

EVALUASI KERAGAMAN GALUR MUTAN ARTEMISIA HASIL IRADIASI GAMMA

Ragapadmi Purnamaningsih¹⁾, E.G. Lestari¹⁾, M. Syukur²⁾
dan Rossa Yunita¹⁾

¹⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi
dan Sumberdaya Genetik Pertanian
E-mail : raga_padmi@yahoo.com

²⁾Institut Pertanian Bogor

Diterima 19 Mei 2010; disetujui 28 Januari 2011

ABSTRAK

EVALUASI KERAGAMAN GALUR MUTAN ARTEMISIA HASIL IRADIASI GAMMA. Serangan penyakit malaria di Indonesia terus meningkat. Di lain pihak, penyebab penyakit ini yaitu *Plasmodium falciparum* telah resisten terhadap obat malaria yang selama ini digunakan. Artemisinin, dari tanaman artemisia telah diteliti dapat mengendalikan malaria. Permasalahan yang dihadapi adalah kandungan artemisinin dari *Artemisia annua* yang ditanam di Indonesia masih sangat rendah, yaitu berkisar 0.1 - 0.5 %. Peningkatan keragaman genetik artemisia dengan menggunakan iradiasi sinar gamma merupakan metode alternative untuk mengatasi masalah tersebut. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan induksi mutasi pada biji artemisia dengan dosis 10-100 Gy. Planlet hasil iradiasi yang mempunyai perakaran yang baik, diaklimatisasi di rumah kaca dan galur mutan yang didapatkan ditanam di Kebun Percobaan Gunung Putri, Balitro dengan ketinggian 1545 m dpl. Sebagai pembanding digunakan tanaman yang berasal dari biji (kontrol biji) dan tanaman dari kultur *in vitro* yang tidak diradiasi (kontrol *in vitro*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa galur-galur mutan memperlihatkan keragaman morfologi, antara lain tinggi tanaman, bentuk daun, umur berbunga. Galur mutan umumnya berbunga lebih lambat dibandingkan tanaman kontrol. Sepuluh galur mutan telah terseleksi berdasarkan bobot basah dan bobot kering tanaman yang kemudian di analisis kandungan artemisininnya. Hasil penelitian menunjukkan kandungan artemisinin dari galur mutan bervariasi antara 0.44 - 1.41%, sedangkan kandungan artemisinin dari tanaman kontrol *in vitro* adalah 0.43%.

Kata kunci : *Artemisia annua* L, artemisinin, induksi mutasi, galur mutan

ABSTRACT

EVALUATION OF ARTEMISIA MUTANT LINES CONDUCTED FROM GAMMA IRRADIATION TREATMENT. Cases of Malaria diseases attack in Indonesia has been increasing. *Plasmodium falciparum* the cause of malaria disease is now resistant to the usual medicine. One of malaria medicine which recommended by WHO is artemisinin compound extracted from *Artemisia annua* L plant. Low artemisinin content is one problem of Artemisia development in Indonesia. Increasing genetic variation using gamma irradiation is one alternative method to improve artemisinin content. In 2007, induce mutation had been done to artemisia seeds using gamma irradiation at dosage of 10-100 Gy. The good rooting planlet was regenerated and acclimatized in the green house, and then the seedling (M0 generation) was planted in the field at 1545 m asl. Plants derived from seeds without gamma irradiation treatment and cultured *in vitro* (*in vitro* control) were used as control. The result showed there were some morphological variations between the mutant lines (plant height, shape of the leaves and time of flowering). Ten mutant lines were selected based on biomass yield and analyzed for the artemisinin content. The result showed that artemisinin content of the mutant lines ranged from 0.44 - 1.41%, and it was significantly higher than that of *in vitro* control (0.43%).

Key words : *Artemisia annua* L, artemisinin, induced mutation, mutant lines

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang sangat ganas di Indonesia dan negara lainnya, khususnya di Asia dan Afrika. Penyakit ini disebabkan oleh *Plasmodium spp* yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles spp*. Peningkatan kasus serangan penyakit malaria meningkat dari waktu ke waktu karena sampai saat ini belum ditemukan vaksinnnya. Di Indonesia, jumlah kasus yang terjadi pada tahun 1967 sebanyak 16.000 kasus per juta penduduk, pada tahun 2001 meningkat menjadi 31.000 kasus [1].

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa parasit malaria seperti *Plasmodium falciparum* (penyebab malaria tropika) telah resisten terhadap obat malaria, di antaranya dari tanaman kina yang telah digunakan lebih dari 20 tahun, sehingga perlu pengembangan obat alternatif anti malaria lainnya.

Artemisia annua L merupakan tanaman subtropis yang berasal dari daerah Cina dan tersebar ke Vietnam dan Malaysia. Kandungan utama dari tanaman ini yaitu artemisinin, merupakan salah satu alternatif obat malaria yang telah digunakan di berbagai negara, terutama Afrika dan Asia. Saat ini obat malaria *artemisinin combination based therapy* (ACT) yang direkomendasikan WHO masih diimpor. Setiap tahun kebutuhan akan obat malaria di Indonesia sangat tinggi, sehingga diperlukan dana yang sangat besar untuk memenuhi kebutuhan obat-obatan tersebut. Untuk itu perlu upaya pengembangan obat malaria dengan bahan baku dari dalam negeri.

Beberapa negara Asia seperti Vietnam, Cina dan Jepang telah mengembangkan tanaman artemisia di lahan dataran tinggi secara luas sehingga memiliki kemandirian dalam penyediaan obat malaria. Akan tetapi Indonesia ternyata masih dalam uji coba pada luasan terbatas, padahal Indonesia merupakan salah satu negara dengan jumlah penderita malaria yang tergolong tinggi.

Artemisia Annua L mempunyai nilai ekonomi yang tinggi, selain sumber artemisinin, juga sumber minyak atsiri

esensial [2]. Menurut [3], artemisinin merupakan produk metabolit sekunder yang memiliki kemampuan sebagai obat antimalaria tanpa menimbulkan efek samping yang berat seperti pada kina atau klorokuin. Penggunaan artemisinin telah dipromosikan oleh organisasi internasional seperti Medicines Sains Frontiers (MSF) [4]. Selain dipergunakan sebagai obat, artemisinin juga memiliki aktivitas fitotoksin sehingga dapat dimanfaatkan sebagai herbisida alami [5, 6].

Artemisinin diperoleh dengan cara mengekstrak daun atau batang tanaman *Artemisia sp*. Senyawa tersebut merupakan kelompok *sesquiterpen lakton* dengan jembatan *endoperoksida* yang jarang ditemui di alam. Artemisinin merupakan senyawa yang sulit untuk disintesis, maka cara yang paling mudah dan murah untuk memperoleh artemisinin adalah dengan mengekstraknya langsung dari tanaman [2].

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan tanaman artemisia di Indonesia adalah kandungan artemisinin dari varietas yang ditanam, sangat rendah yaitu berkisar 0,01 - 0,5% sehingga belum banyak dikembangkan secara komersial. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, perlu dilakukan penelitian perbaikan genetik tanaman untuk menghasilkan varietas dengan sifat unggul yaitu memiliki biomasa dan kandungan artemisinin yang lebih tinggi.

Teknik mutasi dalam pemuliaan tanaman dapat meningkatkan keragaman genetik sehingga memungkinkan pemulia melakukan seleksi genotipe tanaman sesuai dengan tujuan yang dikehendaki. Proses mutasi alami biasanya terjadi sangat lambat sehingga perlu bahan mutagen untuk menginduksi frekuensi, kecepatan dan spektrum mutasi tanaman. Salah satu mutagen yang saat ini banyak digunakan adalah mutagen radioaktif dengan energy tinggi. Bahan ini dihasilkan melalui suatu proses reaksi nuklir didalam reactor nuklir [7].

Semula para pakar dan peneliti pemulia tanaman menganggap bahwa

mutasi induksi merupakan suatu tehnik pemuliaan yang kurang diperhatikan. Namun seiring dengan berkembangnya bioteknologi, maka mutasi induksi dianggap sebagai terobosan yang menjanjikan khususnya dalam program pemuliaan tanaman yang berbiak secara vegetatif. Teknik tersebut dapat mempercepat diperolehnya varietas baru yang bermanfaat bagi perkembangan dunia usaha. Dengan memanfaatkan teknik mutasi terinduksi hingga tahun 2010 Indonesia telah menghasilkan 15 varietas mutan padi, 5 mutan kedelai, 1 mutan kacang hijau dan 1 mutan kapas [8]. Jumlah varietas mutan yang dihasilkan di dunia mencapai 2.252 kultivar, 1.585 kultivar diperoleh langsung melalui teknik pemuliaan mutasi dan seleksi pada turunan selanjutnya. Jumlah varietas mutan yang dilepas di beberapa kawasan dunia adalah Afrika 48, Asia 1.142, Australia 7, Eropa 800, Amerika Selatan 48 dan Amerika Utara 160 [9]. Mutasi dapat meningkatkan produksi di antaranya pada tanaman *Carica papaya* [10], *Colocacia esculenta* Schott [11], dan *Gossypium* sp [12]. Induksi mutasi juga dapat meningkatkan kandungan minyak atsiri dan metabolit sekunder seperti pada tanaman *Glycine max* L. [13], *Helianthus annuus* [14] dan *Ricinus communis* [15]. Dengan demikian teknologi mutasi induksi ini dapat sebagai alternatif diterapkan pada tanaman *Artemisia annua* untuk mendapatkan varietas dengan kandungan metabolit sekunder artemisinin yang tinggi.

Tujuan penelitian ini adalah meningkatkan keragaman genetik *Artemisia annua* melalui penerapan teknik induksi mutasi, dan diharapkan diperoleh tanaman artemisia dengan kandungan artemisinin > 0.5%.

METODOLOGI

Bahan dan metoda

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan

Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian dan Kebun Percobaan Gunung Putri Balitro di Cipanas, dari bulan April 2008-Februari 2009. Bahan tanaman yang digunakan adalah 25 galur mutan artemisia hasil mutasi dengan iradiasi sinar gamma berasal dari penelitian sebelumnya. Pada tahun 2007 telah dilakukan induksi mutasi pada biji artemisia yang berukuran sangat kecil. Induksi mutasi dilakukan pada biji yang sudah disterilkan, dengan dosis iradiasi 10 - 100 Gy. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa biji dengan perlakuan iradiasi dosis lebih tinggi dari 80 Gy tidak dapat tumbuh, sedangkan biji yang tumbuh baik adalah biji dengan perlakuan iradiasi kurang dari 60 Gy. Sebagai kontrol digunakan biji yang tidak diberi perlakuan iradiasi. Biji dengan perlakuan iradiasi dan biji tanpa perlakuan iradiasi (kontrol *in vitro*) diregenerasikan menjadi planlet dan diperoleh 25 galur hasil mutasi sebagai bahan yang digunakan dalam penelitian ini. Penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu 1) aklimatisasi planlet di rumah kaca dan 2) penanaman genotipe mutan generasi M0 di lapang.

1. Aklimatisasi planlet di rumah kaca

Planlet hasil mutasi dengan visual yang baik yaitu sistim perakaran sempurna, serta planlet tanpa perlakuan iradiasi (kontrol *in vitro*) diaklimatisasi di rumah kaca. Media aklimatisasi planlet adalah tanah dicampur dengan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1. Tanaman disungkup dengan gelas plastik sampai 2 -3 minggu dari penanaman. Setelah tanaman sudah cukup tegar, maka sungkup dibuka.

2. Penanaman di lapang

Bibit di rumah kaca (generasi M0) yang telah berumur \pm 2 bulan ditanam di kebun percobaan Gunung Putri, pada ketinggian tempat 1545 mdpl. Galur mutan yang ditanam sebanyak 25 galur. Sebagai pembanding (kontrol) digunakan tanaman asal kultur *in vitro* yang tidak diradiasi (kontrol *in vitro*) dan tanaman asal biji

(kontrol biji). Tanaman ditanam dalam polybag yang telah diisi 30 kg tanah + pupuk kandang. Peubah yang diamati adalah tinggi tanaman, bentuk daun, warna daun, umur berbunga dan kandungan artemisinin. Penanaman di lapang bertujuan untuk mengamati keragaman pada populasi yang ada.

Apabila tanaman di lapang sudah berbunga 10%, maka tanaman dipanen. Pemanenan dilakukan dengan cara memotong seluruh bagian tanaman, kemudian dipisahkan antara bagian batang dan daun. Batang dan daun yang telah dipisahkan dikeringkan, kemudian ditimbang bobot kering batang dan daun.

Kandungan artemisinin dilakukan menggunakan analisis HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), yang dilakukan sebagai berikut :

a. Ekstraksi

Contoh dikeringkan hingga mencapai berat konstan. Contoh yang sudah kering dihaluskan dengan mortar. Limapuluh mg berat kering contoh kemudian diekstraksi dengan 2 ml Toluena dan disaring dengan menggunakan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam flakon.

b. Analisis Kuantitatif

Analisis artemisinin secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan HPLC. Mula-mula Artemisinin dihidrolisis di dalam larutan alkalin dan kemudian diukur pada panjang gelombang 260 nm. Prosedur dari analisis secara kuantitatif ini adalah sebagai berikut : hasil ekstraksi dengan toluena diambil 500 µl kemudian diuapkan/dikeringkan, residu yang tertinggal dilarutkan kembali dalam 200 µl metanol. Selanjutnya 800 µl larutan NaOH (0,2 % w/v) ditambahkan dan campuran yang terbentuk diagitasi dengan vortex dan dipanaskan ke dalam *waterbath* selama 30 menit pada suhu 50°C. Setelah dingin ditambah 200 µl metanol dan 800 µl asam asetat 0,2 M, kemudian dilakukan pengukuran artemisinin dengan HPLC pada panjang gelombang 260 nm menggunakan kolom

Licrospher RP-18 panjang 10 cm. Fase gerak yang digunakan adalah Metanol : Kaliumdihidrogenphosphat 0,05 mM (55 : 45), laju aliran 1,3 ml/menit. Waktu retensi berkisar 40 menit. Detektor yang digunakan yaitu detektor absorpsi UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aklimatisasi planlet di rumah kaca

Sebagian besar planlet yang diaklimatisasi dapat tumbuh dengan baik di rumah kaca (Tabel 1). Pada umur 5 minggu setelah aklimatisasi, bibit tumbuh dengan tegar sehingga sungkup dapat dibuka. Selanjutnya bibit ditanam di Kebun Percobaan Gunung Putri, Balitro dan pengamatan dilakukan terhadap keragaan morfologi dan kandungan artemisinin dari masing-masing galur dan tanaman kontrol.

Tabel 1. Jumlah galur mutan yang diaklimatisasi

Dosis radiasi (Gy)	Jumlah galur mutan yang diaklimatisasi	Visual bibit
30	5	normal
40	17	normal
60	1	normal

Keragaman morfologi tanaman di lapang

Pertumbuhan tanaman artemisia di lapangan cukup baik. Pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman dilakukan untuk mengevaluasi adanya variasi yang disebabkan oleh perlakuan iradiasi. Variasi tanaman tampak setelah dua bulan penanaman di lapang.

Galur-galur mutan yang ditanam mempunyai bentuk daun yang berbeda. Daun tanaman kontrol asal kultur *in vitro* (kontrol *in vitro*) juga berbeda antara satu tanaman dengan tanaman lainnya. Beberapa tanaman mempunyai bentuk daun yang tidak terlalu runcing dan jarak antar anak

daun renggang, sedangkan tanaman yang lain mempunyai daun yang berbentuk runcing. Daun tanaman kontrol asal biji (kontrol biji) memiliki bentuk rapat dan tidak terlalu runcing. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi dengan sinar gamma menyebabkan perubahan morfologi tanaman, antara lain bentuk daun. Pada perlakuan kultur *in vitro* tanpa perlakuan iradiasi, juga terjadi keragaman morfologi tanaman, yang diduga disebabkan oleh efek variasi somaklonal karena penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur *in vitro*. Hal

yang sama juga terdapat pada daun dari tanaman hasil mutasi. Keragaman morfologi lainnya dapat diamati pada tinggi tanaman (Tabel 2) dan warna daun, di mana warna daun dari genotipe-genotipe mutan bervariasi antara hijau muda, hijau, hijau tua, dan hijau sangat tua. Hal tersebut sejalan dengan penelitian [16] yang menyatakan adanya perubahan bentuk daun akibat mutasi dengan radiasi sinar gamma pada lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) dan melati [17].

Tabel 2. Tinggi tanaman dari galur mutan di lapang

Dosis Radiasi (Gy)	Klon	Tinggi tanaman (m)
0 I	-	2.2
0 B	-	1.7
30	15	2.5
30	28	2.1
30	61	2.1
30	62	2.5
30	65	2.0
40	21	2.2
40	27	2.6
40	33	2.3
40	41	2.0
40	42	2.6
40	43	2.3
40	47	2.5
40	49	2.2
40	52	2.3
40	66	2.3
40	67	2.2
40	68	1.9
40	69	1.0
40	70	1.0
40	71	2.2
40	72	2.2
40	73	2.1
60	34	1.9

Keterangan : 0 I : kontrol in vitro
 0 B : kontrol biji

Pengamatan pada umur pembungaan menunjukkan bahwa pada 4 bulan setelah tanam, tanaman kontrol dari biji sudah berbunga (100%). Pada umumnya galur mutan berbunga pada umur 7 bulan setelah tanam. Sepuluh galur berbunga pada umur yang lebih lambat yaitu 8 dan 9 bulan setelah tanam. Pada tanaman yang lambat berbunga tersebut diharapkan produksi daun dan trikoma penghasil artemisinin sudah optimal.

Data hasil panen disajikan pada Tabel 3. Seleksi tanaman dilakukan dengan memilih genotipe-genotipe yang mempunyai

bobot basah dan bobot kering lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol untuk kemudian dianalisis kandungan artemisininnya. Dari hasil seleksi terpilih 10 genotipe mutan, yaitu klon 30(28), 30(61), 30(62), 30(65), 40(21), 40(43), 40(47), 40(49), 40(66) dan 40(72).

Hasil analisis kandungan artemisinin dari 10 galur terpilih disajikan pada Tabel 4. Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa kandungan artemisinin dari galur terpilih berkisar antara 0.44 - 1.41%. Kandungan artemisinin tertinggi diperoleh dari galur 30(62) dengan kandungan artemisinin 1.41%

Tabel 3. Bobot basah dan bobot kering genotipe somaklon

Dosis Radiasi (Gy)	Klon	Bobot basah (g)			Bobot kering (g)		
		Batang	Daun	Total	Batang	Daun	Total
OI	-	1977.1	1670.7	3647.9	1027.0	477.6	1504.6
OB	-	1480.0	2000.0	3480.0	509.2	500.0	1009.2
30	15	365.3	387.4	695.7	162.4	121.1	259.03
30	28	2017.5	1376.3	3393.8	717.5	402.0	1734.8
30	61	2195.0	1075.0	3270.0	1465.0	415.0	1880.0
30	62	2554.0	1668.0	4222.0	1194.0	442.0	1636.0
30	65	2118.0	1106.0	1090.0	1232.0	362.0	1594.0
40	21	2111.4	1520.7	3632.1	1171.4	559.3	1730.7
40	27	1002.0	970.0	1972.0	515.6	320.6	836.2
40	33	1908.6	1242.9	3151.4	935.7	437.7	1370.4
40	41	2225.0	1185.0	3410.0	1050.0	370.0	1420.0
40	42	1522.5	830.0	2352.5	655.0	262.5	917.5
40	43	2600.0	2240.0	4840.0	1275.0	400.0	1675.0
40	47	2360.0	1170.0	3530.0	1330.0	340.0	1910.0
40	49	2500.0	1435.0	3935.0	1240.0	395.0	1635.0
40	52	1822.9	1060.0	2882.9	846.4	306.4	1152.9
40	66	1835.0	1210.0	3045.0	809.3	319.3	1520.0
40	67	2063.3	1150.0	3213.3	840.0	250.0	1090.0
40	68	1508.6	901.43	2410.0	825.7	305.7	1131.4
40	69	1280.0	760.0	2040.0	620.0	200.0	820.0
40	70	883.3	983.3	1866.7	489.7	340.2	829.8
40	71	1063.3	976.7	2040.0	654.7	357.0	1011.7
40	72	1883.3	1860.0	3743.3	931.3	418.3	2024.9
40	73	1267.5	1122.5	2390.0	697.0	314.0	1011.0
60	34	1787.5	1080.0	2867.5	845.0	380.1	1417.5

Keterangan : O I : kontrol in vitro
 O B : kontrol biji

dan terendah diperoleh dari genotype 40(43) dengan nilai kandungan artemisinin 0.44%, akan tetapi masih lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan artemisinin tanaman kontrol (0.43%).

morfologi tanaman, antara lain tinggi tanaman, bentuk daun, warna daun, dan umur panen. Sebanyak 10 galur mutan telah terseleksi memiliki bobot basah dan bobot kering tanaman lebih tinggi dibanding

Tabel 4. Kandungan artemisin genotipe artemisia terpilih

Dosis radiasi (Gy)	No.Klon	Bobot kering (g)	Kandungan artemisinin (%)	Rendemen (g)
0 I	-	1504.7	0.43	6.47
0 B	-	1009.2	0.50	5.05
30	28	1734.5	0.92	15.96
30	61	1880	0.75	14.10
30	62	1636	1.41	23.07
30	65	1594	0.58	9.25
40	21	1730.7	0.50	8.65
40	43	1675	0.44	7.37
40	47	1910	0.88	16.81
40	49	1635	0.67	10.95
40	66	1520	0.54	8.21
40	72	2024.9	0.56	11.34

Keterangan : 0 I : kontrol in vitro
 0 B : kontrol biji

Berdasarkan hasil bobot kering dan kandungan artemisinin dari masing-masing tanaman dapat dihitung nilai rendemen artemisinin dari masing-masing galur dan tanaman kontrol (Tabel 4). Data pada tabel diatas menunjukkan bahwa nilai rendemen dari semua galur terpilih lebih besar dibandingkan dengan tanaman kontrol baik tanaman yang berasal dari biji maupun tanaman kontrol *in vitro*. Nilai rendemen tertinggi yaitu 23.07 g diperoleh dari galur 30 (62). Hal ini menunjukkan pemuliaan mutasi iradiasi telah berhasil untuk meningkatkan produksi artemisinin dari tanaman artemisia.

KESIMPULAN

Penelitian mutasi induksi dengan radiasi sinar gamma menghasilkan 25 galur mutan yang memperlihatkan keragaman

kontrol. Kandungan artemisinin dari sepuluh galur mutan terseleksi bervariasi antara 0.44 - 1.41%, sedangkan kandungan artemisinin dari tanaman kontrol in vitro adalah 0.43%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. Tanaman artemisia penakluk penyakit malaria. Kompas, 20 April 2006.
2. SIMON, J.E., CHARLES, D., CEBERT, E., GRANT, L., JANICK, J. and WHIPKEY, A. Artemisia annua L.: Promising Aromatic and Medicinal, *In* : Advances in New Crops, (J. JANICK and J.E. SIMON, Eds.). Timber Press, Portland, OR., 522-526 (1990).

3. KLAYMAN, D.L. Quinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, **228**, 1049-1055 (1985).
4. TRESNANINGSIH, E. "Balitbangkes Depkes Tengah Mengembangkan Obat Malaria Baru", Balitbangkes Depkes, Jakarta (2006).
5. DUKE, S.O., VAUGHN, K.C., CROOM, E.M. Jr. and ELSOHLY, H.N., Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is selective phytotoxin, *Weed Sci.*, **35**, 499-505 (1987).
6. CHEN, P.K., LEATHER, G. and POLATNICK, M., Comparative study on artemisinin, 2,4D and glyphosate, *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 991-994 (1991).
7. Kelompok Pemulia Tanaman. Mutasi dalam pemuliaan tanaman. <http://www.batan.go.id/p3tir/pertanian/pemuliaan/pemuliaan.htm> (2005).
8. Anonim. Pertemuan BATAN - KATN ke II Tahun 2009. <http://www.batan.go.id/>
9. MALUSZYNKI, M., NICTERLEIN, K., VAN ZANTEN, L. and AHLOOWALIA, B.S., 2000. Officially released mutants varietas, The FAO/IAEA database, *Mutation Breeding Newsl.*, **12**, 1-83 (2000).
10. RAM, M. and MAJUMDAR, P.K., Dwarf mutant of papaya (*Carica papaya*) induced by gamma rays, *J. Nucl. Agric. Biol.*, **10** (3), 72-74 (1981).
11. VASUDEVAN, K. and JOS, J., Gamma ray induced mutation in Colocasia, *Mutation Breeding Newsl.*, **32**, 4-5 (1988).
12. MOHR, B.R., Gossypium sp. list of new mutant cultivars, *Mutation Breeding Newsl.* **45**, 37 (1996).
13. KITAMURA, K., Spontaneous and induced mutation of seed protein in soybean (*Glycine max.* L. Merrell), Plant Mutation Breeding in Asia, China, 109-121 (1996).
14. ELANGO VAN, M., Gamma radiation induced mutant for improved yield components in sunflower, *Mutation Breeding Newsl.*, **45**, 28-29 (2001)
15. GANESAN, K., JAVAL HUSSAIN, H.S. and VINDHIYAVARAMAN, Induced mutation in castor, *Mutation Breeding Newsl.*, **45**, 31 (2001).
16. MAYASARI, I.G.A.D.P., "Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma Terhadap Keragaman Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K. Schum.)", Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 23 (2007).
17. RATNASARI, "Evaluasi Keragaman Fenotipe Melati (*Jasminum* spp.) Hasil Iradiasi Berulang Sinar Gamma, Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, IPB, Bogor, 28 (2007).