A.annua* yang diirradiasi dengan dosis 8 Gy telah meningkatkan kadar artemisinin menjadi 0,70 % dari 0,18 % artemisinin yang terdapat pada tanaman induknya. Hal ini dapat diasumsikan bahwa sinar gamma mengakibatkan perubahan DNA mengarah kepada induksi farnesil difosfat sintase (FPS) serta menginduksi dihidroartemisinat yang berkorelasi dengan produksi artemisinin.

## Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa telah terjadi perbaikan sifat

tanaman pada tunas *A.cina* yang diiradiasi dengan dosis 10 Gy dengan tinggi tanaman, luas daun dan persentase tanaman berbunga bervariasi. Telah terjadi peningkatan kadar

artemisinin pada galur mutan yaitu lebih tinggi daripada tanaman induknya, kadar tertinggi dicapai 21,03 mg/g pada galur mutan A32a2 dibanding tanaman induknya hanya 0,40 mg/g.

## Daftar Pustaka

- Aryanti., 2010. Production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia cina* irradiated callus. *Majalah Farmasi Indonesia* 21(1),27-31.
- Aryanti, Bintang, M., Ermayanti, T.M., and Mariska, I., 2001. Production of antileukemic agent in untransformed and transformed root cultures of *Artemisia cina*. *A Journal of Biotechnology and Related Fundamental.* 8(1),11-16.
- El Sohly, H.N., El Ferary, F.S and El Sherei, M.M., 1990. A large scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *J. Nat. Product.* 53(6)1560 – 1564.
- Erdemoglu, N., Orhan, I., Kartal, M., Adiguzel, N and Bani, B., 2007. Determination of artemisinin in selected *Artemisia* L. species Turkey by Reversed Phase HPLC. *Rec. Nat. Prod.* 1(1-2, 3), 36-43.
- Gupta, M.M., Jain, D.C., Mathur, A.K., Singh, A.K., Verma, R.K., and Kumar S.,1995. Isolation of high artemisinic acid containing of *Artemisia annua*. *Planta Medica* 62, 280 – 281.
- Koobkruad, T., Chochai, A., Kirmanee, C., and De-Eknamkul, W., 2008. Effects of low-dose gamma irradiation on artemisinin content and amorpha – 4,11-diene synthase activity in *Artemisia annua* L.
- Syukur, S., 2000. Efek iradiasi gamma pada pembentukan variasi klon dari *Chataranthus roseus*. Prosiding APISORA, BATAN – Jakarta, 33-37.
- Sobrizal dan Ismachin, M., 2006. Peluang mutasi induksi pada upaya pemecahan hambatan peningkatan produksi padi. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi.* 2(1), 50-64.
- Souret, F. F., Y. Kim, B. E. Wyslouzil, K. K. Wobbe, and P. J. Weathers. 2003. Scale- up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 653–667.
- Supaibulwatana, K., Banyai, W., Cheewasakulyong, P., Kamchonwongpaisar, S., and Yuthavong, Y., 2004. Effect of culture conditions, elicitation and induced mutagens on plant growth and production of antimalarial agents in *Artemisia annua*, in Jonas, R., Pandya, A., and Tharun, G. (Eds.). *Biotechnological Advances and Application in Bioconversion of Renewable Raw Materials*. Braunschweig, Germany.
- Wallart, T.E., Uden, W., Lubberink, M., Heidi, G., Woenderbag H.J., Pras, N., and Quax W.J., 1999. Isolation and identification of dehydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin. *J. Nat. Prod.* 62,430-433.
- Weather, P.J., Cheetham, R.D., Follansbee, E., and Teoh K., 1994. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnology Letter.*, 16(12),1281-1286.
- Weather, P.J., Elkholyy, S, and Wobre K,K., 2006 : Artemisinin: The biosynthetic and its regulations in *Artemisia annua*, aterpenoid-rich species. In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant 42,309-317
- Widiyatuti, Y., Samanhudi dan Harjanti, N., 2007. Pengaruh fotoperiod dan dosis pupuk nitrogen terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman *Artemisia annua*. Prosiding Seminar Nasional Hortikultura. Surakarta, 520 – 524.

koresponden : Aryanti  
Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi,  
BATAN  
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49 - Jakarta Selatan  
e-mail : aryantia06@yahoo.com