

# PRODUKSI ARTEMISININ MELALUI KULTUR PUCUK *ARTEMISIA CINA* BERG EX POLJAKOV

## ARTEMISININ PRODUCTION BY SHOOT CULTURE OF *ARTEMISIA CINA* BERG. EX POLJAKOV

Maria Marina\*, Aziz-Purwantoro\*\*, C.J.Soegihardjo\*\*\*

\*Fakultas Pertanian UKSW Salatiga

\*\*Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*\*\* Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRAK

Artemisinin merupakan metabolit sekunder yang potensial sebagai senyawa anti malaria. Penelitian mengenai kandungan artemisinin di dalam *Artemisia cina* secara kultur pucuk sejauh ini belum banyak dilaporkan. Tujuan penelitian ini adalah : (i) untuk mengetahui kemampuan kultur pucuk *A. cina* dalam memproduksi artemisinin, (ii) mengetahui pengaruh kadar ekstrak khamir dan kadar sukrosa serta kombinasinya terhadap produksi artemisinin pada tanaman *A. cina*, (iii) menentukan kadar ekstrak khamir dan kadar sukrosa serta kombinasinya yang menghasilkan artemisinin tinggi.

Penelitian ini menggunakan faktorial 4 x 4 yang disusun dalam rancangan acak kelompok . Faktor pertama adalah perlakuan sukrosa dan faktor kedua adalah perlakuan ekstrak khamir. Analisis kuantitatif artemisinin dengan menggunakan HPLC dan analisis data menggunakan ANOVA dan diuji dengan uji DMRT pada taraf 5 %.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode kultur pucuk dapat dipergunakan sebagai cara untuk memproduksi artemisinin dari tanaman *A. cina*. Pemberian ekstrak khamir dan sukrosa mampu meningkatkan kandungan artemisinin dari tanaman *A. cina* dan kombinasi kadar sukrosa 3% dan ekstrak khamir 200 mg/l menghasilkan artemisinin, yaitu 14,035 mg/g bahan kering.

**Kata kunci :** Artemisin, kultur pucuk, *Artemia cina* Berg. Ex. Poljakov

### ABSTRACT

Artemisinin is a secondary metabolite has a potential effect as an antimalaria. Research in artemisinin content in *A. cina* from shoot culture have not been reported. The aim of this research were:(i) to know the ability of *A. cina* shoot culture to produce artemisinin, (ii) to asses the effect of concentration of yeast extract, sucrose and their combination in promoting the production of artemisinin, (iii) to determine the highest artemisinin concentration produced by shoot culture in the medium containing different concentration of yeast extract, sucrose and their combination.

The factorial of randomised complex block design (RCBD) was used in this experimental design. The first factor was concentration of sucrose ( 1%, 3%, 5%, 7%) and the second factor was concentration of yeast extract (0 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l). HPLC was used. To analyse quantitatively the artemisinin production, analysis of variance (ANOVA) and DMRT were used to analyse the data.

The results showed that the addition of yeast extract and sucrose increased the concentration of artemisinin from the *A. cina* shoot culture. The highest artemisinin content produced was 14.035 mg/g dry weights which was produced by combination of 3 % sucrose concentration and 200 mg/l yeast extract. This result suggest that *A. cina* shoot culture could be used as a method to producing artemisinin .

**Key words :** Artemisinin, shoot culture, *Artemia cina* Berg. Ex Poljakov

### PENDAHULUAN

Artemisinin adalah metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antimalaria, utamanya terhadap *Plasmodium falciparum*. Artemisinin yang terkandung di dalam tanaman *Artemisia annua* adalah suatu seskuiterpen lakton dengan peroksida internal, senyawa yang aktif sebagai obat malaria yang efektif untuk melawan strain Plasmodium yang resisten terhadap kloroquin yang berhubungan dengan malaria selebral akut (Paniego dan Giullith,1994).

*A. cina* adalah tanaman herba termasuk dalam suku yang sama dengan *A. annua* dan telah dimanfaatkan sebagai obat anti bakteri. Kandungan artemisinin dalam *A. cina* dengan kultur akar berambut (*hairy root*) sebesar 66,66 ppm (Aryanti, 2001). Namun demikian, penggunaan kultur akar berambut memerlukan penambahan *Agrobacterium rhizogenes* sehingga kultur dengan cara tersebut menjadi lebih mahal. Oleh karena itu, perlu dicari teknik kultur jaringan yang lain, misalnya kultur pucuk (*shoot culture*).

Hasil penelitian Woerdenberg *et al.*, (1993) dengan menggunakan kultur pucuk *A. annua*, kadar artemisinin 0,16% diperoleh dengan kadar sukrosa 1% dalam media. Pemberian sukrosa pada kultur sel *Dioscorea deltoidea* akan menaikkan kadar diosgenin paling tinggi bila dibandingkan dengan pemberian fruktosa, galaktosa, laktosa atau larutan amilum pada media. Kadar sukrosa 0,3% sampai 5% akan merangsang aktivitas enzim PAL (*Phenylalanin Ammonia Lyase*). Penambahan elisitor berupa ekstrak khamir sebesar 0,2% pada kultur suspensi sel *Centella asiatica* menghasilkan kadar asiatikosida tertinggi, yaitu sebesar 4425 µg/g bobot kering. Hasil penelitian dengan kultur kalus menunjukkan bahwa penambahan ekstrak khamir 0,3% menghasilkan kadar antraknon tertinggi, yaitu 2987,3 µg/g berat kering kalus daun ketepeng (*Cassia alata*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan kultur pucuk *A. cina* dalam memproduksi artemisinin, mengetahui pengaruh kadar ekstrak khamir dan kadar sukrosa serta kombinasinya terhadap produksi artemisinin pada tanaman *A. cina*, menentukan kadar ekstrak khamir dan kadar sukrosa serta kombinasinya yang menghasilkan artemisinin tinggi.

## METODOLOGI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Farmasi UGM dari bulan Februari 2002 sampai November 2002. Eksplan berasal dari ruas batang tanaman *A. cina* yang sudah di tanam secara *in vitro* yang diperoleh dari LIPI Bogor. Media perlakuan menggunakan MS cair dengan vitamin RT (*Revised Tobacco*) (Staba, 1965) ditambah sukrosa dengan kadar 1%, 3%, 5% dan 7% dan ekstrak khamir dengan kadar 0 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l dan 300 mg/l.

Dua minggu setelah subkultur pucuk yang terakhir, kemudian dilakukan induksi akar pada pucuk. Pucuk yang berumur dua minggu dipindahkan ke dalam media MS dengan vitamin RT ditambah IBA (*Indole 3-butyric acid*) 2 ppm. Tahap induksi akar ini berlangsung selama 17 hari. Selanjutnya, setelah akar-akar muncul *plantlet* dipindahkan ke dalam media perlakuan. Pengamatan kandungan artemisinin dilakukan setelah *plantlet* berumur 45 hari pada media perlakuan.

Analisis kuantitatif artemisinin berdasarkan metode Pras (Pras *et al.*, 1991) dan diukur dengan menggunakan HPLC. Pengukuran dengan HPLC pada panjang gelombang 260 nm menggunakan kolom Licospher RP- 18 panjang 10 cm. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : kaliumdihidrogenfosfat 0,05 mM ( 55 : 45 ), laju aliran 1,3 mL/menit, waktu retensi 40 menit.

Rancangan penelitian adalah faktorial 4x4 yang disusun dalam rancangan acak kelompok (RAK). Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan apabila terdapat perbedaan perlakuan dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf uji 5 %.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar Artemisinin Pucuk

Dari hasil anova dapat diketahui bahwa terdapat interaksi antara faktor sukrosa dan ekstrak khamir. Kadar tertinggi artemisinin terletak pada perlakuan S3K20 (sukrosa 3%, ekstrak khamir 200 mg/l) dengan kadar 14,036 mg/g bahan kering.

Tabel I. Kadar Artemisinin Pucuk (mg/g Bahan Kering) Dengan Perlakuan Sukrosa Dan Ekstrak Khamir

Perlakuan	Tanpa ekstrak khamir (K0)	Ekstrak khamir 100 mg/l (K10)	Ekstrak Khamir 200 mg/l (K20)	Ekstrak Khamir 300 mg/l (K30)
Sukrosa 1 %	10,493 d	10,147 d	10,230 d	10,215 d
Sukrosa 3 %	10,456 d	12,394 b	14,036 a	11,151 c
Sukrosa 5 %	10,363 d	12,400 b	10,302 d	10,325 d
Sukrosa 7 %	10,187 d	10,153 d	10,293 d	10,211 d

Ket : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata

Perlakuan sukrosa 1% dan 7%, pemberian ekstrak khamir dengan berbagai kadar tidak berbeda nyata (Tabel I). Hal ini diduga bahwa pada perlakuan sukrosa 1% dan 7% *plantlet* mengalami ‘stress’ karbohidrat, sehingga penambahan ekstrak khamir menyebabkan kondisi ‘stress’ yang berlebihan sehingga menghambat pembentukan artemisinin. Hal ini sesuai dengan yang diungkapkan Soegihardjo (1990) bahwa keadaan ‘stress’ yang

berlebihan dapat menghambat bahkan menghentikan produksi metabolit sekunder. Selanjutnya, pada perlakuan sukrosa 3%, pemberian ekstrak khamir 100, 200, dan 300 mg/l secara nyata meningkatkan kadar artemisinin pucuk dibanding tanpa penambahan ekstrak khamir. Hal ini diduga pada pemberian sukrosa yang optimal, penambahan ekstrak khamir memacu sintesis artemisinin. Pada perlakuan sukrosa 3%, pemberian ekstrak khamir optimal pada kadar 200 mg/l. Pada perlakuan sukrosa 5%, penambahan ekstrak khamir 100 mg/l secara nyata meningkatkan kadar artemisinin pucuk dibanding tanpa penambahan ekstrak khamir. Hal ini diduga bahwa pada perlakuan sukrosa 5%, 'stress' yang timbul belum berlebihan sehingga penambahan ekstrak khamir 100 mg/l masih mampu meningkatkan kadar artemisinin. Hal ini sesuai dengan Moris *et al.* dalam Dixon (1985) bahwa pada media produksi serpentina dalam kultur suspensi sel *Catharanthus roseus* digunakan sukrosa 5%.

Adanya pengaruh sukrosa terhadap kadar artemisinin bahwa sukrosa merupakan sumber karbon bagi pembentukan artemisinin yang termasuk dalam kelompok isoprenoid. Sukrosa di dalam media diserap oleh sel-sel akar kemudian di dalam tanaman dipecah menjadi glukosa dan fruktosa. Selanjutnya melalui proses glikolisis akan terbentuk asam asetat atau turunannya asetilKoA yang merupakan satu-satunya sumber karbon dari asam mevalonat dan merupakan senyawa awal untuk biosintesis artemisinin.

Selanjutnya faktor ekstrak khamir juga berpengaruh terhadap kadar artemisinin. Diduga ekstrak khamir dapat mengelisitasi sel-sel tanaman karena dianggap sebagai benda asing sehingga memacu pembentukan fitoaleksin berupa artemisinin. Nampaknya elisitor asal luar seperti ini dikenal oleh protein tertentu di membran sel, yang kemudian memberi isyarat ke sel untuk memproduksi fitoaleksin. Sifat isyarat ini belum diketahui tapi jelas bahwa isyarat tersebut meningkatkan transkripsi molekul mRNA yang menyandi enzim yang mensintesis fitoaleksin (Salisbury dan Ross, 1995).

### Kadar Artemisinin Akar

Dari hasil anova diketahui bahwa ada interaksi sukrosa dengan ekstrak khamir. Perlakuan sukrosa 3%, penambahan ekstrak khamir sampai dengan 200 mg/l secara nyata meningkatkan kadar artemisinin akar (Tabel II). Hal ini diduga pada perlakuan sukrosa tersebut merupakan kadar sukrosa yang optimal sehingga penambahan ekstrak khamir memacu sintesis artemisinin.

Tabel II. Kadar Artemisinin Akar (mg/g Bahan Kering) Dengan Perlakuan Sukrosa Dan Ekstrak hamir

Perlakuan	Tanpa ekstrak khamir (K0)	Ekstrak khamir 100 mg/l (K10)	Ekstrak Khamir 200 mg/l (K20)	Ekstrak Khamir 300 mg/l (K30)
Sukrosa 1 %	10,1821 bc	10,159 bc	10,1721 bc	10,1551 bc
Sukrosa 3 %	10,0941 c	10,3659 a	10,3225 a	10,1459 bc
Sukrosa 5 %	10,2610 ab	10,1583 bc	10,1112 c	10,1361 bc
Sukrosa 7 %	10,1034 c	10,1905 bc	10,1366 c	10,1455 bc

Ket : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata

Adanya pengaruh sukrosa terhadap kadar artemisinin akar diduga sukrosa merupakan sumber karbon utama dari asam mevalonat yang merupakan senyawa awal bagi biosintesis artemisinin.

*A. cina* mensintesis senyawa metabolit sekunder pada bagian akar (Aryanti,2001). Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Ferreira dan Janick (1996) dengan menggunakan tanaman *A. annua*, diperoleh bahwa akar merupakan pendukung dalam meningkatkan kadar artemisinin dalam tanaman.

Akar pada *A. cina* juga mengandung artemisinin, hal ini diduga bahwa akar pada *A. cina* tidak hanya berfungsi sebagai tempat sintesis artemisinin tetapi juga sebagai tempat menyimpan artemisinin (Tabel II).

Dari hasil penelitian ini diperoleh kadar artemisinin total (kadar artemisinin pucuk dan akar) sebesar 24,3585 mg/g bahan kering. Hal ini masih lebih rendah dibanding hasil penelitian Aryanti (2001) dengan menggunakan kultur akar berambut, yaitu 66,66 mg/g, sehingga masih berpeluang untuk lebih ditingkatkan dalam penelitian-penelitian selanjutnya. Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa metode kultur pucuk dapat digunakan sebagai cara untuk memproduksi artemisinin dari tanaman *A. cina*, pemberian ekstrak khamir dan sukrosa berpengaruh nyata dalam meningkatkan kandungan artemisinin dari tanaman *A. cina*, kombinasi kadar sukrosa 3 % dan ekstrak khamir 200 mg/l menghasilkan artemisinin tertinggi, yaitu 14,035 mg/g bahan kering.

### KESIMPULAN

Metode kultur pucuk dapat digunakan sebagai cara untuk memproduksi artemisinin dari tanaman *A. cina*. Pemberian ekstrak khamir dan sukrosa berpengaruh nyata dalam meningkatkan kandungan artemisinin dari tanaman *A. cina*. Kombinasi kadar sukrosa 3% dan ekstrak khamir 200 mg/l menghasilkan artemisinin tertinggi, yaitu 14,035 mg/g bahan kering.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aryanti, 2001, *Variasi Kandungan Artemisinin dari Akar Rambut dan Regenerasi Artemisia cina Berg ex Poljakov Sebagai Anti Kanker*, IPB , Bogor, 12-118.
- Brown, G.D., 1992, Two New Compounds from *Artemisia annua*, *J. Nat. Prod.*, 55(12) : 1756-1760.
- Brown, G.D., 1993, Annulide, A Sesquiterpene Lactone from *Artemisia annua*, *Phytochemistry*, 32(2) : 391-393.
- Ferreira J.F.S dan Janick J., 1996, Distribution of *Artemisia annua*, *Progress in New Crops*, 579 – 584.
- Ferreira J.F.S., 1996, Root as Enhancing Factor of The Production of Artemisinin Shoot Culture of *Artemisia annua*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44 : 211 – 217.
- Hartanto, Y., 1997, Kandungan Antrakinon pada Kultur Kalus Anak Daun Ketepeng (*Cassia alata* L.) dengan Perlakuan Tirosina, Ekstrak Khamir dan Sukrosa, *Tesis*, Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Kaul B. and Staba J.E., 1968, *Dioscorea* Tissue Culture : I. Biosynthesis and Isolation of Diosgenin from *Dioscorea deltoidea* Callus and Suspension Cells, *Lloydia*, 31 : 171 – 179.
- Klayman D, 1985, Qinghaosu (Artemisinin) : An Antimalarial Drug from China, *Science* 228: 1049 – 1055.
- Morris P., Scragg A.H., Smart N.J., Stafford A., 1985, Secondary Product Formation by Cell Suspension, in : *Plant cell culture – a practical approach* (R.A. Dixon, ed), 127-168, IRL Press, Oxford.
- Mustofa, 2001, Anti Malaria Klorokuin dan Tinjauan Mekanisme Aksi, Mekanisme Resistensi dan Hubungan Struktur Aktivitas, *Seminar Sehari Purna Tugas Prof. Drs. Sardjoko, Apt.*, Lab. Farmakologi dan Toksikologi Pusat Kedokteran Tropis, Fak. Kedokteran UGM , Yogyakarta.
- Paniego dan Giullith., 1994, *Artemisia annua* L : Dedifferentiated and Differentiated Cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 : 163 – 168
- Pras N, Visser J F, Batterman S, Woerdenbag H J dan Malingre T, 1991, Laboratory Selection of *Artemisia annua* L. for High Artemisinin Yielding Types, *Phytochemical An*, 2, 80 – 83.
- Soegihardjo, 1993, *Teknologi Kultur Jaringan Tanaman*, PAU Bioteknologi UGM Yogyakarta.
- Woerdenberg H. J, luers, Uden W., Pras N., Malingre T. M., dan Alferman., 1993, Production of The New Antimalarial Drug Artemisinin in Shoot Culture of *Artemisia annua*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32 : 169-174.