

INDUKSI SENYAWA ALKALOID PADA DAUN TANAMAN KEMUKUS (*Piper cubeba* L.) MELALUI KULTUR JARINGAN

Yelnititis¹, Sri Yuliani dan Sitti Fatimah Syahid

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

ABSTRAK

Kemukus (*Piper cubeba* L.) termasuk salah satu tanaman obat yang banyak digunakan dalam industri jamu, makanan dan farmasi. Kemungkinan untuk mendapatkan senyawa sekunder dari kalus yang berasal dari eksplan daun melalui kultur *in vitro* telah dilakukan di Laboratorium Kultur jaringan dan Laboratorium Fisiologi Hasil Balai Penelitian Tanaman rempah dan Obat (Balitro) Bogor dari bulan Juni 1996 sampai bulan April 1997. Penelitian terdiri dari inisiasi kalus, pertumbuhan kalus dan analisa senyawa sekunder piperin. Media dasar yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan sukrosa 30 g/l dan agar 8 g/l dan vitamin group B. Pada inisiasi kalus diberikan perlakuan dengan penambahan BA (1.0, 3.0 dan 5.0 mg/l) pada media yang telah mengandung NAA 0.1 mg/l, dan pada pertumbuhan kalus diberikan 2,4-D (0, 0.5, 1.0 dan 1.5 mg/l) serta kombinasi dengan NAA (0 dan 0.1 mg/l). Analisa senyawa sekunder dilakukan dengan metode Spectrophotometer U.V. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dengan penambahan NAA 0.1 mg/l + BA 5.0 mg/l merupakan media terbaik untuk inisiasi kalus. Rata-rata pertambahan berat kalus tertinggi (10.60 gram) diperoleh dari perlakuan NAA 0.1 mg/l + BA 5, mg/l yang berbeda nyata dengan perlakuan lain. Kadar alkaloid piperin paling tinggi (0.041%) diperoleh pada

perlakuan BA 5 mg/l + 2,4-D 1.5 mg/l. Penampakan biakan secara visual yang terbaik diperoleh dari perlakuan BA 5 mg/l + NAA 0.1 mg/l dengan kalus hijau segar, keing dan rapuh.

Kata kunci : Piperin, kemukus, *Piper cubeba*, kultur *in vitro*

*Induction Of Alkaloid Piperin Compound
On Tail Pepper
Leaf Through Tissue Culture*

ABSTRACT

Piper cubeba L. is one of medicinal crops that is used in jamu industry, foods and pharmacy. The possibility to produce secondary metabolites from callus-derived leaf through *in vitro* culture has been carried out at Tissue Culture and Post Harvest Physiology Laboratories, Research Institute for Spice and Medicinal Crops (RISMC) Bogor from June 1996 to April 1997. The experiment was carried out in three stages: (1) callus initiation, (2) callus growth and (3) analysis secondary compound of piperin. Basal medium used was Murashige and Skoog (MS) enriched with vitamin of group B, sucrose 30 g/l and agar 8 g/l. For callus initiation BA (1.0, 3.0 and 5.0 mg/l) was added to medium that already content NAA 0.1 mg/l, for callus growth 2,4-D (0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg/l) was added and combined with NAA 0 and 0.1 mg/l. Secondary metabolites

¹ Alamat sekarang : Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan Yogyakarta

was analysed using Spectrofotometry U.V. method. The result showed that the treatment with NAA 0.1 mg/l + BA 5 mg/l was the best medium for callus initiation. The highest mean of callus weight was 10.60 gr obtained from NAA 0.1 mg/l + BA 5 mg/l treatment. The best visual performance was also shown by treatment with BA 5 mg/l + NAA 0.1 mg/l with green callus, fresh and friable. The highest alkaloid piperin content (0.041 %) was shown by treatment with 2,4-D 1.5 mg/l + BA 5 mg/l is.

Keywords : Piperin, tail pepper, Piper cubeba, in vitro culture

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini penggunaan obat dari famili piperaceae seperti kemukus dan cabe jawa dalam industri jamu terus meningkat. Kemukus (*Piper cubeba* L.) termasuk salah satu tanaman obat yang banyak manfaatnya (Farida, 1986) dan memiliki kandungan alkaloid yaitu piperin dari golongan piridin. Buahnya dapat dijadikan sebagai obat asma, radang selaput lendir, sakit perut dan disentri. Tanaman ini juga dapat digunakan sebagai antiseptik dan anti virus, serta dapat dipakai sebagai salah satu bahan penghasil senyawa sekunder seperti minyak atsiri yang banyak digunakan dalam industri minyak wangi, makanan dan farmasi (Nurdjannah, 1990). Piperin merupakan alkaloid yang mempunyai aktifitas sebagai perangsang minuman keras, insektisida dan antraktan lalat yang bersifat lebih toksik dari pada piretrum (Windholz *et al.*, 1983).

Alkaloid dalam tanaman terdapat pada berbagai bagian seperti pada biji, bunga (Valpuesta, 1995), buah, batang, daun (Wink *et al.*, 1995, O'Dowd *et*

al., 1995), akar rimpang dan kulit. Norton *et al.*, (1985) dan Ketel (1985) menyatakan bahwa jaringan yang berbeda menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah yang berbeda pula.

Bagian yang dimanfaatkan dari tanaman kemukus ini adalah buahnya. Buah kemukus semakin langka/jarang ditemukan karena petani enggan menanam kemukus karena buah baru dihasilkan setelah tanaman berumur 3 tahun (Komoditas, 1999). Hasil penelitian Yuliani *et al.* (1993) menunjukkan bahwa dari buah kemukus diperoleh alkaloid piperin dengan kadar 0.17 - 0.24 %. Salah satu alternatif dalam penyediaan bahan baku piperin adalah dengan memanfaatkan daun yang selama ini terbuang begitu saja.

Salah satu aplikasi teknik kultur jaringan adalah dalam produksi senyawa sekunder. Beberapa keuntungan dari penggunaan teknik kultur jaringan antara lain adalah tidak tergantung pada musim, bahan baku yang dibutuhkan sedikit dan dapat diperbanyak sewaktu-waktu. Penggunaan teknik kultur jaringan untuk menghasilkan senyawa sekunder dari tanaman tinggi telah lama dikenal. Menurut Benavides dan Caso (1993) jumlah dan kualitas senyawa sekunder yang dihasilkan melalui kultur *in vitro* berbeda dengan yang dihasilkan oleh tanaman asal. Selanjutnya Gati *et al.* (1993) menyatakan bahwa melalui teknik kultur jaringan dapat dihasilkan senyawa sekunder dengan jumlah yang jauh lebih tinggi. Isolasi senyawa sekunder secara *in vitro* dapat dilakukan dengan beberapa cara antara

lain melalui kultur kalus (Mantell *et al.*, 1985) atau kultur sel (Yamada and Fujita, 1983).

Pada tanaman kemukus umumnya produksi senyawa sekunder berasal dari buah. Penelitian untuk menginduksi senyawa sekunder melalui kalus yang berasal dari eksplan daun belum banyak dilaporkan. Di negara-negara berkembang seperti Amerika, Jepang dan Perancis penelitian dan produksi senyawa sekunder melalui kultur *in vitro* sudah berkembang pesat. Pertumbuhan kalus dapat diinduksi dengan penambahan zat pengatur tumbuh auksin dan kombinasi dengan sitokinin ke dalam media tumbuh. NAA dan 2,4-D merupakan auksin yang sangat efektif digunakan untuk inisiasi dan pertumbuhan kalus (Banthorpe *et al.*, 1988). Selain itu penambahan sitokinin yang dikombinasikan dengan auksin juga sering dilakukan untuk mempercepat proses pembelahan sel (Arrilaga *et al.*, 1994; Roja dan Heble, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan formulasi media yang cocok untuk inisiasi kalus, pertumbuhan kalus dan untuk melihat kemungkinan adanya senyawa sekunder piperin dari kalus yang berasal dari eksplan daun tanaman kemukus.

BAHAN DAN METODA

Percobaan dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Fisiologi Hasil Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor, dari bulan Juni 1996 sampai bulan April 1997.

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah potongan daun kemukus yang berasal dari lapang. Penggunaan daun sebagai eksplan disini lebih ditekankan pada pemanfaatan bagian tanaman yang selama ini tidak digunakan. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan vitamin group B, sukrosa 30 g/l dan agar sebanyak 8 g/l. Percobaan dilakukan dalam tiga tahap yaitu tahap inisiasi kalus, pertumbuhan kalus dan analisa senyawa sekunder piperin.

Inisiasi kalus

Daun yang berasal dari lapang disterilisasi secara bertingkat dengan menggunakan alkohol 70 %, HgCl₂ 0.2 %, klorok 30% dan 20 % dan terakhir dibilas dengan air steril. Daun dipotong-potong dengan ukuran 1 X 1 cm. Selanjutnya eksplan dikulturkan pada media dasar MS dengan penambahan BA (1, 3 dan 5 mg/l) pada media yang sudah mengandung NAA 0.1 mg/l. Pengamatan dilakukan terhadap penampakan kalus secara visual.

Pertumbuhan kalus

Kalus yang dihasilkan dari perlakuan terbaik dari percobaan inisiasi kalus digunakan sebagai eksplan untuk percobaan pertumbuhan kalus. Kalus ditimbang dan dikulturkan pada media MS. Perlakuan yang diuji adalah penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D (0, 0.5, 1.0 dan 1.5 mg/l) dan dikombinasikan dengan NAA (0 dan 0.1 mg/l) pada media yang sudah mengandung BA 5 mg/l. Kalus yang

sudah ditanam pada media perlakuan disimpan pada rak kultur dengan intensitas penyinaran 1000 lux selama 16 jam sehari. Percobaan disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 kali ulangan. Pengamatan dilakukan terhadap pertambahan berat kalus dan penampakan kalus secara visual.

Analisa senyawa sekunder piperin

Kalus yang sudah diperoleh dari berbagai perlakuan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 45° C selama 48 jam sampai kadar air kurang lebih 12 %. Analisa senyawa piperin dilakukan secara kuantitatif dengan Spectrophotometer U.V.

Kalus ditimbang sebanyak 10 gram, dihaluskan dan dimasukkan ke dalam gulungan kertas saring lalu dimasukkan ke dalam soxhlet dan diberi etanol secukupnya, diekstraksi selama 20 jam. Pelarut diuapkan sampai didapatkan residu kental. Residu ditimbang 0.25 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, dilarutkan dengan chloroform sampai 100 ml. Disiapkan larutan standar piperin kemudian diukur sampel dan standar dengan menggunakan spectrophotometer. Kadar piperin ditentukan dengan rumus (AOAC, 1984):

$$\text{Kadar piperin} = \frac{\text{Abs. contoh}}{\text{ppm st}} \times \text{f.p} \times 100\%$$

Keterangan :
 Abs = absorban
 f.p = faktor pengenceran
 ppm st = ppm standar

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi kalus

Hasil percobaan menunjukkan bahwa semua perlakuan dapat membentuk kalus. Kalus mulai terbentuk setelah 14 hari dikulturkan dan berasal dari bagian eksplan yang terluka. Setelah 5 minggu seluruh bagian eksplan sudah tertutup oleh kalus yang terbentuk. Perlakuan media dengan penambahan BA 5 mg/l ke dalam media yang sudah mengandung NAA 0.1 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk inisiasi kalus. Hal ini menunjukkan bahwa NAA konsentrasi rendah dikombinasikan dengan BA 5 mg/l merupakan nisbah sitokinin dan auksin eksogen dengan zat pengatur tumbuh yang terdapat di dalam jaringan sudah cocok untuk inisiasi kalus. Hal yang sama dengan Kothari dan Chandra (1986) bahwa zat pengatur tumbuh NAA dan BA konsentrasi tinggi dibutuhkan untuk induksi kalus dari eksplan daun *Tagetes erecta*.

Struktur dan penampakan kalus yang diperoleh dari perlakuan ini lebih renyah dan berwarna hijau kekuningan. Diduga warna hijau dari kalus disebabkan oleh adanya BA dengan konsentrasi tinggi yang dapat berperan dalam sintesa klorophyll. Kalus dari perlakuan lainnya mempunyai struktur renyah dengan warna kuning kecoklatan dan akhirnya mati. Selanjutnya kalus terbaik yang diperoleh dari percobaan pertama diperbanyak dengan menggunakan perlakuan yang sama sampai jumlahnya mencukupi dan digunakan sebagai eksplan untuk percobaan selanjutnya.

Pertumbuhan kalus

Penambahan berat kalus paling tinggi diperoleh dari perlakuan media MS dengan penambahan NAA 0.1 mg/l ke dalam media yang sudah mengandung BA 5 mg/l yaitu 10.60 yang berbeda nyata dengan perlakuan lain (Tabel 1). Penambahan sitokinin ke dalam media yang sudah mengandung auksin dapat lebih merangsang pertumbuhan kalus (Shenk dan Hildebrant, 1971). Hasil yang sama dari menunjukkan bahwa walaupun BA dapat menginduksi kalus, penambahan NAA ke dalam media yang sudah mengandung BA dapat meningkatkan produksi dan berat kering kalus pada tanaman *Simarouba glauca*. Selanjutnya Zhou *et al.*, (1994) menyatakan bahwa auksin dan sitokinin bekerja secara sinergis dalam menginduksi dan proliferasi kalus tanaman *Cayratia japonica*. Demikian pula dengan O'Dowd *et al.*, (1993) menyatakan bahwa penambahan NAA ke dalam media tumbuh memberikan

produksi kalus lebih tinggi dibanding dengan penggunaan 2,4-D.

Pemakaian 2,4-D dalam konsentrasi 1.5 mg/l pada media yang sudah mengandung BA 5 mg/l menghasilkan rata-rata penambahan berat kalus paling rendah. 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh dengan daya aktif yang tinggi yang biasa digunakan untuk pembelahan sel, namun dalam konsentrasi yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan. Menurut George dan Sherrington (1984), penggunaan 2,4-D dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat bahkan menghentikan proses pembelahan sel pada kalus.

Hasil penelitian Gati dan Mariska (1989) menunjukkan bahwa pemakaian 2,4-D konsentrasi tinggi menurunkan bobot kering kalus pada tanaman *Mentha piperata*. Selanjutnya Gati *et al.*, (1993) juga menyatakan bahwa kombinasi 2,4-D dengan BA menurunkan laju pertumbuhan kalus pada tanaman tempuyung (*Sonchus*

Tabel 1. Pengaruh 2,4-D dan NAA terhadap pertambahan berat dan visual kalus umur 7 minggu.

Table 1. The effect of 2,4-D NAA on callus weight and performances, 7 weeks after culture.

Perlakuan (mg/l)	Berat (g)	Penampakan kalus
BA 5 + 2,4-D 0.0 +	8.65 b	Renyah, putih kehijauan
+ 2,4-D 0.5 +	6.76 bc	Renyah, putih kehijauan
+ 2,4-D 1.0 +	7.28 bc	Renyah, hijau segar
+ 2,4-D 1.5 +	6.53 c	Renyah, putih kehijauan
BA 5 + 2,4-D 0.0 + NAA 0.1	10.60 a	Renyah, hijau segar, kering
+ 2,4-D 0.5 + NAA 0.1	7.60 bc	Renyah, hijau, kering
+ 2,4-D 1.0 + NAA 0.1	7.42 bc	Kompak, hijau
+ 2,4-D 1.5 + NAA 0.1	7.10 bc	Kompak, hijau segar
KK (%)	21.16	

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom tidak berbeda nyata pada Taraf 5 % uji DMRT.

Number followed by the same letter was not significant on 5% DMRT.



arvensis. Sedangkan bila pemakaian 2,4-D dikombinasikan dengan NAA 0.1 mg/l cenderung memberikan hasil yang lebih baik. O'Dowd *et al.* (1993) menyatakan bahwa pemakaian NAA dan 2,4-D dapat meningkatkan produksi kalus pada tanaman *Ephedra*.

Dilihat dari visualnya perlakuan NAA 0.1 mg/l juga memberikan penampilan kalus yang paling baik. Kalus berwarna hijau segar dan kering serta renyah (Tabel 1). Hal ini mungkin disebabkan oleh sitokinin yang dapat meningkatkan sintesa klorophyl pada sel tanaman (George dan Sherrington, 1984).

Analisa senyawa sekunder piperin

Kalus yang dihasilkan dari semua perlakuan dianalisa kandungan piperinnya. Hasil analisa spektrofotometer UV menunjukkan bahwa kandungan alkaloid piperin dapat diperoleh dari semua perlakuan yang diuji. Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 1.5 mg/l tanpa

penambahan NAA dengan pertambahan berat kalus paling rendah menghasilkan kadar piperin paling tinggi yaitu 0.041% (Tabel 2). Pemakaian zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor yang dapat meningkatkan kandungan senyawa sekunder. Seperti dikatakan oleh Meyer dan Staden (1995) bahwa pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh dalam pembentukan/produksi metabolit sekunder berbeda dengan pengaruhnya pada pertumbuhan kalus. Selain itu Benavides dan Caso (1993) menyatakan bahwa kandungan senyawa sekunder yang dihasilkan juga dipengaruhi oleh sumber eksplan yang digunakan.

Peningkatan konsentrasi 2,4-D menjadi 1.5 mg/l diikuti oleh peningkatan konsentrasi senyawa sekunder. Hal yang berbeda dengan penelitian Meyer dan Staden (1995) menunjukkan bahwa produksi metabolit sekunder menurun dengan peningkatan konsentrasi auksin.

Tabel 2. Pengaruh 2,4-D dan NAA terhadap kadar piperin dari biakan kalus umur 7 minggu.

Table 2. The effect of 2,4-D and NAA on piperin content from callus 7 weeks after culture.

Perlakuan (mg/l)	Kadar piperin (%)
2,4-D 0.0	0.021
2,4-D 0.5	0.023
2,4-D 1.0	0.019
2,4-D 1.5	0.041
2,4-D 0.0 + NAA 0.1	0.023
2,4-D 0.5 + NAA 0.1	0.018
2,4-D 1.0 + NAA 0.1	0.036
2,4-D 1.5 + NAA 0.1	0.032

Selanjutnya Meyer dan Staden (1995) menyatakan bahwa penambahan auksin dan sitokinin BA ke dalam media tumbuh memberikan hasil terbaik terhadap kandungan anthocyanin pada tanaman *Oxalis linearis*, sedangkan Banthorpe *et al.* (1988) menyatakan bahwa walaupun dapat merangsang pembelahan sel penggunaan 2,4-D umumnya menghambat metabolit sekunder pada kalus.

Perlakuan NAA 0.1 mg/l + BA 5 mg/l dengan penambahan 2,4-D cenderung memberikan kandungan piperin yang lebih rendah yaitu 0.018 (Tabel 2). Hal ini mungkin disebabkan tingginya kandungan auksin yang terdapat dalam jaringan. Seperti penelitian Valpuesta *et al.* (1995) menunjukkan bahwa pemakaian NAA dan sitokinin pada media menurunkan kandungan alkaloid yang diperoleh.

Dari hasil penelitian juga dapat dilihat bahwa struktur dan warna kalus mempunyai pengaruh terhadap kandungan piperin yang diperoleh.

Kalus dengan warna putih kehijauan, renyah dan mengandung banyak air (Gambar 1.4) memberikan kadar piperin yang lebih tinggi dibandingkan dengan kalus berwarna hijau, kering dan agak renyah (Gambar 2.6).

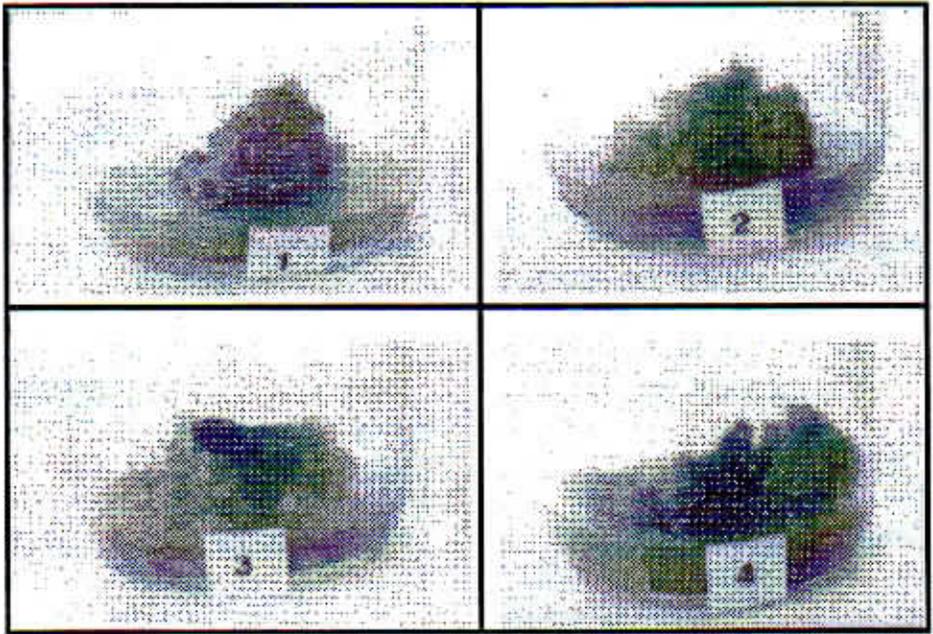
Buah kemukus mengandung minyak atsiri 10 -20 %, asam kubebat 1 %, kubebina 0.3 - 3 % dan piperin 0.4 % (Depkes, 1989). Hasil penelitian Yuliani *et al.*, (1993) menunjukkan bahwa kadar minyak buah kemukus dari Banyumas adalah 12.50 % dan piperin 0.24 % sedangkan kadar minyak kemukus dari Cilacap adalah

10.60 % dan piperin 0.17 %. Hasil analisis secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) memberikan pemisahan 10 komponen. Dari hasil tersebut terlihat bahwa kadar piperin kalus tertinggi 0.041 % yang berarti seperlima koma delapan atau sekitar 17 % dari buah kemukus.

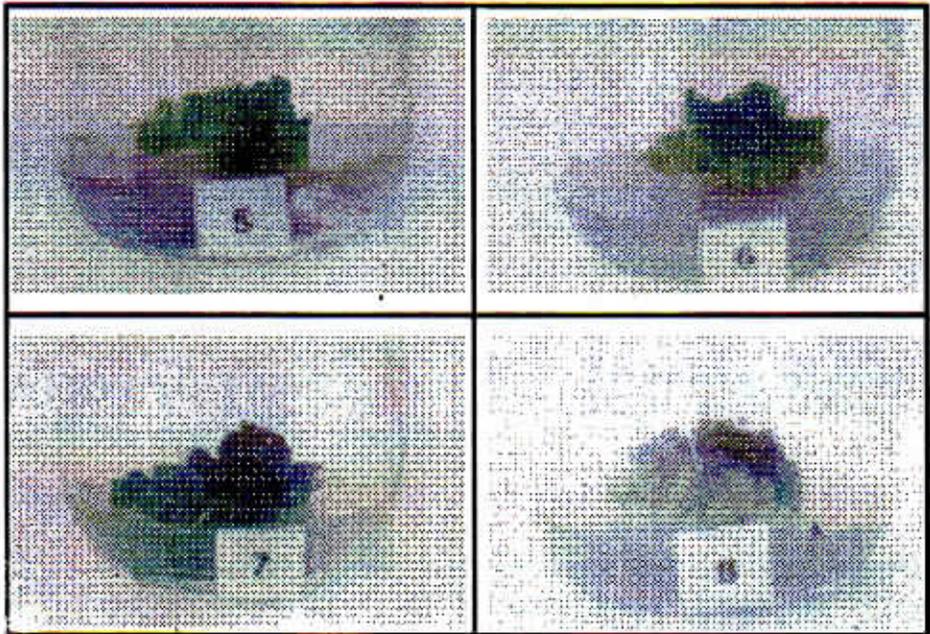
Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan. Untuk mengetahui awal terbentuknya senyawa piperin pada kalus dari eksplan daun disarankan untuk dilakukan penelitian dengan umur kalus sebelum dan setelah 7 minggu

KESIMPULAN

Perlakuan media MS + NAA 0.1 mg/l + BA 5 mg/l merupakan media yang terbaik untuk inisiasi kalus dari eksplan daun kemukus dengan struktur kalus renyah dan berwarna hijau kekuningan. Pertumbuhan kalus terbaik diperoleh dari perlakuan 2,4-D 0.0 mg/l + NAA 0.1 mg/l + BA 5 mg/l dengan pertambahan berat kalus rata-rata 10.60 gram dan struktur kalus renyah dan penampakan biakan kalus hijau segar, kering. Kalus dari semua perlakuan dapat menghasilkan alkaloid piperin dengan hasil tertinggi 0.041 % diperoleh dari perlakuan BA + 2,4-D 0.0 mg/l + NAA 0.1 mg/l + BA 5 mg/l.



Gambar 1. Kalus yang diperoleh dari perlakuan dengan 2,4-D
Figure 1. Callus obtained from treatment with 2,4-D.



Gambar 2. Kalus yang diperoleh dari perlakuan 2,4-D kombinasi dengan NAA
Figure 2. Callus obtained from treatment combination of 2,4-D NAA

DAFTAR PUSTAKA

- Association of Official Analytical Chemists, 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th ed. AOAC, Inc. Arlington, Virginia.
- Arrilaga, L., J.J. Tobolski and S.A. Merle. 1994. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Plant Cell Reports 13 : 171 - 175.
- Banthorpe, D.V., S.A. Branch, I. Pools and W.D. Fordham. 1988. Accumulation of 2- phenylethanol by callus derivad from leaf of *Rosa damascena*. Phytochem. 27 (3) : 795 - 801
- Benavides, M.P. and O.H. Caso. 1993. Plant regeneration and thiophene formation in tissue cultures of *Tagetes mendocina*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35 : 211 - 215.
- Depkes. 1989. Vademikum bahan obat alam. Departemen kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Farida. 1986. Kemukus yang gampang diurus. Trubus No 95 : 36 - 39.
- Gati, E. dan I. Mariska. 1989. Perkembangan penelitian bioteknologi kultur jaringan tanaman penghasil minyak atsiri. Edisi Littro 5(2) : 19 - 36.
- Gati, E., I. Mariska dan Sri Yuliani. 1993. Produksi senyawa sekunder flavonoid K⁺ dan Na⁺ pada tanaman tempuyung melalui kultur jaringan. Medkom Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri 12 : 50 - 55.
- George, F.E. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exgetic Ltd. England. 709p.
- Kothari, S.L. and N. Chandra. 1986. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Tagetes erecta*. J. Plant Physiol. 122 : 235 - 241.
- Mantell, S.H., Matthews, J.A and McKee, R.A., 1985. Principles of plant biotechnology. Blackwell Scientific Publications.
- Meyer, H.J. and J.V. Staden. 1995. The *in vitro* production of an anthocyanin from callus of *Oxalis linearis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 40 : 55 - 58.
- Nurdjannah, N., A. Wahyudi and Risfaheri. 1990. Perkembangan penelitian minyak atsiri sekunder (cengkeh, pala, jahe, kemukus, kapolaga, lada). Edisi khusus Littro Bogor 6(1) : 54 - 65
- O'Dowd, N.A., P.G. McCauley, D.H.S. Richardson and G. Wilson, 1993. Callus production, suspension culture and *in vitro* alkaloid yields of *Ephedra*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 34 : 149 - 155.
- Roja, G. and M.R. Heble, 1994. The quinoline alkaloids camptothecin and 9-methoxycamptothecin from tissue culture and mature trees of

- Nothapodytes foetida*. Phytochem. 36 (1) : 65 - 66.
- Rout G.R. and P. Das, 1994. Somatic embryogenesis in *Simarouba glauca*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37 : 79 - 81.
- Valpuesta, M., N. Posadas., I. Ruiz., M.V. Silva., A.I. Gomez., R. Suav., B. Perez., F. Pliego and B. Cabezudo. 1995. Alkaloid from *Ceratocarpus heterocarpus* plants and *in vitro* cultures. Phytochem. 38 : 113 - 118.
- Windholz, M, S, Budavari ; R, F. Blumetti and E.S. Otterbein, 1983. The Merck Index. Tenth Edition. Merck & Co Inc. Rahway. N.J. USA. p. 7347-7348.
- Wink, M., C. Meibner and L. Witte. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *lupinus*. Phytochem. 38 : 139 - 153.
- Yamada, Y. and Fujita, Y. 1983. Production of useful compounds in culture *in Handbook of plant cell culture*. Vol. 1. Collier Macmillan Publisher. London. p 717 - 728.
- Yuliani, S., Hernani dan Anggraeni. 1993. Perbaikan serta modifikasi metoda analisis bahan aktif beberapa jenis tanaman obat. Laporan hasil penelitian Balitro Bogor (Tidak dipublikasikan).
- Yuliani, S. 1995. Inventarisasi, identifikasi dan isolasi senyawa alkaloid golongan purin dan piridin dari famili zingiberaceae dan piperaceae. Laporan hasil penelitian Balitro. Bogor (Tidak dipublikasikan)
- Zhou, J., H. M, F. Guo and X. Luo. 1994. Effect thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 36 : 73.