

**ARTIKEL REVIEW: PENINGKATAN PRODUKSI ARTEMISININ MELALUI  
REKAYASA ENZIM AMORPHA -4,11 DIENE SYNTHASE**

**Yuda Hardianto, Imam Adi Wicaksono**

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Jalan Raya Bandung-Sumedang Km. 21 Jatinangor, Sumedang 45363, Indonesia

Email : [yudahardianto@gmail.com](mailto:yudahardianto@gmail.com)

**ABSTRAK**

Artikel ini mengulas tentang produksi senyawa Artemisinin yang merupakan senyawa sesquiterpen lakton yang digunakan untuk mengatasi penyakit malaria yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium falciparium*. Jika dilakukan dengan proses ekstraksi pada tumbuhan alaminya maka Artemisinin yang didapat sedikit sehingga dilakukan berbagai metode seperti DNA rekombinan untuk menghasilkan enzim Amorpha -4,11 Diene synthase, pengembangan kondisi untuk produksi Amorpha -4,11 Diene synthase, optimasi biosintesis mevalonat pada *Escherichia coli* untuk menghasilkan senyawa Amorpha -4,11 diene sebagai prekursor obat antimalaria produksi Artemisin pada ragi dan *E coli*. Target dalam perbanyakan Artemisinin ini yaitu untuk memperbanyak Amorpha -4,11 Diene synthase yang digunakan untuk menghasilkan Amorpha -4,11 Diene sebagai senyawa intermediet dalam menghasilkan senyawa Artemisinin.

**Kata kunci :** Artemisinin, Malaria, *Plasmodium falciparium*, DNA rekombinan, Amorpha -4,11-Diene synthase, Amorpha -4,11 Diene.

**ABSTRACT**

*This article reviewed the production of Artemisinin compounds which are sesquiterpene lactone compounds used to treat malaria caused by the parasite Plasmodium falciparium. If done with the process of extraction on the natural plant Artemisinin gained little so do a variety of methods such as recombinant DNA to produce Amorpha -4.11 Diene synthase enzyme, the development of the conditions for the production of Amorpha -4.11 Diene synthase, optimization mevalonate biosynthesis in Escherichia coli for Amorpha -4.11 diene compounds produced as an antimalarial drug precursor artemisin production in yeast and E. coli. Targets in the multiplication of this Artemisinin is to reproduce Amorpha -4.11 Diene synthase which is used to generate Amorpha -4.11 Diene as intermediates in producing Artemisinin compounds.*

**Keywords :** Artemisinin , Malaria , *Plasmodium falciparium* , recombinant DNA , Amorpha – 4,11 Diene synthase, Amorpha -4.11 Diene

**PENDAHULUAN**

Artemisinin merupakan obat *first line* yang banyak digunakan untuk terapi penyakit malaria yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium falciparium*. Hal ini

disebabkan karena terjadinya resistensi *Plasmodium falciparium* terhadap obat-obat antimalarial konvensional seperti kloroquin, sulfadoksin, primetamin dan kina sehingga banyak tim medis yang

menggunakan Artemisinin ini untuk pengobatan antimalaria<sup>1</sup>.

Dilihat dari jenis senyawanya, Artemisinin ini merupakan senyawa kelompok sesquiterpen lakton yang dapat diperoleh melalui sintesis kimia, teknik DNA rekombinan dan isolasi dari bahan alam<sup>2</sup>

Sebelumnya telah dilaporkan bahwa Artemisinin ini dapat diperoleh dengan cara memperbanyak enzim Amorpha -4,11 diene synthase yaitu enzim yang dapat meningkatkan senyawa Amorpha -4,11 diene senyawa intermediet sebagai prekursor dalam pembentukan senyawa Artemisinin di dalam tanaman *Artemisia annua*<sup>3</sup>.

oleh Karena itu dalam peningkatannya produksinya, jumlah enzim ini harus ditingkatkan untuk mendapatkan senyawa Artemisinin yang lebih banyak dari jumlah alamnya. Hal itu dikarenakan senyawa Artemisinin ini berasal dari Farnesyl Diphosphate (FDP) yang nantinya senyawa ini dapat diubah menjadi senyawa squalene untuk pembentukan

Sterols dan yang satu lagi menjadi senyawa Artemisinin<sup>4</sup>.

Oleh karena itu review artikel kali ini akan membahas cara memperbanyak senyawa Amorpha -4,11 diene synthase untuk peningkatan jumlah produksi senyawa Artemisinin dalam tanaman *Artemisia annua* L.

## **METODE**

Data-data yang digunakan dalam review artikel ini mengacu pada studi atau penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yaitu berupa artikel atau jurnal-jurnal 10 tahun terakhir yaitu 2006-2016. Pencarian database elektronik PubMed, Science-Direct dan jipb.net. dengan menggunakan subjek judul yang berkaitan dengan bioteknologi dengan kata kunci "Recombinant Artemisinin", "Artemisinin", "Biosynthesis Artemisinin". Dari hasil pencarian tersebut didapat 12 jurnal, 11 diantaranya termasuk ke dalam kriteria inklusi yang merupakan jurnal internasional berbahasa Inggris berkaitan dengan memperbanyak enzim Amorpha -4,11 diene synthase dan 1 jurnal

termasuk ke dalam kriteria eksklusi dimana yang merupakan sebuah review artikel.

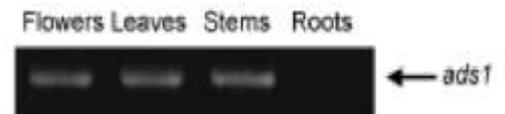
## HASIL

### Kloning, expressi gen *E coli* dalam menghasilkan senyawa Amorpha -4,11 – Diene synthase dari galur murni *Artemisia annua L*

Sebuah penelitian menyebutkan bahwa senyawa Amorpha -4,11 –Diene merupakan senyawa *sesquiterpen intermediat* (senyawa antara sesquiterpen dalam biosintesis Artemisinin) dibuat oleh ADS (Amorpha -4,11 –Diene synthase) (enzim untuk menghasilkan Amorpha -4,11 –Diene) yang berasal dari galur murni *Artemisia annua L* yang nantinya akan meningkatkan jumlah Artemisinin yang ada di dalamnya<sup>3</sup>.

Dalam percobaannya itu ADS yang ini dibuat gen hasil rekayasa yang berasal dari *strain 001* sehingga menghasilkan gen *ads1* (Amorpha -4,11 Diene synthase *strain 001*)<sup>5,6</sup> yang nantinya akan dimasukan ke dalam tumbuhan dan untuk meningkatkan

produksi Artemisinin dalam tanaman *Artemisia annua L* (tanaman penghasil senyawa Artemisinin)<sup>5</sup>. dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil expressi gen *ads1* pada tanaman *Artemisia annua L* pada semua bagian tanaman menggunakan RT-PCR.

Ternyata dalam pengamatan expressi gen menggunakan RT-PCR.ada pada semua bagian tanaman kecuali pada bagian akar. Diketahui bahwa gen *ads1* menghasilkan perbanyakan senyawa Amorpha -4,11 –Diene synthase pada tanaman *Artemisia annua L* sehingga produksi Artemisinin dapat meningkat dari pada jumlah yang biasanya<sup>3,5</sup>.

Selain itu menurut beberapa pendapat menyatakan bahwa jumlah Artemisinin dan sesquiterpen pada tanaman *Artemisia annua L* ini berbeda tiap daerahnya hal itu disebabkan oleh kondisi geografis yang berbeda sehingga mempengaruhi kemitif nya yang

disebabkan karena gen mengalami mutasi, duplikasi, regulasi gen transkripsi dan modifikasi translasi. dan *ads1* ini yang dihasilkan dari cDNA galur murni *Artemisia annua* L menunjukkan kesamaan 97-99% identik.<sup>6</sup>

**Pengembangan kondisi untuk produksi**

**Amorpha -4,11 –diene synthase (enzim**

**untuk penghasil senyawa intermediet untuk biosintesis Artemisinin).**

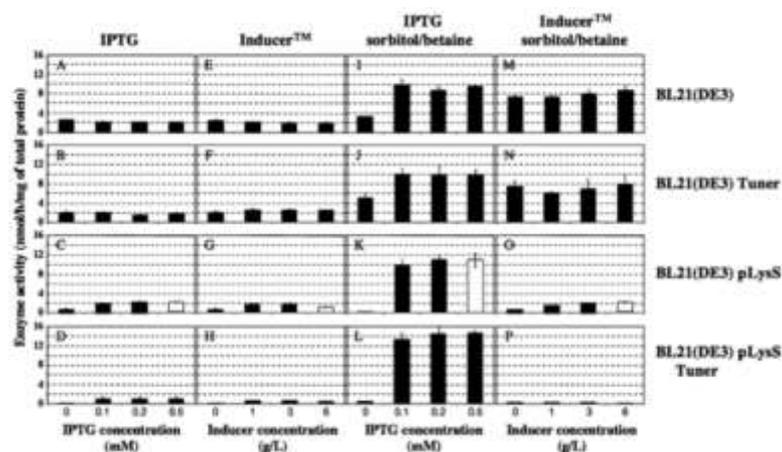
Amorpha -4,11 –diene synthase (Enzim untuk penghasil senyawa intermediet untuk biosintesis Artemisinin). Kemudian dibuatkan cDNA-nya dan dimasukan kedalam vector pET28 dan pET23 seperti pada Tabel 1

Tabel 1. Berbagai kondisi untuk melihat kondisi optimum pada vector pET28 dan pET23 yang menghasilkan Amorpha -4,11 diene synthase yang paling banyak

| Vektor | Galur bakteri | Penginduksi | Waktu induksi | Suhu Perlakuan |
|--------|---------------|-------------|---------------|----------------|
| pET28  | BL21pLysS     | 0,4 nM IPTG | 3 Menit       | 25             |
| pET23  | BL21pLysS     | 0,2 nM IPTG | 4 Menit       | 30             |

Kemudian dimasukan ke dalam galur bakteri *Escherichia coli*. BL21 (DE23), BL21 (DE3) Tuner™, BL21 (DE3) pLysS dan BL21 (DE3) pLysS Tuner™ menggunakan agen penginduksi (IPTG, Inducer™)<sup>7</sup>.

Kemudian dilihat aktivitas enzimnya yang dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil pengamatan aktivitas ekstrak Amorpha -4,11 –diene synthase menggunakan western blotting

Dari hasil pengamatan didapat bahwa ADS yang diekspresikan berkurang

ketika menggunakan galur pLysS dan meningkat namun tidak terlalu signifikan

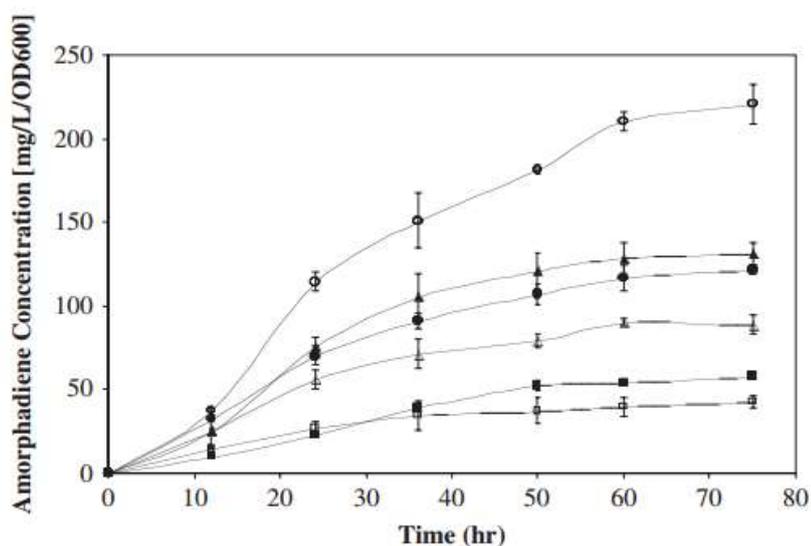
ketika diinduksi dengan IPTG atau The Inducer<sup>TM</sup>. Sehingga produksi Amorpha -4,11 Diene synthase sangat efektif ketika diberi IPTG dan Inducer<sup>TM</sup> sebagai penginduksinya<sup>7</sup>.

**Optimasi biosintesis mevalonate pada Eschericia coli untuk menghasilkan Amorpha -4,11 diene sebagai prekursor obat antimalarial.**

Dari hasil penelitian ini dilakukan optimasi produksi Amorpha -4,11 diene dengan menggunakan gen ADS yang

berasal dari *Artemisia annua* L dengan berbagai vektor. untuk bakterinya sendiri yang digunakan yaitu E coli DH1 untuk expressi dan produksi amorphadiene dengan menggunakan variasi vector sebagai berikut pMevt, pMBIS, pAM45-Mevt, pAM45, pAM92<sup>8</sup>.

Kemudian dilihat jumlah Amorphadiene yang dihasilkan selama 72 jam dengan pengambilan sampel setiap 12 jam dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Jumlah produksi Amorphadiene yang dihasilkan selama 72 jam pada kultur E coli DH1. (□) pMevt, (■) pMBIS, (●) pAM45-Mevt, (▲) pAM92, (○) pAM45 mengalami kenaikan hingga 72 jam.

Hasil yang dapat dilihat bahwa semua vector yang digunakan untuk expressi dan produksi Amorphadiene

mengalami peningkatan hingga 24 jam. Dan yang paling tinggi yaitu vector pAM45<sup>8</sup>.

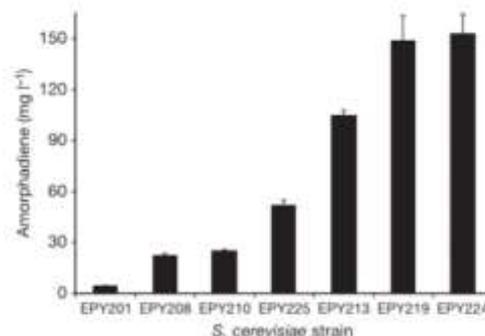
### Produksi asam artemisin sebagai prekursor obat antimalarial pada ragi

Untuk merekayasa senyawa asam artemisin pada ragi dilakukan dengan 3 langkah yaitu yang pertama rekayasa Farnesyl Pirofosfat (FPP) jalur biosintesis untuk meningkatkan produksi FPP dan mengurangi penggunaannya untuk sterol. Yang kedua yaitu memperkenalkan gen Amorphadiene synthase untuk memperbanyak hasil Amorphadiene dari FPP<sup>9</sup>.

yang ketiga mengkloning sitokrom p450 untuk menghasilkan asam artemisin yang nantinya menjadi bahan untuk produksi Artemisinin<sup>10</sup>

Untuk meningkatkan produksi FPP di *Saccharomyces cerevisiae*, ekspresi beberapa gen yang bertanggung jawab untuk regulasi FPP sintesis, dan satu gen yang bertanggung jawab menurunkan regulasi untuk konversi FPP untuk sterol. Yang pertama dilakukan reaksi dalam biosintesis artemisinin dikatalisis oleh ADS10, yang telah ditandai dan digunakan untuk de novo produksi amorphadiene di

*Escherichia coli*<sup>11</sup>. Untuk menguji perbaikan dalam produksi FPP, kami menyatakan ADS di bawah kendali promotor GAL1 pada plasmid pRS425 (vector yang dimasukan gen ADS).<sup>10</sup>



Gambar 4. Hasil Amorphadiene pada *Saccharomyces cerevisiae* strain hingga 24 jam.

Pada gambar di atas menunjukkan bahwa produksi Amorphadiene semakin banyak dihasilkan seiring dengan pertambahan waktu. Amorphadiene banyak dihasilkan pada strain *Saccharomyces cerevisiae* dan langkah pertama yang dilakukan untuk membuat strain yang menghasilkan asam artemisin ini. Dengan cara mengisolasi gen yang mengkode enzim yang bertanggung jawab untuk mengoksidasi Amorphadiene untuk asam artemisin pada *Artemisia annua* L.<sup>10</sup>

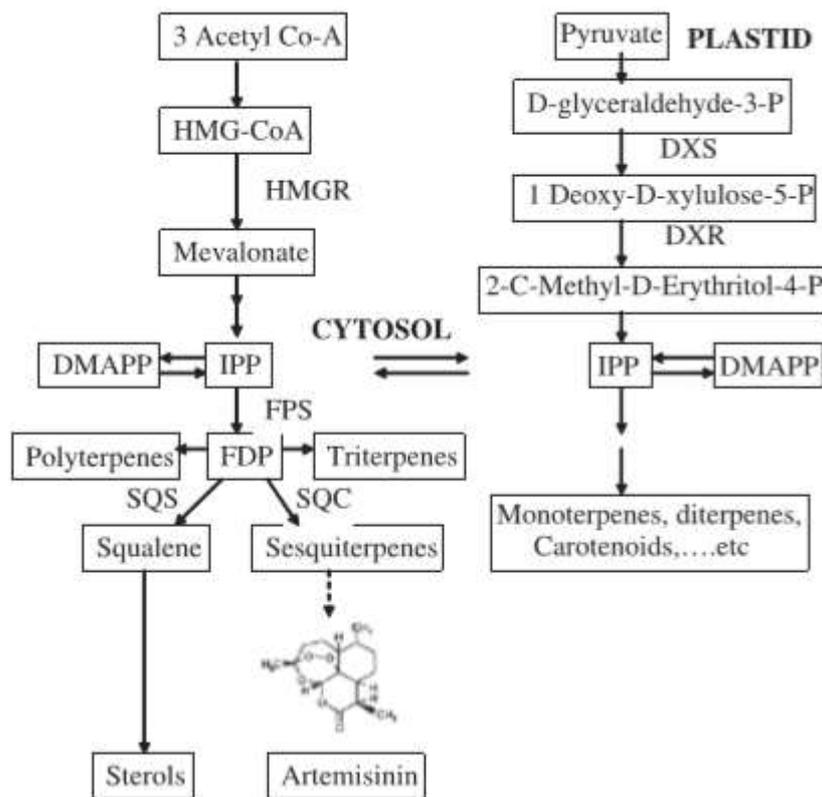
karena Artemisin adalah lakton derivatif yang sangat luas dan memiliki

karakteristik metabolit sekunder pada *Astreaceae*. Sehingga kemungkinan besar akan berbagi enzim dalam biosintesis lakton seskuiterpen dan melakukan genomik komparatif tanaman dalam keluarga *Astreaceae*<sup>3,10</sup>

### PEMBAHASAN

Enzim Amorphadiene synthase merupakan enzim yang

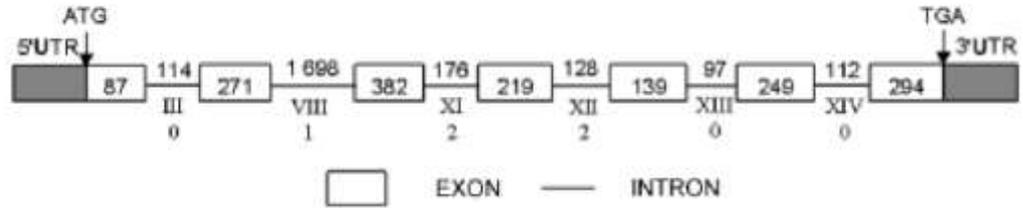
digunakan dalam biosintesis Amorphadiene untuk menghasilkan senyawa Artemisinin yang berasal dari FPP. Karena FPP ini selain sebagai bahan yang digunakan untuk menghasilkan Artemisinin, digunakan juga untuk membuat sterol pada jalur biosintesis lain dapat dilihat pada gambar 4<sup>11</sup>.



Gambar 4. Biosintesis produksi senyawa Artemisinin dan sterol

Sehingga dalam perlakuannya jumlah enzim ini harus diperbanyak dari jumlah alamnya yang mengakibatkan semakin banyaknya FPP yang digunakan untuk produksi Artemisinin<sup>4,11</sup>.

Enzim ini memiliki urutan genomic awal yang dapat dimodifikasi untuk peningkatan jumlahnya yang dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Urutan genomic enzim Amorpha -4,11 diene synthase.

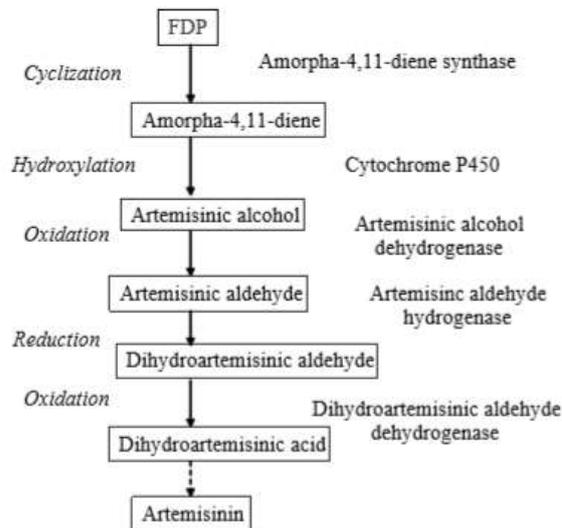
Pada beberapa penelitian menyebutkan bahwa rekayasa gen Amorpha -4,11 diene synthase 1 yaitu dengan merkeley urutan asam aminonya sehingga dapat mempengaruhi jumlah produksi enzim ADS ini dapat dilihat pada gambar 5.

|            |  |    |
|------------|--|----|
| WALLT-ADS  | malteekpirpianfppaisgdqfliyqkqveqgveqivndlkkevrqlkealdipmkhanlklidei | 70 |
| MERCKE-ADS | malteekpirpianfppaisgdqfliyqkqveqgveqivndlkkevrqlkealdipmkhanlklidei | 70 |
| CRANG-ADS  | malteekpirpianfppaisgdqfliyqkqveqgveqivndlkkevrqlkealdipmkhanlklidei | 70 |
| LIU-ADS    | malteekpirpianfppaisgdqfliyqkqveqgveqivndlkkevrqlkealdipmkhanlklidei | 70 |

Gambar 5. Perbandingan urutan asam amino *ads1* dengan ADS dan strain lainnya.

selain itu dalam pengembangannya bahwa selain digunakan bakteri E coli untuk menghasilkan enzim Amorpha -4,11 diene synthase ini. Digunakan juga ragi yaitu *saccharomyces cerevisiae* yang dapat menghasilkan senyawa Asam Artemisinin<sup>12</sup>

Karena dalam jalur biosintesi pembuatan Artemisinin ini terdapat senyawa intermediet berupa Asam Artemisinin namun tetap dibuat oleh enzim Amorpha -4,11 diene synthase yang dapat dilihat pada gambar 6<sup>4</sup>



Gambar 6. Jalur biosintesis Artemisinin.

Sehingga dalam produksinya jika enzim ini jumlahnya bertambah maka jumlah Asam Artemisinin bertambah juga dan berakibat pada meningkatnya jumlah senyawa Artemisinin yang diproduksi.

## SIMPULAN

Senyawa Artemisin dapat dihasilkan dengan merekayasa enzim Amorpha -4,11 Diene synthase sebagai enzim untuk menghasilkan Amorphadiene (senyawa intermediet dalam produksi Artemisinin).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Imam Adi Wicaksono, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing atas kritik, saran, dan kesediaannya dalam menelaah artikel ini.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Dondorp AM, Fairhurst RM, Slutsker L, Macarthur JR, Breman JG, et al. The threat of artemisinin-resistant malaria. *New England J Med*. 2011. 365: 1073–1075.
2. 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 Lett* 580: 1411–1416.
3. Fulong Liao. Discovery of Artemisinin Qinghaosu Molecules, 2009. 15: 5362-5366
4. Bouwmeester HJ, Wallaart TE, Janssen MH, van loo V, Jansen BJ, Posthumus MA et al.. Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the

- first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 2006. 52, 843–854
5. Zhen-Qiu Li, Yan Liu, Ben-Ye Liu, Hong Wang, HE-Chun Ye and Guo-Feng Li. Cloning, *E. coli* Expression and Molecular Analysis of Amorpha-4,11-Diene Synthase from a High-Yield Strain of *Artemisia annua* L. *Journal of Integrative Plant Biology* 2006, 48 (12): 1486–1492
  6. Wallaart TE, Pras N, Beekman AC, Quax WJ. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: Proof for the existence of chemotypes., 2000. *Planta Med* 66, 57–62.
  7. Sarah Picaud, Mikael E Olsson and Peter E Brodelius. Improved conditions for production of recombinant plant sesquiterpene synthases in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2007. 51 : 71-79.
  8. Priya Nair, Amita Misra, Vikrant Gupta and Shasany. Differentially Expressed Genes during Contrasting Growth Stages of *Artemisia annua* Artemisinin Content. *Biochem Biophys*. 2013. Vol 8: 4
  9. Mercke, P., Bengtsson, M., Bouwmeester, H. J., Posthumus, M. A. & Brodelius, P. E. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000. 381, 173–180.
  10. Dae-kyun, Eric M. Paradise and Mario Ouellet. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature publishing group*, 2006. Vol 44
  11. Liu B, Wang H, Du Z, Li G, Ye H. Metabolic engineering of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Rep*. 2011. 30: 689–694.
  12. Picaud S, Olofsson L, Brodelius M, Brodelius P. Expression, purification, and characterization of recombinant amorpha-4,11-diene synthase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys* . 2006. 436, 215–226