PENGARUH ZAT PENGATUR TUMBUH TERHADAP PEMBENTUKAN DAN PERTUMBUHAN SERTA KANDUNGAN SINENSETIN DALAM KALUS PADA TANAMAN KUMIS KUCING (*Orthosiphon aristatus*)

SITTI FATIMAH SYAHID dan HERNANI

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor

RINGKASAN

Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus *in vitro* serta kandungan senyawa sinensetin pada tanaman kumis kucing dengan KCKT telah diteliti di Laboratorium Kultur Jaringan Kelti Pemuliaan serta Pasca Panen Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor mulai bulan Maret sampai Oktober 2000. Bahan tanaman yang digunakan adalah daun kumis kucing steril yang tersedia dalam botol kultur. Media dasar yang digunakan adalah Murashige dan Skoog (MS). Penelitian terdiri atas dua kegiatan yang dilakukan secara bertahap. Pada tahap 1, dipelajari pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap pembentukan kalus. Konsentrasi yang dicoba adalah 0.1, 0.3, 0.5, dan 0.7 mg/l. Pada tahap 2, dipelajari pengaruh konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan kalus dengan media yang terbaik pada kegiatan tahap 1. Perlakuan yang digunakan adalah : 0.1 mg/l 2,4-D; 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA; 0.1 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA dan 0.1 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l BA. Kadar sinensetin pada kalus dari setiap perlakuan tersebut dianalisis secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Rancangan penelitian yang digunakan adalah acak lengkap dengan tiga ulangan dan setiap ulangan terdiri atas lima botol. Parameter yang diamati adalah waktu inisiasi, penambahan berat, struktur serta warna kalus. Hasil penelitian tahap 1 menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi 0.1 mg/l 2,4-D menghasilkan pembentukan kalus terbaik dengan penambahan berat kalus paling tinggi yaitu 0.49 gram dalam waktu lima minggu. Dari percobaan tahap ke-dua ternyata bahwa penggunaan 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA merupakan perlakuan terbaik dalam memacu pertumbuhan kalus dan dapat meningkatkan bobot kalus paling tinggi yaitu 6.59 gram dalam waktu lima minggu namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0.1 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA. Hasil analisa kandungan senyawa aktif sinensetin secara KCKT menunjukkan bahwa perlakuan 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l 2,4-D menghasilkan senyawa sinensetin sekitar 0.24% yang lebih tinggi dari perlakuan lainnya.

Kata kunci : *Orthosiphon aristatus*, pengatur tumbuh, kalus, *in vitro*, sinensetin

ABSTRACT

Effect of growth regulator on the formation, development and sinensetin content of the callus on Orthosiphon aristatus

Effect of growth regulators on the formation, development and sinensetin content of the callus on kidney plant (*Orthosiphon aristatus*) was studied at the laboratory of the Research Institute for Spices and Medicinal Crops (RISMC) Bogor from March to October 2000. Material (explants) for the study was the sterile leaves available in the culture. Basic medium used was Murashige and Skoog (MS). The study was conducted in two step. In the first step the explants were cultured on MS medium applied with 2,4-D at the concentration of 0.1; 0.3; 0.5 and 0.7 mg/l. In the second step, the explants were cultured on MS medium containing 0.1 mg/l 2,4-D (best concentration in the first study) enriched with BA at the concentration of 0.5; 1.0, and 1.5 mg/l. The experiment was designed as a completely randomized in three replicates. Each replicate contained five bottles. Parameters used for evaluating the effect of treatment were the time of initiations, growth rate, structure and colour of the calli and sinensetin content which was analyzed with HPLC. Results showed that from the first experiment, 2,4-D of 0.1 mg/l produced the

highest rate of calli formation (0.49 g/5 weeks). From the second experiment, it was revealed that the best treatment was 0.5 mg/l BA combined with 0.1 mg/l 2,4-D produced 6.59 g calli/5 weeks, but was not significantly different from the calli cultured on the medium containing 1.0 mg/l BA combine with 0.1 mg/l 2,4-D. Result of sinensetin analysis showed that MS medium containing BA 1.0 mg/l + 0.1 mg/l 2,4-D produced 0.24% sinensetin, higher than those of other treatment.

Key words : *Orthosiphon aristatus*, growth regulator callus, *in vitro*, sinensetin.

PENDAHULUAN

Kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) merupakan salah satu tanaman obat dari famili Labiateae yang potensial untuk dikembangkan. Daunnya yang berkhasiat obat sering digunakan dalam pengobatan penyakit ginjal, radang kandung kemih, rematik serta kencing manis (ANON, 1980). Disamping memiliki sifat diuretik, daunnya juga bersifat sebagai anti bakteri seperti yang dilaporkan oleh SUMARYONO *et al.*, dalam ANGGRAENI dan TRIANTORO, (1992).

Khasiat dari suatu tanaman berasal dari senyawa-senyawa kimia yang terdapat di dalamnya. Biasanya senyawa-senyawa kimia yang terdapat di dalam tanaman disebut sebagai metabolit sekunder yang juga akan menentukan kualitas dari suatu tanaman. Dalam suatu tanaman, satu senyawa kemungkinan secara langsung akan memberikan efek farmakologis karena senyawa tambahan akan saling bersinergis, tetapi bila dalam bentuk senyawa murni tidak mempunyai khasiat sebagai obat (ROBINSON, 1988).

Senyawa-senyawa yang terdapat dalam daun kumis kucing antara lain saponin, saponin, garam kalium, minyak lemak, zat samak, orthosiphon glikosida dan myoinositol (WIJAYAKUSUMA *et al.*, 1996). Selanjutnya SUMARYONO (1991) telah berhasil mengidentifikasi 9 senyawa lifofil turunan flavon pada daun kumis kucing. Dilaporkan juga oleh FLACHSMANN (dalam ANGGRAENI dan TRIANTORO 1992) bahwa selain senyawa-senyawa tersebut di atas, senyawa sinensetin pada daun kumis kucing merupakan senyawa yang paling stabil. Sinensetin merupakan senyawa identitas dari tanaman kumis kucing yang ditemukan pada akhir tahun 1980. Penelitian mengenai analisa senyawa metabolit sekunder sinensetin melalui kultur *in vitro* belum pernah dilaporkan. Penelitian mengenai analisa kandungan sinensetin pada daun kumis kucing yang berasal dari kebun percobaan Cibinong dan Cimanggu telah dilakukan oleh ANGGRAENI dan TRIANTORO (1992) dan

berhasil memperoleh hasil kadar sinensetin tertinggi dari daun tua pada tanaman berbunga ungu sebesar 0.3% dan terendah pada tanaman berbunga putih yaitu 0.09%. Senyawa sinensetin merupakan produk metabolit sekunder dan dapat diproduksi secara *in vitro* melalui kultur kalus maupun kultur sel.

Salah satu aplikasi teknik kultur *in vitro* adalah untuk memproduksi senyawa sekunder. Teknik ini banyak digunakan dalam biosintesis dan biotransformasi senyawa metabolit sekunder. Keuntungan yang dapat diperoleh dari teknik tersebut diantaranya tidak tergantung musim, dapat diproduksi dalam jumlah yang cukup banyak dengan kondisi lingkungan tumbuh yang terkontrol serta dapat diproduksi sesuai dengan permintaan/kebutuhan. Senyawa metabolit sekunder yang mempunyai nilai ekonomi tinggi telah banyak terdapat dipasaran dunia, antara lain vinblastin, ajmalin, digitalis, kinin, kodein, dan piretrin (KRISTINA *et al.*, 1992).

Isolasi senyawa metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain melalui kultur kalus maupun sel (MANTELL *et al.*, 1985; YAMADA dan FUJITA, 1983). Kandungan senyawa metabolit sekunder dapat ditingkatkan melalui seleksi bahan tanaman atau jaringan, tingkat pertumbuhan tanaman, pemakaian zat pengatur tumbuh dan prekursor, penggunaan mutagen baik fisik maupun kimia serta manipulasi faktor lingkungan (GATI dan MARISKA, 1992).

Beberapa hasil penelitian mengenai produksi senyawa metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* telah dilaporkan oleh MEYER dan STADEN (1995) yang memproduksi senyawa anthosianin dari tanaman *Oxalis linearis*. Sedangkan FURMANOWA *et al.* (1999) telah berhasil mendapatkan senyawa rosavin melalui kultur sel dari tanaman *Rhodiola rosea* dan BORGAUD *et al.* (1999) memperoleh senyawa flavonoid melalui kultur akar rambut dari *Psoralea*.

Pertumbuhan kalus sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder dapat dipacu dengan pemberian zat pengatur tumbuh baik auksin maupun kombinasi dengan sitokinin. 2.4-D dan NAA merupakan jenis auksin yang sering digunakan untuk inisiasi dan pertumbuhan kalus (BANTHORPE *et al.*, 1988). Selanjutnya BHOJWANI dan RAZDAN (1983) menambahkan bahwa 2.4-D sangat efektif untuk induksi pertumbuhan kalus. BAP merupakan sitokinin yang berfungsi dalam pembelahan sel. Penggunaan kombinasi sitokinin (BAP) yang dikombinasikan dengan auksin (2.4-D) dapat merangsang proses pembelahan sel (ARRILAGA *et al.*, 1994). NEZBEDOVA *et al.* (1999) menyatakan bahwa jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan akan mempengaruhi pertumbuhan kalus serta kualitas dari senyawa yang dihasilkan.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa taraf konsentrasi zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus kumis kucing dan kandungan sinensetin pada kalus.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Kultur jaringan Kelti Pemuliaan dan Pasca Panen, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor dari bulan Maret sampai Oktober 2000. Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah daun kumis kucing yang telah tersedia dalam botol steril. Media yang digunakan adalah Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan vitamin dari group B. Sebagai sumber energi ditambahkan sukrosa sebanyak 30 g/l dan agar diberikan sebanyak 8 g/l sebagai pematat. Percobaan dilakukan dalam dua tahap, yaitu penentuan konsentrasi optimal 2.4-D untuk pembentukan kalus serta pengaruh beberapa taraf konsentrasi BAP dengan 0.1 mg/l 2.4-D terhadap pertumbuhan kalus dan analisa kandungan sinensetin dalam kalus.

Tahap 1. Pengaruh konsentrasi 2.4-D terhadap pembentukan kalus

Perlakuan yang diuji pada tahap ini adalah beberapa taraf konsentrasi 2.4-D yaitu : 0.1; 0.3; 0.5, dan 0.7 mg/l. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan tiga ulangan. Setiap ulangan terdiri atas lima botol. Parameter yang diamati adalah waktu inisiasi kalus, penambahan berat kalus, struktur serta warna kalus.

Tahap 2. Pengaruh beberapa taraf konsentrasi BA dengan 2.4-D 0.1 mg/l terhadap pertumbuhan kalus dan analisis kandungan sinensetin

Perlakuan yang diuji adalah : 0.1 mg/l 2.4-D (kontrol); 0.1 mg/l 2.4-D + 0.5 mg/l BA; 0.1 mg/l 2.4-D + 1.0 mg/l BA, dan 0.1 mg/l 2.4-D + 1.5 mg/l BA. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Setiap ulangan terdiri atas lima botol. Parameter yang diamati adalah penambahan berat kalus, struktur serta warna kalus serta analisis kandungan sinensetin.

Analisis kandungan senyawa sinensetin pada kalus dilakukan secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan cara sebagai berikut :

Kalus dari setiap perlakuan yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 0.6-0.7 g, dan dimasukkan ke dalam labu didih 100 ml. Kemudian ditambahkan pelarut metanol sebanyak 25 ml lalu larutan dipanaskan selama 10 menit. Setelah dingin disaring dan diimpitkan kembali. Filtrat digunakan untuk analisis secara Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kondisi peralatan adalah sebagai berikut

Kolom : Lichospher 100 RP-18.
Eluen : Asetonitril : asam asetat 2% = 60 : 40.
Detektor : UV dengan panjang gelombang 258 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Konsentrasi BA dengan 0.1 mg/l 2.4-D Terhadap Pertumbuhan Kalus

Pengaruh Konsentrasi 2.4-D Terhadap Pembentukan Kalus

Penggunaan 2.4-D dengan konsentrasi dari 0.1–0.7 mg/l mampu menginduksi terbentuknya kalus kumis kucing yang berasal dari potongan daun *in vitro*. Pada umur 7 sampai 9 hari setelah dikulturkan, mulai terlihat inisiasi kalus pada pelukaan daun untuk semua perlakuan yang diuji. Pada konsentrasi rendah ternyata 2.4-D mampu merangsang sel daun melakukan proses dediferensiasi untuk membentuk kalus. Zat pengatur tumbuh (2.4-D) merupakan salah satu jenis auksin yang sangat efektif dalam menginduksi pembentukan kalus (GEORGE dan SHERRINGTON, 1984; NAGASAWA dan FINER, 1988). Pertambahan bobot kalus tertinggi diperoleh dari konsentrasi 0.1 mg/l yaitu seberat 0.49 g pada umur 5 minggu dan berbeda nyata dengan konsentrasi 2.4D lainnya. Peningkatan konsentrasi dari 0.3-0.7 mg/l cenderung menurunkan bobot kalus (Tabel 1). Dalam hubungan ini NEZBEDOVA *et al.* (1999) menyatakan bahwa penggunaan konsentrasi rendah akan lebih baik dalam menginduksi kalus dibandingkan dengan konsentrasi tinggi.

Penampakan kalus pada semua perlakuan konsentrasi 2.4-D umumnya agak renyah terutama pada bagian atasnya, sedangkan pada bagian bawah cenderung agak kompak dengan warna kalus yang hijau muda. Warna kalus yang cenderung hijau muda adalah karena konsentrasi 2,4-D sekitar 0.1-0.7 mg/l yang digunakan cukup optimal untuk pertumbuhan kalus sampai pada minggu ke lima. Pada awal minggu ke enam kalus mulai berubah warna menjadi coklat dan akhirnya hitam. Kemungkinan senyawa fenol dari jaringan mulai terbentuk sehingga kalus harus segera di sub kultur. GATI dan MARISKA, (1992) memperoleh warna kalus tempuyung yang cenderung coklat kehitaman pada penggunaan 2.4-D konsentrasi tinggi yaitu 3-5 mg/l.

Penggunaan 0.1 mg/l 2.4-D merupakan hasil terbaik dari percobaan tahap pertama dan penggunaan 0.1 mg/l 2.4-D dengan 0.5 mg/l BA tampaknya dapat merangsang pertumbuhan kalus sehingga bobot yang dihasilkan cenderung meningkat. Bobot tertinggi diperoleh pada perlakuan 0.1 mg/l 2.4-D + 0.5 mg/l BA yaitu 6.59 g pada umur 5 minggu dan tidak berbeda nyata dengan 0.1 mg/l 2.4-D 0.1 + 1.0 mg/l BA yaitu 6.33 gram (Tabel 2).

Penggunaan konsentrasi 0.1 mg/l 2.4-D dengan 0.5 mg/l dan 1.0 mg/l BA akan meningkatkan bobot kalus dan tampaknya merupakan konsentrasi yang paling optimal bagi pertumbuhan kalus. Penggunaan 0.1 mg/l 2.4-D secara tunggal menghasilkan pertambahan berat kalus yang rendah yaitu hanya 1.17 g dalam waktu lima minggu. 2.4-D sangat efektif untuk induksi kalus dan BAP sangat berperan dalam pembelahan sel sehingga penggunaan kedua zat pengatur tumbuh tersebut sangat mendukung pertumbuhan kalus. ARRILAGA *et al.*, (1994) menyatakan bahwa penggunaan sitokinin bersama-sama dengan auksin sering digunakan untuk mempercepat proses pembelahan sel. Peningkatan konsentrasi BA sampai 1.5 mg/l menurunkan bobot kalus. GUNAWAN (1987) menyatakan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh ke dalam media akan menentukan arah pertumbuhan dari jaringan yang ditumbuhkan. Tampaknya pada peningkatan BA sampai konsentrasi 1.5 mg/l cenderung menurunkan bobot kalus karena kemungkinan BA endogen yang dimiliki jaringan daun telah mencukupi sampai konsentrasi 1.0 mg/l sehingga peningkatan ke konsentrasi yang lebih tinggi tidak mendukung pertumbuhan kalus selanjutnya.

Pada umumnya struktur kalus hampir sama dengan struktur pada perlakuan 2.4-D secara tunggal yaitu agak renyah dan agak kompak pada bagian bawahnya. Hanya saja semakin tinggi konsentrasi BA yang digunakan warna kalus agak lebih hijau dari pada perlakuan 2.4-D secara tunggal. Diduga warna hijau dari kalus disebabkan oleh adanya BA yang dapat berperan dalam sintesa klorofil. GEORGE dan SHERRINGTON (1984) menyatakan bahwa sitokinin cenderung merangsang pembentukan klorofil pada kalus maupun kultur suspensi.

Tabel 1. Pengaruh beberapa taraf konsentrasi 2.4-D terhadap pertambahan berat kalus dan penampilannya, umur lima minggu.
Table 1. Effect of 2.4- D concentration on the weight and callus performance, 5 weeks after culturing

Konsentrasi 2.4- D Concentration of BA (mg/l)	Berat daun awal Initial weight of leaves (g)	Berat kalus Weight of callus (g)	Pertambahan berat kalus Increase in callus weight (g)	Struktur dan penampakan kalus Structure and performance of callus
0.1	0.02	0.51 ^a	0.49 a	agak renyah, hijau muda <i>friable, green</i>
0.3	0.02	0.26	0.24 b	agak renyah, hijau muda <i>friable, green</i>
0.5	0.02	0.18	0.16 b	agak renyah, hijau muda <i>friable, green</i>
0.7	0.02	0.13	0.11 b	agak renyah, hijau muda <i>friable, green</i>
KK CV (%)	24.0			

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT
Note : Numbers followed by the same letters are not significantly different at 5% DMRT

Tabel 2. Pertambahan bobot kalus pada penggunaan beberapa konsentrasi BA pada perlakuan 0.1 mg/l 2.4-D, umur 5 minggu
 Table 2. Increase in callus weight at different several concentrations of BA 0.1 mg/l 2.4-D, five weeks after culturing

Konsentrasi BA Concentration of BA (mg/l)	Berat daun awal Initial weight of leaves (g)	Berat kalus Weight of callus (g)	Pertambahan berat kalus Increase in callus weight (g)	Struktur dan penampakan kalus Structure and performance of calli
0.5	0.10	6.69	6.59 a	agak renyah, hijau friable, green
1.0	0.10	6.43	6.33 a	agak renyah, hijau friable, green
1.5	0.10	4.95	4.85 b	agak renyah, hijau friable, green
KK CV(%):		10.0		

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT
 Note : Numbers followed by the same letters are not significantly different at 5% DMRT

Tabel 3. Pengaruh beberapa taraf konsentrasi BA pada media dasar yang mengandung 0.1 mg/l 2.4-D terhadap kandungan senyawa sinensetin dari biakan kalus, umur 5 minggu
 Table 3. Effect of BA concentration at basic medium containing 0.1 mg/l 2.4-D on sinensetin content, 5 weeks after culture

Konsentrasi BA (mg/l)	Kandungan sinensetin (%)
0	0.05 c
0.5	0.11 bc
1.0	0.24 a
1.5	0.15 b
KK CV(%)	17.06

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% DMRT
 Note : Numbers followed by the same letters are not significantly different at 5% DMRT

Analisis Kandungan Senyawa Sinensetin dari Kalus

Kalus yang dihasilkan dari setiap perlakuan dianalisa kandungan sinensetinya. Hasil analisa dengan KCKT menunjukkan bahwa senyawa sinensetin dapat teridentifikasi dari semua perlakuan kalus (Tabel 3). Berarti metabolit sekunder sinensetin dapat diproduksi dari kalus, hanya diperlukan kombinasi perlakuan yang tepat.

Senyawa sinensetin yang diperoleh dari perlakuan 2.4-D secara tunggal ternyata jauh lebih rendah yaitu sekitar 0.05%. Penggunaan kombinasi perlakuan antara 0.1 mg/l 2.4-D dengan 1.0 mg/l BA menghasilkan produksi sinensetin 0.24% yang berbeda nyata dengan semua perlakuan lainnya. Tampaknya konsentrasi 0.1 mg/l 2.4-D yang ditambahkan dengan 1.0 mg/l BA merupakan konsentrasi optimal dalam memproduksi senyawa sinensetin dari kalus.

Penggunaan media tumbuh yang sesuai akan memacu terbentuknya metabolit sekunder pada setiap tanaman. Hasil yang sama juga diperoleh oleh Meyer dan STADEN (1995) dimana penambahan auksin dan sitokinin BA ke dalam media tumbuh dapat memberikan hasil terbaik terhadap kandungan anthosianin dari tanaman *Oxalis linearis*. Penelitian lain dari TJONDRONEGORO (1992) berhasil mendapatkan kandungan diosgenin terbaik

dari kultur bulbis tanaman *Dioscorea bulbifera* yang dikulturkan pada media MS dan penambahan zat pengatur tumbuh 1.0 mg/l 2.4-D dan 0.1 mg/l BA. GATI dan MARISKA (1992) telah berhasil memperoleh kandungan minyak peppermint yang tinggi dari kalus tanaman mentha yang diperbanyak pada media MS dan telah diperkaya dengan 1.0 mg/l 2.4-D + 1.0 mg/l kinetin. Penggunaan zat pengatur tumbuh kombinasi antara 0.1 mg/l 2.4-D dengan 1.0 mg/l BA merupakan nisbah yang cukup tepat terhadap produksi kandungan sinensetin dari kalus kumis kucing. Peningkatan konsentrasi BA sampai 1.5 mg/l akan menurunkan kandungan senyawa aktifnya.

KESIMPULAN

Konsentrasi 0.1 mg/l 2.4-D menghasilkan pertambahan berat kalus tertinggi pada umur lima minggu (0.26 g). Penggunaan 0.1 mg/l 2.4-D + 0.5 mg/l BA meningkatkan bobot kalus (6.59 g) dalam lima minggu. Kadar senyawa sinensetin tertinggi (0.24%) diperoleh dari perlakuan 0.1 mg/l 2.4-D + 1.0 mg/l BA.

DAFTAR PUSTAKA

- ANON. 1980. *Materia Medika Indonesia*. Departemen Kesehatan RI. Vol. IV.
- ANGGRAENI dan TRIANTORO. 1992. Kandungan utama daun kumis kucing. *Prosiding Forum Komunikasi Ilmiah hasil Penelitian Plasma Nutfah dan Budidaya Tanaman Obat*. Bogor. p.165-169.
- ARRILAGA, L.; J.J TOBOLSKI and S.A MERLE. 1994. Advance in somatic embryo genesis and plant production of black locust (*Robinia pseudocassia*. L). *Plant cell report*. 13 : 171-175.
- BANTHORPE, D. V., S. A. BRANCH, I. POOLS and W. D. FOEDHAM. 1988. Accumulation of 2-phenylethanol by callus derivat from leaf of *Rasadamascena*. *phytochem*. 27(3) : 795-801.

- BHOJWANI, S. S and M. K. RAZDAN. 1983. Plant tissue culture; Theory and Practice. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam. 502p.
- BOURGAUD, F; V. BOUQUE and A. GUCKERT. 1999. Production of flavonoid by *Psoralea hairy* root cultures. Plant cell, tissue and organic culture. 56 : 97-104.
- FURMANOWA, M; M.HARTWICH; A.W ALFERMANN; W. KOZMINSKI and M.OLEJNIK. 1999. Rosavin as a product of glycosylation by *Rhodiola rosea* (rose root) cell culture. Plant cell, tissue and organic culture. 56 : 105-110.
- GATI, E dan I. MARISKA. 1992. Pengaruh auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan kalus *Mentha piperita* Linn. Buletin Puslitbangtri. 3 : 1-4.
- GEORGE, E. F and P.D SHERRINGTON. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eastern Press, Berks, England. 709p.
- GUNAWAN, L. W. 1987. Teknik kultur jaringan. Laboratorium Kultur jaringan PAU Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- KRISTINA, N.N; A. HUSNI dan I. MARISKA. 1992. Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro*. Med Kom Puslitbangtri 10 : 18-22.
- MANTELL, S. H ., MATTHEWS, J. A and MCKEE, R. A. 1985. Principles of plant Biotechnology. Blackwell Scientific Publications. 807p.
- 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.
- NAGASAWA, A and J. J. FINER. 1988. Induction of morphogenic callus cultures from leaf of garlic. Hort Science 23 : 1068-1070.
- NEZBEDOVA, L ; M. HESSE ; J. DUSEK and C. WERNER. 1999. Chemical potential of *Aphelandra sp* cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures. 133-140.
- ROBINSON, T. 1988. An introduction to the chemistry of herbs, spices and medicinal plants. The herb, spice and medicinal plant digest. VI (3) : 1-14.
- SUMARYONO, W. 1991. Senyawa flavon baru dari daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*). Phyto Medica. 1 (4) : 251-269.
- TJONDRONEGORO, P. D. 1992. Pengaruh beberapa zat pengatur tumbuh terhadap pertumbuhan dan kandungan Diosgenin kultur kalus *Dioscorea bulbifera*. Jurnal Ilmu Pengetahuan Indonesia II. IPB Bogor. 1 : 49-53.
- WIJAYAKUSUMA, ILM; S. DALIMARTHA dan A.S WIRAN. 1996. Tanaman berkhasiat obat di Indonesia, Pustaka Kartini, Jakarta : 62-64.
- YAMADA, Y and FUJITA, Y. 1983. Production of useful compounds in culture. *In Handbook of Plant Cell Culture*. Vol I. Collier Macmillan Publisher. London. p. 717-728.