

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak khamir dan mioinositol memberikan pengaruh tidak beda nyata terhadap berat segar planlet. Ekstrak khamir merupakan elisitor biotik yang berperan dalam menginduksi metabolit sekunder sehingga tidak mempengaruhi pertumbuhan planlet. Analisis kualitatif artemisinin menunjukkan bahwa planlet *A. vulgaris* yang ditumbuhkan pada media perlakuan menghasilkan artemisinin. Peningkatan kadar artemisinin yang tertinggi dihasilkan pada perlakuan mioinositol 400 mg/l tanpa ekstrak khamir

Kata kunci : *A. vulgaris*, kultur pucuk, artemisinin, mioinositol, ekstrak khamir

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman sebagai obat dan sumber obat semakin berkembang. Di Indonesia, jenis tanaman obat begitu banyak dan penggunaannya sudah dilakukan sejak jaman nenek moyang sampai saat ini (Anonim, 2000). Berbagai jenis tanaman dapat digunakan sebagai obat karena di dalam tanaman terkandung berbagai jenis senyawa yang mampu bekerja dalam penyembuhan penyakit. Menurut Kurz dan Constabel (1998) beberapa tanaman dikenal menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mempunyai berbagai aktivitas bioaktif yang berperan dalam dunia pengobatan.

Artemisia merupakan marga yang besar dari suku Compositae, memiliki sekitar 300 species (Ferreira dan Janick, 1996). Sebagian besar anggotanya telah dimanfaatkan sebagai rempah-rempah, penolak serangga, dan diambil minyak atsirinya. Manfaatnya sebagai tanaman obat pun tak kalah menarik, bahkan sekitar 45 species telah diteliti kegunaannya dalam dunia medis. Khasiatnya antara lain sebagai obat flu, demam, rematik, bisul, disentri, radang tenggorokan, antihepatitis, dan antimalaria (Huang dan Ling, 1996). Aryanti (2001) melaporkan potensi artemisinin dari hasil kultur *Artemisia cina* sebagai obat anti kanker.

Artemisia merupakan salah satu marga tumbuhan yang telah dieksplorasi kegunaannya dalam dunia pengobatan terutama sebagai sumber artemisinin. Di Indonesia dijumpai beberapa species *Artemisia* antara lain *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. cina* dan *A. sacrorum*. Tempat tumbuh species-species *Artemisia* ini di daerah dingin seperti

Tawangmangu dan Wamena Irian Jaya. Walaupun telah terbukti dapat tumbuh di Indonesia, tetapi hingga saat ini belum ada peneliti Indonesia yang secara intensif menggali potensi *Artemisia* sebagai sumber artemisinin. *A. vulgaris* sebagai salah satu species *Artemisia* yang dijumpai tumbuh di Indonesia belum banyak diteliti kandungan artemisininnya dibandingkan *A. annua*, *A. cina* dan *A. sacrorum*. Tanaman *A. vulgaris* diduga mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai sumber obat termasuk di dalamnya artemisinin.

Artemisinin sebagai salah satu bentuk senyawa bioaktif yang terdapat di dalam tumbuhan *Artemisia* termasuk dalam kelompok metabolit sekunder. Menurut Acton dkk. (1985) artemisinin merupakan suatu endoperoksida yang mengandung seskuiterpen lakton dan efisien sebagai anti-malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* yang telah resisten terhadap klorokuin. Zheng (1994) melaporkan bahwa senyawa artemisinin dan berbagai senyawa lain yang terdapat pada *A. annua* dapat menghambat aktivitas beberapa sel kanker. Artemisinin sebagai salah satu anggota kelompok senyawa seskuiterpen lakton dapat digunakan sebagai obat karena mempunyai sifat analgetik, antelmintik, antibiotik, antibakteri, sedatif dan antikanker. Penggunaan artemisinin sebagai antikanker memberikan indikasi bahwa senyawa tersebut dapat menyerang dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Terapi dan berbagai uji senyawa antikanker terhadap beberapa jenis kanker telah dilakukan di antaranya terhadap kanker payudara, kanker darah, kanker kulit dan kanker paru-paru, dan hasil pengujian menunjukkan adanya potensi

artemisinin sebagai senyawa penghambat dan pencegah kanker.

Sebagaimana metabolit sekunder umumnya, kandungan artemisinin dalam tanaman sangat rendah (0,01 – 0,5%) (w/w). Dari sekitar 300 species yang tergolong *Artemisia*, baru beberapa species yang telah diidentifikasi mengandung artemisinin di antaranya *A. annua*, *A. opiacea*, *A. lancea* dan *A. cina*. Hal ini menyebabkan kesulitan dalam penyediaan artemisinin dalam skala besar. Namun demikian tanaman *Artemisia* masih dianggap sebagai satu-satunya sumber artemisinin yang potensial selama ini tanaman yang secara serius digali potensinya sebagai sumber artemisinin hanya *A. annua*. Berdasarkan adanya kesulitan dalam penyediaan artemisinin tersebut, perlu dilakukan eksplorasi terhadap species *Artemisia* lainnya sebagai sumber potensial artemisinin, salah satunya adalah *A. vulgaris*.

Selain eksplorasi terhadap sumber artemisinin dari *Artemisia vulgaris*, perlu pula dicari metode perbanyak tanaman yang memungkinkan terjadinya peningkatan kandungan artemisinin dalam tanaman. Salah satu metode perbanyak alternatif yang dapat dilakukan adalah melalui teknik kultur jaringan, karena dengan teknik kultur jaringan ini dapat dihasilkan bibit yang banyak dalam waktu yang relatif singkat, bibit bebas penyakit dan produksi bibit tidak tergantung musim. Selain itu, produksi senyawa metabolit sekunder yang bernilai tinggi dapat dimodifikasi. Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap. Dari berbagai teknik kultur jaringan, kultur pucuk merupakan teknik kultur jaringan yang potensial sebagai sumber metabolit sekunder yang tidak dapat diproduksi melalui kultur kalus atau tidak mudah tersedia dari

tanaman asalnya. Produksi metabolit sekunder melalui kultur pucuk dapat dilakukan melalui kultur pucuk berdiferensiasi (pembentukan plantlet) atau kultur pucuk tanpa akar. Staba dan Martinez (1988) melaporkan pembentukan artemisinin melalui kultur pucuk yang berdiferensiasi.

Usaha untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder melalui teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan cara memanipulasi komposisi media, seperti mengubah konsentrasi unsur makro dan mikro, gula, vitamin dan senyawa organik lainnya juga dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Mioinositol ditambahkan dalam media kultur jaringan untuk memperbaiki pertumbuhan dan morfogenesis. Mioinositol merupakan gula alkohol yang penting dalam diferensiasi dan pembelahan sel. Selain memanipulasi komposisi media, langkah lain yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder, yaitu dengan penambahan elisitor pada media kultur dengan maksud untuk menginduksi dan memacu biosintesis metabolit sekunder pada sistem kultur jaringan (Indrayanto, 1987).

Penelitian tentang perbanyak *Artemisia* dan produksi metabolit sekunder artemisinin secara *in vitro* dengan kultur jaringan telah dilakukan pada *A. annua* dan *A. cina*, namun pada *A. vulgaris* masih belum banyak dilakukan. Penelitian ini dilakukan menggunakan *Artemisia vulgaris* dengan tujuan untuk mengetahui kandungan artemisinin yang diproduksi melalui kultur pucuk yang berdiferensiasi yang ditumbuhkan pada media dengan berbagai kadar mioinositol dan penambahan ekstrak khamir (*yeast extract*) sebagai elisitor.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang dibutuhkan untuk penelitian meliputi eksplan dari ruas batang tanaman *A. vulgaris* yang sudah ditanam secara *in vitro* selama

kurang lebih selama 3 bulan. Media untuk perbanyak pucuk berupa media Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah kinetin 10 ppm dan NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) 1 ppm, sedangkan media yang digunakan untuk induksi akar adalah media MS ditambah IBA (*Indol Butyric Acid*) 2 ppm dan media produksi berupa media MS dengan ekstrak khamir 100, 200, 300, dan 400 mg/l, serta mioinositol dengan konsentrasi 100, 200, 300, dan 400 mg/l. Bahan kimia untuk sterilisasi alat dan eksplan, berupa akuades steril, alkohol 96%, larutan HgCl₂ dan deterjen. Analisis artemisinin menggunakan metode Staba (1988). Adapun bahan yang diperlukan adalah toluen, metanol, kaliumdihidrogenphosphat, asam asetat glasial, asam sulfat pekat, etil asetat, NaOH, *plate silica gel GF 254*, anisaldehyde dan akuabides.

Alat penelitian yang digunakan meliputi *autoclave*, lemari pendingin, timbangan analitik, *Laminar airflow cabinet* (LAF) yang dilengkapi dengan lampu UV, ruang inkubasi dengan AC, lampu, alat gelas, pipet, scalpel, pisau steril, aluminium foil, pH stick, oven, alat-alat gelas untuk ekstraksi, dan *TLC Scanner* Shimadzu.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK).

Perbanyak tanaman *A. vulgaris* dilakukan dengan menumbuhkan eksplan dari ruas pucuk batang pada medium perbanyak Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah kinetin 10 ppm dan NAA 1 ppm selama 4 minggu, tunas yang telah tumbuh disubkultur pada medium perbanyak sampai jumlahnya cukup banyak (3-5 tunas). Tunas pucuk yang telah tumbuh diinduksi pertumbuhan akar dan produksi artemisininnya dalam media MS yang diberi perlakuan mioinositol dan ekstrak khamir ditambah IBA 2 ppm. Kombinasi perlakuan terdiri dari 4 aras

konsentrasi mioinositol sebesar 100, 200, 300 dan 400 mg/l serta ekstrak khamir dengan 5 aras konsentrasi 0, 100, 200, 300 dan 400 mg/l diberikan bersama-sama dalam larutan media MS. Plantlet yang terbentuk (umur 2 minggu) disubkultur dalam media perlakuan semi padat. Plantlet dipanen umur 6 minggu. Parameter yang diamati meliputi berat segar plantlet dan kandungan artemisinin secara kualitatif dan kuantitatif. Berat segar plantlet ditentukan dengan cara mengeluarkan plantlet dari botol yang berisi media semi padat kemudian dibersihkan dan ditiriskan di atas kertas saring selanjutnya langsung ditimbang berat segarnya.

Analisis artemisinin menggunakan metode Staba (1988). Analisis artemisinin dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis secara kualitatif dilakukan dengan kromatografi lapis tipis menggunakan *plate silica gel GF 254*. Ekstrak artemisinin dari plantlet *A. vulgaris* disiapkan dengan cara mengekstrak plantlet yang telah dihaluskan dengan larutan toluen, 5 µl sampel ekstrak plantlet *A. vulgaris* ditotolkan di atas *plate*, demikian juga larutan standart artemisinin yang kemudian dikembangkan/dielusi dengan campuran hexan : etil asetat (3 : 1), selanjutnya divisualisasi dengan campuran anisaldehyde yang terdiri dari 50 ml asam asetat glasial, 1 ml asam sulfat pekat dan 0.5 ml anisaldehyd. Di bawah cahaya UV artemisinin akan berwarna ungu-merah dengan *Rf* 0,43. Analisis kuantitatif dilakukan dengan *TLC Scanner*.

Data pengamatan dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan diuji lanjut menggunakan HSD test (uji BNJ) taraf uji sebesar 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat Segar Plantlet

Berat segar plantlet dipengaruhi oleh kadar air di dalam jaringan plantlet. Dari hasil analisis secara statistik, pada Tabel 1 didapatkan bahwa variasi kadar khamir tidak memberikan beda nyata terhadap berat segar plantlet.

Tabel 1. Berat Segar Plantlet *A. vulgaris* pada Perlakuan ekstrak khamir

Perlakuan	Berat segar (g)
K0	1.0463 a
K 200	1.1303 a
K 300	1.1106 a
K 400	0.8560 a

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

Tidak adanya perbedaan dalam berat segar akibat perlakuan ekstrak khamir ini menunjukkan bahwa sebenarnya ekstrak khamir lebih bersifat elisitor biotik yang berperan dalam menginduksi metabolit sekunder, dan cenderung tidak mempengaruhi pertumbuhan plantlet. Menurut Salisbury dan Ross (1995), elisitor mampu melepaskan senyawa yang dapat menginduksi berlangsungnya jalur metabolisme sekunder secara *in vitro*. Beberapa elisitor merupakan polisakarida yang akan dihasilkan bila fungi atau bakteri patogenik menyerang dinding sel tumbuhan.

Penambahan mioinositol ke dalam media kultur jaringan dimaksudkan untuk memperbaiki pertumbuhan dan morfogenesis eksplan yang ditanam. Dari hasil analisis statistik yang disajikan pada Tabel 2 didapat bahwa pemberian mioinositol dengan berbagai variasi konsentrasi juga tidak menimbulkan beda nyata terhadap berat segar plantlet.

Tabel 2. Berat Segar Plantlet *A. vulgaris* pada Perlakuan mioinositol

Perlakuan mioinositol (mg/l)	Berat Segar (g)
M 100	0.9796 a
M 200	0.8610 a
M 300	1.3833 a
M 400	0.9193 a

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

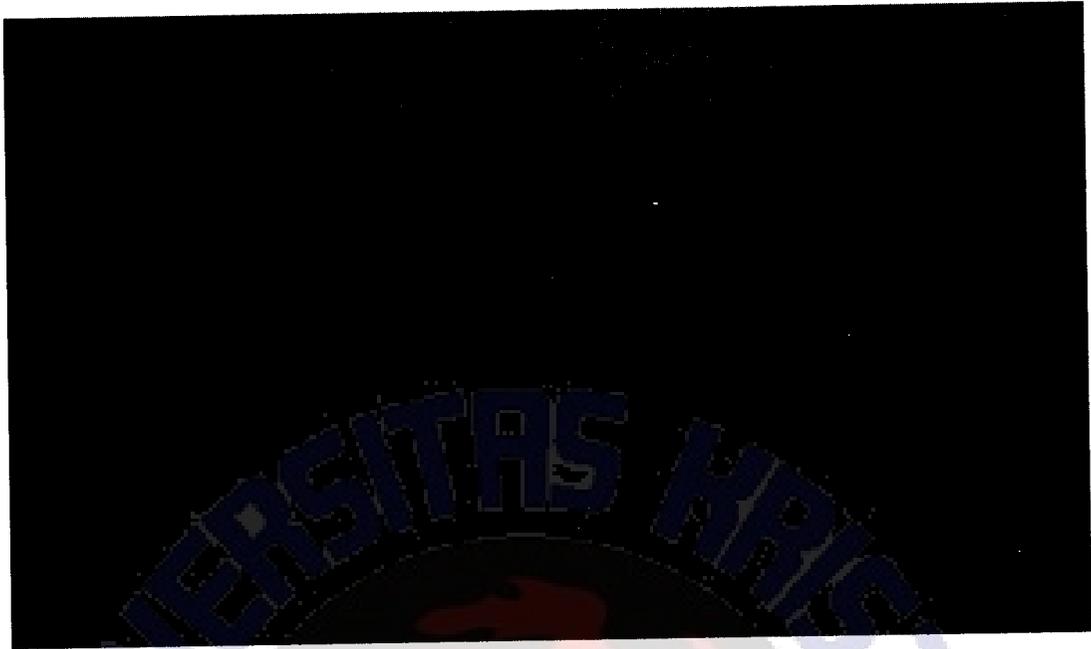
Menurut George dan Sherrington (1984) mioinositol yang diberikan dalam media kultur jaringan berfungsi membantu diferensiasi dan pertumbuhan jaringan. Mioinositol merupakan perantara pada perubahan glukosa menjadi asam

galaturonat yang merupakan prekursor pektin untuk menyusun dinding sel.

Kandungan Artemisinin

Analisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis ditujukan untuk mengetahui ada atau tidak senyawa metabolit sekunder artemisinin dalam *A. vulgaris* hasil kultur jaringan. Pada Gambar 1 ditunjukkan hasil analisis kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (TLC). Spot berwarna merah pada kromatogram menunjukkan artemisinin standar, sedangkan spot yang letaknya sejajar dan berwarna ungu merupakan spot yang diperoleh dari *A. vulgaris*. Kromatogram tersebut menunjukkan bahwa *A. vulgaris* yang ditanam secara kultur pucuk mampu menghasilkan artemisinin, karena di bawah cahaya tampak terlihat spot atau bercak berwarna ungu-merah dengan Rf yang sama dengan artemisinin standar (Rf 0,43) (Staba dan Martinez, 1988).

Dari hasil analisis secara kuantitatif diketahui bahwa hanya mioinositol yang berperan terhadap peningkatan kadar artemisinin. Pada Tabel 3 ditunjukkan bahwa pada perlakuan tanpa ekstrak khamir (K0) peningkatan konsentrasi mioinositol yang diberikan mampu meningkatkan kadar artemisinin secara nyata (tertinggi pada K0M400). Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa mioinositol mampu berperan sebagai 'agent stress' pada kondisi tanpa ekstrak khamir. Mioinositol merupakan heksitol (gula alkohol berkarbon 6) yang berasal dari derivat gula hasil reduksi gugusan aldehid menjadi alkohol primer yang sering digunakan sebagai salah satu komponen media yang penting karena mampu merangsang pertumbuhan jaringan yang dikulturkan (George dan Sherrington, 1984; Winata, 1988). Kondisi stress yang diakibatkan oleh peningkatan konsentrasi mioinositol berkaitan dengan terjadinya peningkatan pH media menjadi basa yang disebabkan oleh reduksi gugus OH pada mioinositol. Peningkatan pH pada media akan mempengaruhi penyerapan nutrisi oleh akar plantlet sehingga plantlet mengalami 'starvasi'.



Gambar 1. Kromatogram artemisinin dari plantlet *A. vulgaris* yang ditumbuhkan pada media perlakuan MS+mioinositol+ekstrak khamir+IBA)

Tabel 3. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Khamir dan Mioinositol Terhadap Kadar Artemisinin pada *Artemisia vulgaris* ($\mu\text{g/g}$ berat segar)

Perlakuan mioinositol (mg/l)	Kadar ekstrak khamir (mg/l)			
	K0	K200	K300	K400
M100	5,6109 abc A	5,9723 c CD	4,3544 a A	4,5610 ab AB
M200	5,7486 bc AB	3,8209 a A	4,9052 ab AB	6,5403 c D
M300	7,5902 c C	4,6643 ab AB	6,4714 c C	4,4405 a A
M400	9,1220 c D	6,7125 bc D	4,5610 a AB	5,9035 ab CD

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

Peningkatan artemisinin yang terjadi tidak konsisten dengan perubahan kadar mioinositol maupun ekstrak khamir. Ekstrak khamir mampu mempengaruhi kadar artemisinin dari *A. vulgaris* yang ditanam secara kultur jaringan apabila

diberikan pada konsentrasi 300 mg/l dengan mioinositol 300 mg/l, atau konsentrasi 400 mg/l dengan mioinositol 200 mg/l. Diduga ekstrak khamir juga dapat berfungsi sebagai elisitor biotik karena kemungkinan dianggap sebagai benda asing oleh plantlet sehingga fitoaleksin terakumulasi pada plantlet sebagai respon pertahanan (*defence mechanism*) dan terbentuk pula metabolit sekunder yaitu artemisinin. Perlakuan ekstrak khamir dalam media kultur telah banyak dilaporkan mampu meningkatkan produksi metabolit sekunder, misalnya penambahan elisitor berupa ekstrak khamir sebesar 0,2% pada kultur suspensi sel *Centella asiatica* dapat menghasilkan asiatikosida dengan kadar tertinggi sebesar 4425,6 $\mu\text{g/g}$ berat kering (Soegihardjo dan Koensumardiyah, 1995, diacu dalam Hartanto, 1997). Hartanto (1997) melaporkan bahwa penambahan ekstrak khamir sebesar 0,3 g/l mampu meningkatkan kadar antrakinson daun ketepeng sebesar 385,58 $\mu\text{g/g}$ berat kering dibandingkan kadar antrakinson pada daun ketepeng tanpa perlakuan ekstrak khamir. Gagnon dan Ibrahim (1997) melaporkan bahwa pemberian elisitor ekstrak khamir 1,0% (w/v) juga

meningkatkan kandungan genistein dan 2'-hidroisoflavonolignon pada tanaman *white lupin*.

Menurut Salisbury dan Ross (1995) ekstrak khamir dapat merupakan elisitor eksogen, bila bersinggungan dengan sel-sel plantlet akan dikenal oleh protein tertentu di dalam membran sel plantlet, yang selanjutnya memberi isyarat ke inti untuk memproduksi fitoaleksin. Sifat isyarat ini belum diketahui tapi jelas bahwa isyarat tersebut meningkatkan transkripsi molekul mRNA yang menyandi enzim yang mensintesis fitoaleksin

Dari hasil penelitian ditunjukkan bahwa tanaman *A. vulgaris* yang ditumbuhkan secara kultur pucuk mampu memproduksi artemisinin. Kadar artemisinin yang dihasilkan melalui kultur pucuk dengan manipulasi media dan penggunaan elisitor biotik rata-rata sebesar 6,47 µg/g berat segar, hasil ini masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan artemisinin yang dihasilkan oleh tanaman *A. vulgaris* yang ditanam di lahan terbuka yaitu 4,04 µg/g berat segar. Plantlet yang telah masuk fase generatif (data tidak ditampilkan) pada saat diukur kadar artemisininnya menghasilkan kadar sebesar 6,26 µg/g berat segar, hasil ini tidak berbeda jauh dengan hasil pada fase vegetatif.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

Artemisia vulgaris yang ditanam secara kultur pucuk mampu memproduksi artemisinin. Perlakuan mioinositol lebih berpengaruh terhadap kadar artemisinin *A. vulgaris* yang ditanam secara kultur pucuk. Peningkatan kadar artemisinin yang tertinggi dihasilkan pada perlakuan mioinositol 400 mg/l tanpa ekstrak khamir. Namun demikian kadar artemisinin juga dapat ditingkatkan pada perlakuan dengan kombinasi konsentrasi ekstrak khamir 300 mg/l dan mioinositol 300 mg/l, atau ekstrak khamir 400 mg/l dan mioinositol 200 mg/l.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dan publikasi ini dapat terlaksana atas fasilitasi dari Dinas Pendidikan dan Kebudayaan Provinsi Jawa Tengah, melalui program Fasilitasi Penelitian bagi dosen Perguruan Tinggi di wilayah Jawa Tengah, Tahun 2007. Penulis mengucapkan terima kasih pada Dinas Pendidikan dan Kebudayaan Provinsi Jawa Tengah.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2000. Tanaman obat dan museum tanaman obat. Departemen Kesehatan. Jakarta.
- Acton N., Klayman D.L., Rollman I.J, 1985, Reductive Electrochemical HPLC Assay for Artemisinin (Qinghousu), *Planta Med.* 51 : 445-446.
- Aryanti, 2001, *Variasi Kandungan Artemisinin dari Akar Rambut dan Regenerasi Artemisia cina Berg ex Poljakov Sebagai Anti Kanker*, IPB, Bogor.
- Ferreira J.F.S dan Janick J., 1996, *Distribution of Artemisia annua*, *Progress in New Crops*, pp 579 – 584.
- Gagnon, H dan Ibrahim R.K., 1997, Effect of Various Elicitor on The Accumulation and Secretion of Isoflavonoid in White Lupin, *Phytochemistry Vol 44, No. 8, pp: 1463-1467*.
- George dan Sherrington., 1984, *Plant Propagation by Tissue Culture*.
- Huang dan Ling, 1996. Economic Compositae in China. Vol. 2: 431-451, Royal Botanical Garden, Kew.
- Hartanto. N. 1997. Pengaruh pemberian ekstrak khamir terhadap produksi antraknon dari kalus daun ketepeng. UGM, Yogyakarta.
- Indrayanto G., 1987, Produksi Metabolit Sekunder dengan Teknik Kultur Jaringan, *Risalah Seminar Nasional Metabolit Sekunder*, PAU UGM Yogyakarta.

- Klayman D. L, 1985, Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China, *Science* Vol : 228, pp: 1049 – 1055.
- Klayman D. L, 1993, Artemisia annua from Weed to Respectable Anti Malarial Plant Dalam : Kinghorn, AD & Ballandrin, MF (Eds) Human Medicinal Agents from Plant, American Chemical Society Washington, DC. 244
- Staba J. B dan Martinez B., 1988, The Production of Artemisinin in Artemisia annua L. *Tissue Culture Advances in Cell Culture*, Vol 6, pp : 69-87.
- Salisbury F.B. and C.V. Ross. 1995. Plant Physiology. Wadsworth Publishing company. Belmont California.
- 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 Analysis*, Vol. 2. 80 - 83.
- Winata L, 1988, *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*, Lab. Kultur Jaringan Tumbuhan Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB Bogor.
- Zheng, 1994. Biological active substance from genus Artemisia. *Planta Medica*. 64: 295-302

