

KAJIAN KONSERVASI BUAH MERAH MELALUI KULTUR JARINGAN TANAMAN; EKSTRASI , FRAKSINASI BUAH, UJI ANTIOKSIDAN, DAN UJI ANTIDIABETIK

Sumarnie Hasto Priyono

Peneliti di Laboratorium Fisiologi Bidang Botani, Puslit.Biologi Bogor
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Abstract

Buah merah (Pandanus conoideus Lam.) Pandanaceae has several local name in Kelila, Wamena – Papua based on its size, fruit color, leaf color and taste. It has wide distribution and can be found low land to high land. Buah merah contains valuable nutrients and bioactive compounds in abundant/high concentration, such as: β -caroten, tocopherol, fatty acids (oleic acid, linoleic acid, linolenic acid and decanoic acid). Its cultivation had been done local people but not extensively. The easiest way of buah merah propagation was by separating buah merah seedling and stem cutting or by planting its. The aim of the study were to compile the data that support plant identification of buah merah from Kelila, Wamena-Papua, to study its potency for antioxidant and antidiabetic properties and determine the best media in tissue culture for producing buah merah plantlet. The result showed that shoot bud from stem explant cultured in media combination of MS + IBA (2 mg/l) + BA(5 mg/l) produce 10 plantlets, while callus came from leaf tip explant cultured in media combination of MS + BA (5mg/l) + TDZ (0.02 mg/l) The antioxidant test showed that ethyl acetate fraction had good antioxidant activity LC 50 (0.253) while petroleum ether fraction showed good antidiabetic properties with 0.5 % (0.560), 0.25 % (0.593) and control is 0.633.

Key words: (Conservation by plant tissue culture, phytochemistry and biological O- test)

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengenalan morfologi buah merah atau *Pandanus conoideus* Lam. secara kasat mata, oleh masyarakat awam kebanyakan tidak dapat dibedakan pandan buah merah atau pandan yang lainnya karena nyata sulit dibedakan. Buah merah asal kecamatan Kelila Wamena Papua mempunyai nama local yang bermacam-macam seperti maler, ugi, oakelu, kenen, wona, kuambir, gepe,

barugum, magari, werene dan baga berbeda menurut ukuran, warna buah, warna daun, dan rasa. Secara taksonomi tumbuhan ini dikenal dengan nama *P. conoideus* termasuk dalam familia Pandanaceae. Tanaman endemik asal Papua tersebut mempunyai distribusi yang luas penyebarannya mencapai daerah Papua New Guinea, dijumpai dari dataran rendah

sampai dataran tinggi.¹⁾ melaporkan buah merah ditemukan juga tumbuh di bagian utara Maluku yang menyebar dari daerah pantai hingga daerah pegunungan. Diperkirakan lebih dari 30 jenis atau kultivar pandan buah merah dijumpai di Papua. Namun secara garis besar diketahui ada empat kultivar yang banyak dikembangkan karena memiliki nilai ekonomis, yakni kultivar merah panjang, merah pendek, cokelat dan kuning. Warna, bentuk, dan ukuran buah masing – masing jenis berbeda – beda²⁾. Seperti pandan pada umumnya, buah merah mempunyai perawakan lebih besar dan kuat dibanding tanaman buah merah asal Papua lainnya. Habitat *P. conoideus* Lam. dijumpai di kebun - kebun terbuka di dekat areal penghunian karena sudah mulai dibudidayakan dalam skala kecil karena alasan ekonomi, namun dijumpai juga meliar di hutan. Konservasinya dalam secara kuantitas tidak mengkuatirkan meskipun tingkat keaslian atau kualitas tumbuhan mulai harus diperhatikan. Kebijakan lokal tidak memperbolehkan buah merah ini keluar dari Papua hal ini disetujui oleh masyarakat dan kepala adat lokal, Dewan gereja setempat, Dinas Kepolisian dan keamanan setempat, dan Dinas Kehutanan setempat.

Pembudidayaan tumbuhan ini telah dilakukan oleh masyarakat asli Papua tetapi belum secara besar-besaran. Perbanyak tanaman dengan benih yang diperoleh dari biji dan bibit yang berasal dari pemisahan anakan ataupun stek batang merupakan langkah termudah bagi masyarakat untuk mengerjakan perbanyak tumbuhan ini meskipun dengan cara yang sangat sederhana namun bibit/benih yang didapat kurang berkualitas menurut pengamatan penulis di lapang, sehingga perlu perbaikan tehnik yang lebih masa kini dengan terobosan – terobosan yang lebih efisien secara materi (bahan kimia/hormon tumbuh, pupuk, waktu, biaya) dan pertimbangan – pertimbangan yang cerdas sehingga lebih berkualitas. Pertimbangan kualitas dari minyak buah

merah yang baik tentulah berdasar pada aspek – aspek sistim pertanian terpadu yang baik seperti benih atau bibit unggul sebagai sumber tanaman yang akan di budidayakan; pengolahan lahan dan pemupukan yang tepat; sistim pengairan ; sistim pengendalian hama penyakit; pasca panen; dan pemasaran produk³⁾. Bibit unggul sebagai sumber tanaman budidaya perlu diciptakan bibit tanaman hasil kultur jaringan yang dapat dijamin kesamaan jenis tanaman dalam jumlah ribuan yang nantinya akan menghasilkan produk pertanian dalam hal ini buah yang mempunyai kualitas yang sama apabila ditumbuhkan dan dipelihara dengan sistim pertanian yang baik dan benar. Selain jumlah yang banyak, seragam dalam ukuran dan dapat dilakukan berulang – ulang serta berkelanjutan, kultur jaringan sangat cocok digunakan sebagai terobosan sistim pertanian yang baik dalam menunjang industri farmasi dan obat agar keanekaragaman hayati terjaga⁴⁾. Kultur jaringan merupakan salah satu metode untuk mengkonservasi baik tumbuhan liar atau tanaman budidaya guna mendukung keberlangsungan produksi tanaman obat, sehingga tanaman obat dapat tersedia mencukupi kebutuhan industri yang diharapkan⁵⁾. Kalus kultur yang menggunakan sumber eksplan dari bagian tanaman manapun yang bersifat vegetatif dapat bermanfaat untuk riset, pemulia tanaman, studi transformasi genetic. Sel kalus dapat digunakan untuk menghasilkan enzim, obat, flavoring/penyedap dan pewarna alami⁶⁾.

Manfaat dari buah tumbuhan tersebut bermacam – macam, seperti buah yang sudah masak yaitu digunakan sebagai pelengkap sayur masyarakat local ataupun sebagai salah satu unsur pelengkap dalam upacara adat bakar batu⁷⁾. Minyak buah merah didapatkan dari kukusan buah merah yang minyaknya ditampung dan dikumpulkan untuk keperluan masak atau pengobatan. Fungsi minyak merah dari buah merah untuk meningkatkan stamina, pewarna alami makanan dan bahan

kerajinan, kelengkapan sesaji untuk upacara adat, obat cacung, obat penyakit kulit, obat kanker, obat hipertensi, juga obat diabetes melitus²⁾.

Dilaporkan bahwa kandungan kimia buah merah mengandung zat gizi bermanfaat atau senyawa aktif dalam kadar yang tinggi diantaranya betakaroten, tokoferol, serta asam lemak seperti asam oleat, asam linoleat, asam linolenat dan asam dekanolat. Pandanaceae khususnya *P. conoideus* Lam. berfungsi sebagai sumber minyak penyedap bagi masyarakat Wamena yang berpotensi sebagai antioksidan dan diduga sebagai anticancer dan digunakan juga sebagai obat antidiabetes. *P. conoideus* diketahui mengandung senyawa aktif dalam kadar tinggi diantaranya betakaroten, tokoferol, asam lemak. Prospek kedepan dari minyak buah merah ini menjanjikan dapat di ekspor ke luar negeri: Singapura, Malaysia, Cina, Australia dan Amerika Serikat²⁾.

1.2 Tujuan

Tujuan Penelitian untuk menghimpun data – data yang menunjang pengenalan jenis-jenis tumbuhan buah merah dari Wamena Papua dan studi potensinya masih sangat kurang. Guna melengkapi kekurangan data tersebut perlu mengungkap potensinya sebagai bahan obat, mengisolasi kandungan senyawa aktifnya dan upaya perbanyakan serta budidayanya. Usaha perbanyakan dilakukan baik secara kultur jaringan. Isolasi kandungan senyawa aktif untuk bahan obat dilakukan melalui beberapa tahapan antara lain ekstraksi, pemisahan partisi, fraksinasi. Pada setiap hasil langkah kerja dilakukan uji aktivitas biologi (antioksidan, antidiabetik).

2. METODOLOGI

2.1 Kultur Jaringan

Percobaan ini sebagian dilakukan di laboratorium kultur jaringan di College Life

Sciences Zhejiang University, kemudian diulang dikerjakan di laboratorium kultur jaringan Puslit Biologi CSC Cibinong Bogor pada tahun 2006. Penelitian perbanyakan dilakukan untuk mendukung ketersediaan stok bibit buah merah dalam rangka menjaga keberlangsungan produk tumbuhan obat tersebut. Teknik perbanyakan vegetatif melalui kultur jaringan diperlukan untuk menyediakan bibit dalam jumlah banyak dan terus menerus/berkelanjutan sebagai alasan komersial. Pemiakan vegetatif secara kultur jaringan akan menghasilkan tumbuhan terpilih yang telah terbukti sama dengan induknya sehingga secara kualitas dan kuantitas dapat dipertanggung jawabkan. Perbanyakan vegetatif dengan eksplan mata tunas, daun muda terdiri dari beberapa tahap percobaan: evaluasi teknik sterilisasi eksplan untuk mendapatkan kultur aseptik, evaluasi faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perbanyakan tunas seperti zat pengatur tumbuh (ZPT). Perlakuan media kultur jaringan disusun sebagai berikut :

1. MS + IAA (2mg/l) + BA (5 mg/l)
2. MS + IBA (2mg/l) + BA (5 mg/l)
3. MS + NAA (2mg/l) + BA(5 mg/l)
4. Kontrol (MS tanpa hormon)

Sedang untuk menumbuhkan kalus dari eksplan daun muda buah merah disiapkan Media MS padat yang ditambahkan BA (0.5 mg/l + TDZ 0.02 mg/l), BA (0.5 mg/l) + NAA(1 mg/l) dan dilakukan pemeliharaan pada ruangan kultur yang dikondisikan gelap. Keseluruhan prosedur kerja kultur jaringan dipersiapkan sebagai berikut : ruas batang muda dan daun muda tanaman buah merah dipotong diletakkan dalam saringan yang terdapat pada beker glas kemudian diberi aliran air yang mengalir selama 1 jam dilakukan terpisah berfungsi untuk membersihkan dari kotoran induknya lalu dipindahkan dalam beker glas lain yang berisi larutan sterilan yaitu alkohol 75 % . Pengerjaan sterilisasi dilakukan di dalam

laminar flow kemudian dibilas dengan aquadestilata sampai bersih, selanjutnya disterilisasi dengan Hg Cl_2 0.01 % + tween 2 tetes, dibiarkan selama 12 menit sambil dikocok. Pembuangan larutan bekas sterilisasi tersebut ditampung dalam botol khusus demikian juga air bilasan aquadestilata dan akhirnya dibuang ditempat khusus bersama limbah berat cair yang lainnya. Setelah larutan dan material bersih baru dilakukan pemotongan eksplan secara aseptik dan penanaman pada media yang telah dipersiapkan sesuai perlakuan dan jumlah ulangan yang di susun. Pemeliharaan eksplan yang telah diinokulasikan dalam medis MS disimpan di ruangan kultur yang bersuhu 23°C dan penerangan lampu TL 40 watt selama 24 jam/hari. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat ada tidaknya kontaminan, data perubahan eksplan diambil setiap minggu sekali munculnya perubahan bentuk seperti tunas/kalus/akar, warna eksplan dll.

2.2 Kimia dan Uji Potensi

Penelitian Fitokimia dilakukan dengan analisa kimia dari beberapa jenis buah merah sebagai simplisia/bahan tumbuhan tersebut berupa buah dan biji buah merah yang telah masak fisiologis. Bahan buah merah diperoleh dalam keadaan segar kemudian dilepas satu persatu sehingga terpisah dari pendukung buah dan dijemur. Setelah kondisi biji dan buah yang sudah terlepas-lepas kering dari air kemudian ditimbang dan simplisia tersebut di maserasi dalam perkolator, direndam dengan alkohol 96 % selama 24 jam, lalu sarinya diturunkan/dikeluarkan dan diuapkan untuk disarikan lagi sebagai ekstrak kasar dengan alat Rotary evaporator. Kemudian dilakukan uji antioksidan dan uji antidiabetik tahap awal. Tindakan ini untuk melihat langkah awal pengujian tersebut efektif dan perlu dilanjutkan pada tahap berikut yang lebih rinci. Untuk mengetahui analisa kimia selanjutnya dilakukan tahap fraksinasi

dengan beberapa pelarut yang berbeda yang umumnya bertujuan mendapat senyawa kimia tertentu seperti pelarut – pelarut ethanol, ethyl acetat, petroleum ether, heksan, butanol, air dll. Hasil pemisahan pada masing-masing pelarut di uji lagi untuk antioksidan dan antidiabetiknya. Uji antioksidan dikerjakan dengan metode DPPH dan uji antidiabetik dilakukan dengan prinsip inhibitor secara enzimatik menurut metoda Prof.Kawanishi (Kobe Pharmaceutical University, komunikasi personal) untuk mengetahui potensi antidiabetik. Cara kerja untuk uji antioksidan sbb: dengan menggunakan metoda DPPH pada kali pertama tidak berhasil karena UV Spectrophotometer tidak dapat mengabsorpsi larutan contoh karena terlalu pekat sehingga warnanya gelap kemudian akhirnya sample/ crude ekstrak di fraksinasi dengan 4 tahap yaitu : PE/ petroleum ether, EA/ Ethyl acetat, Et-OH/ Ethanol, n-Bu OH, H_2O /air dan sebagian terevaporasi. Hasil fraksinasi (PE,EA,Et.OH, H_2O , dan n-Bu OH) kemudian dibuat larutan dengan konsentrasi 10 mg/l dan 5 mg/l untuk diuji pada UV Spectrophotometer. Nantinya hasil analisis antioksidan akan menunjukkan ekstrak buah merah pada fraksi yang mana(PE,EA,Et.OH, H_2O , dan n-Bu OH) menunjukkan kemampuannya mengabsorpsi DPPH pada 0 detik dan 120 detik pada panjang gelombang 517 nm/ detik dalam 4 menit reaksi pengujian dibanding DMSO dan quercetin dalam hal ini digunakan sebagai kontrol⁸⁾.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Kultur Jaringan

3.1.1 Tahap Sterilisasi

Permasalahan yang dijumpai pada percobaan adalah sterilisasi eksplan dari lapang. Bahan (mata tunas dari batang muda, dan daun muda di sterilisasi secara terpisah dilakukan bertahap dengan air mengalir selama 1 jam, direndam dan di kocok pelan selama 10 menit dalam alcohol

75 %, cuci dan bilas dengan aquades steril kemudian dimasukkan dalam Hg Cl₂ 0.01 % selama 15 menit sebanyak 3 kali, lalu di bilas dengan aquades steril sampai bersih. Eksplan tersebut di tanam secara aseptik dalam petridish bermedia sesuai perlakuan. Kultur buah merah yang diharapkan untuk tumbuhnya kalus disimpan dalam ruangan gelap, suhu 23^o C. Sedangkan kultur mata tunas diletakkan dalam ruang kultur bercahaya dengan pencahayaan lampu TL 40 watt selama 24 jam, suhu 23^o C. Pengamatan dilakukan harian untuk kultur kalus dan mingguan bagi kultur mata tunas.

3.1.2 Tahap Multiplikasi tunas dan kalus

P. conoideus menjadikan eksplan mata tunas yang berasal dari tanaman anakan hasil perbanyakan setek berkembang membentuk tunas pada media MS yang ditambahkan hormone tumbuh IAA(2 mg/l) + BA (5 mg/l), IBA(2 mg/l) + BA(5 mg/l), dan NAA(2 mg/l) + BA(5 mg/l) sekitar 8 – 10 minggu setelah inisiasi. Perlakuan IBA(2 mg/l) + BA(5 mg/l) menghasilkan

anakan paling banyak (10) berbeda nyata dengan perlakuan NAA(2 mg/l) + BA(5 mg/l), dan control pada P < 5 % (3) dengan uji Duncan dimungkinkan tercapai kondisi hormonal internal dan eksternal yang mendorong tumbuh kembang sel tunas memecah diri menjadi banyak apabila dibandingkan kedua perlakuan yang lainnya. Sedangkan eksplan daun muda membentuk kalus pada media MS yang ditambahkan hormone tumbuh BA (0.5 mg/l + Thidiazuron 0.02 mg/l) setelah 23 hari masa tanam, dan media MS ditambah hormone tumbuh BA (0.5 mg/l) + NAA (1 mg/l) kalus tumbuh setelah 30 hari masa tanam. Kalus berwarna putih saling terlepas/friable.. Kedua media tersebut kaya macro elemen, terutama nitrogen termasuk nitrat dan ion ammonium, gula dan kandungan beberapa vitamin. Inisiasi dari sel yang membelah diri dan membutuhkan suplai sitokinin dan auksin pada media secara proporsional. Auksin dalam konsentrasi tinggi mendukung pertumbuhan yang digunakan dalam memproduksi kalus⁹.

Tabel 1. Hasil kultur jaringan mata tunas *P. conoideus* umur 8 minggu pada beberapa macam media MS ditambah hormone tumbuh BA, IAA, IBA dan NAA

NO.	Perlakuan media kultur jaringan	Jumlah tunas/anakan	%-ase tumbuhnya tunas/anakan
1.	MS + IAA(2 mg/l) + BA (5 mg/l)	6 b	90 a
2.	MS + IBA(2 mg/l)+BA(5 mg/l)	10 c	90 a
3.	MS + NAA(2 mg/l)+BA(5 mg/l)	3 a	85 a
4.	MS tanpa hormon	0	0

Keterangan: Huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata pada uji Duncan taraf 5 %

3.2 Analisa Kimia

Ekstraksi, Fraksinasi, Uji antioksidan dan Uji Antidiabetik. Simplisia berupa buah dan biji *P. conoideus* Lam. sebanyak 590 gram berat kering, di ekstrak dengan ethanol 96 % melalui prinsip maserasi, filtrasi dan dipekatkan sehingga dihasilkan 168.80 gram (28.13 %) berupa material

padat yang bercampur larutan seperti minyak berwarna merah¹⁰). Analisis antioksidan dengan metoda DPPH pada kali pertama tidak berhasil karena UV Spectrophotometer tidak dapat mengabsorpsi larutan contoh karena terlalu pekat sehingga warnanya gelap kemudian *akhirnya sample/*

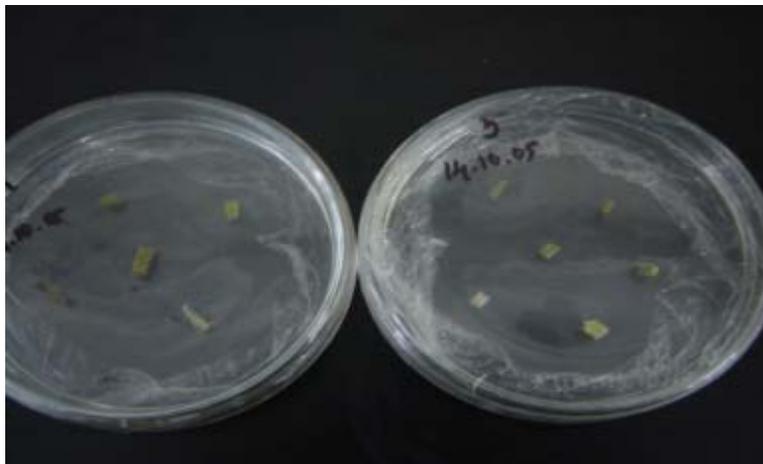
crude ekstrak di fraksinasi dengan 4 tahap yaitu :

- *petroleum ether (PE)*:
148.4 gram/ 89.50 %
- *ethyl acetate(EA)*: 6.2 gram/ 3.73 %
- *ethanol (E)*: 5.5 gram/ 3.31%
- *air*: 2.0 gram/1.20 %
- *evaporasi & lainnya*: 3.7 gram/2.23 %

Hasil fraksinasi (PE,EA,Et.OH, H₂O,dan n-Bu OH) kemudian dibuat larutan dengan konsentrasi 10 mg/l dan 5 mg/l untuk diuji pada UV Spectrophotometer dan hasilnya disajikan dalam tabel.2.



Gambar 1. Kultur mata tunas buah merah pada medium MS perlakuan N0.2, N0.1 dan N0.3 dari kiri ke kanan



Gambar 2. Stadium awal pertumbuhan eksplan daun yang sebagian membentuk kalus didalam media MS ditambahkan BA (0.5 mg/l + TDZ 0.02 mg/l) pada umur 23 hari tanam.

Tabel 2. Hasil uji /analisa antioksidan dari fraksi buah merah *P.conoideus* Lam.

No.	Bahan yang di analisa	Persen Reduksi pada 120 detik	DPPH Absorban pada 0 detik	DPPH Absorban pada 120 detik
1	DMSO	22.09 %	0.507	0.395
2	Ethanol	43.80 %	0.507	0.285
3	H ₂ O/air	19.92 %	0.507	0.406
4	Ethyl acetat	50.09 %	0.507	0.253
5	Petroleum ether	15.97 %	0.507	0.426
6	Crude extract	39.84 %	0.507	0.305
7	Quercetin	41.81 %	0.507	0.295
8	n-Butanol	10.29 %	0.486	0.436

Keterangan : tiga ulangan per sampel

Hasil analisis antioksidan menunjukkan ekstrak buah merah pada fraksi EA/ Et.OH menunjukkan kemampuannya mengabsorpsi DPPH pada 0 detik dan 120 detik pada panjang gelombang 517 nm/ detik dalam 4 menit reaksi pengujian

dibanding DMSO dan quercetin dalam hal ini digunakan sebagai kontrol. Sedangkan crude ekstraknya memiliki kemampuan hampir setara dengan quercetin dan bahkan lebih tinggi nilainya bila dibanding dengan DMSO¹¹⁾.

Tabel 3. Hasil uji antidiabetik *P.conoideus* dengan enzim á glucosidase

Konsentrasi larutan uji	Kontrol	Daun salam	Ekstrak <i>P.conoideus</i> Fraksi PE	Ekstrak <i>P.conoideus</i> Fraksi EA	Ekstrak <i>P.conoideus</i> Fraksi Etanol
0.1 %	0.633	0.391	0.615	0.580	0.787
	0.616	0.386	0.573	0.601	0.407
0.5 %		0.518	0.560	0.628	0.677
		0.502	0.564	0.633	0.757
0.25 %		0.561	0.593	0.623	0.679
		0.543	0.577	0.633	0.767

Hasil uji ekstrak *P.conoideus* dengan berbagai fraksinasi untuk tahap uji antidiabetik terhadap enzim á gluco-sidase ditunjukkan pada tabel. 3,bahwa ekstrak buah merah pada fraksi PE , EA dan Et.OH masih relative lebih rendah nilainya dibanding kontrol. Sedangkan apabila dibandingkan dengan daun salam ekstrak buah merah pada fraksi PE konsentrasi 0.5 % dan 0.25 % menunjukkan nilai yang sedikit lebih tinggi namun masih mempunyai kecenderungan memiliki daya antidia-betik hampir setara dengan daun salam Demikian juga pada ekstrak buah merah fraksi etanol konsentrasi 0.1 % menunjukkan nilai hampir setara dengan kemampuan daun salam pada konsentrasi

yang sama menguji daya antidiabetik. Perlu diketahui daun salam telah teruji sebagai bahan yang digunakan untuk uji antidiabetik. Penelitian aktivitas hipoglikemik telah dilakukan dengan metode uji toleransi glukosa oral pada beberapa tumbuhan yang menghasilkan dua buah tumbuhan yang prospektif sebagai hipoglikemik yaitu diantaranya *Eugenia polyantha* Wight. / daun salam¹²⁾.

4. KESIMPULAN

- Hasil kultur jaringan *P. conoideus* Lam. berupa anakan dari eksplant mata tunas dapat menjadi salah satu cara konservasi baik ex-situ maupun in-situ

sehingga kesamaan jenis dapat dipertanggungjawabkan untuk dikembakikan lagi kealam.

- Perlakuan terbaik untuk menghasilkan tunas anakan terbanyak 10 buah yang ditumbuhkan pada media MS + IBA(2mg/l) + BA (5 mg/l). Sedangkan kalus tumbuh dari eksplan ujung daun yang ditumbuhkan pada media MS +BA (0.5 mg/l + Thiodiazuron 0.02 mg/l).
- Hasil fraksinasi *P.conoideus* Lam. dengan ethyl acetat menunjukkan daya antioksidan pada konsentrasi rendah, artinya buah merah berpotensi sebagai antioksidan dalam konsentrasi yang rendah.
- Hasil uji antidiabetik dengan enzim alpha glucosidase menunjukkan bahwa fraksi PE, EA dan etanol menunjukkan kemampuannya sebagai antidiabetik pada konsentrasi 0.5 %, dan 0.25 %., sehingga berpotensi sebagai antidiabetik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, 2003. Concept paper for the FAO Expert Consultation on Good Agricultural Practice, Rome, 10 – 12 November 2003. 27 p.
2. Fu Cheng Sin, 2003. History, Current status and Development of Traditional Chinese Medicine. Indonesia-China seminar on Development of Traditional Medicines. Kartika Chandra Hotel. Jakarta 8-9 December 2003.
3. Francisco J. Camacho & Aaron Liston, 2001. Population structure and genetic Diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) Based on intersimple Sequence Repeats (ISSR). American Journal of Botany 88(6): 1065 – 1070, 2001
4. Hartmann H., Kester D.E., F.T. Davies & R. Geneve, 1997. Plant Propagation Principles and Practices. Sixth Edition. Prentice Hall. New Jersey. P.596.
5. Heyne, K. 1987. Tumbuhan berguna Indonesia. Cetakan 1. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, p. 1615-1617.
6. H. Machmud Yahya & Bernard T. Wahyu Wiryanta, 2005. Khasiat and usage Buah Merah : Gold from Papua. Agromedia Pustaka Jakarta 84 p.
7. Made Budi & Fendy R. Paimin, 2004. Buah Merah. Cet. 1., Jakarta: Penebar Swadaya. 76 halaman.
8. Richard J.P. Cannell, 1998. Natural products Isolation. Part I. Humana Press Totowa, New Jersey.
9. Sumarnie, 2005. Final report Good Agriculture Practise. Training Collaboration Research Between Zhejiang University P.R. China & LIPI Indonesia. September 2005- November 2005, 12 p.
10. Sumarno, 2003. Good Agriculture Practices and Continuously Supply of Traditional Medicines Raw Materials. Indonesia – China Seminar on Development of Traditional Medicines. Kartika Chandra Hotel. Jakarta 8 – 9 December 2003.
11. Sayekti S., Muhtadi A., Supriyatna, 2005. Aktifitas hipoglikemik daun salam dan herba bulu lutung. Jurusan farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Universitas Padjadjaran Jatinangor Bandung. <http://www.kalbe.co.id>
12. Wahyu Dyatmiko, Mulya Hadi Santosa, Achmad Fuad Hafid, 2000. Free Radical Scavenger Activity on Molecular and Cellular System of Aqueous Extract of Zingiberaceae Medicinal Plant. Research Center of Airlangga University. 58 p.