

REVIEW: PERKEMBANGAN PRODUKSI HASIL METABOLISME SEKUNDER CAPSAICIN DENGAN BERBAGAI METODE *IN VITRO*

Iis Nuraeni, Tina Rostinawati

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran.
Jalan Raya Bandung Sumedang, km. 21, Jatinangor, 45363
iisnuraeni72@gmail.com

ABSTRAK

Capsaicin merupakan salah satu metabolit sekunder tanaman cabai yang memberikan rasa pedas. Capsaicin mempunyai potensi yang tinggi dalam bidang farmasi sebagai anti kanker, anti artritis dan analgesik di samping turut mempunyai nilai komersil dalam industri makanan. Modifikasi komposisi medium pada kultur *in vitro* dapat digunakan untuk meningkatkan penghasilan capsaicin, metode yang dilakukan diantaranya induksi kalus, imobilisasi sel dan jaringan plasenta, dan Elisitasi. Metode yang terbaik yang dapat digunakan saat ini adalah Elisitasi karena dapat menghasilkan produksi capsaicin dalam jumlah yang tinggi yaitu 1600 µg/g dengan elisitor.

Kata Kunci: Capsaicin, In Vitro, Induksi Kalus, Imobilisasi Sel dan Jaringan Plasenta, Elisitasi

ABSTRACT

Capsaicin is one of the secondary metabolites of chili plants that provide a spicy flavor. Capsaicin has a high potential in the pharmaceutical field as an anti-cancer, anti-arthritis and analgesic in addition to having a commercial value in the food industry. Modification of the composition of the medium in in vitro cultures can be used to increase capsaicin incomes, among other methods, callus induction, cell immobilization and placental tissue, and elicitation. The method that can be used today is elicitation because it can produce a large amount of capsaicin production of 1600 µg / g with elicitor.

Keywords: Capsaicin, In Vitro, Callus Induction, Cell Immobilization and Placental Tissue, Elicitation

Diserahkan: 4 Juli 2018, Diterima 4 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Capsaicinoid yang menyebabkan rasa pedas dari cabai adalah senyawa turunan dari fenilpropanoid yaitu capsaicin, dimana senyawa capsaicin merupakan capsaicin primer yang terdapat dalam cabai, diikuti oleh dihidrocapsaicin, dan senyawa lainnya. Capsaicin dan dihidrocapsaicin merupakan capsaicinoid paling banyak dengan jumlah 90% dari total capsaicinoid dalam cabai. Capsaicin (trans-8-metil- N -vanilil-6-

nonenamida) adalah sebuah kristalin, lipofilik, tidak berwarna dan tidak mudah menguap (volatile) dengan rumus molekul $C_{18}H_{27}NO_3$. Berat molekul dari capsaicin adalah 305,40 g/mol dan merupakan suatu lemak, alkohol juga larut dalam minyak. Pertama kali dikristalisasikan pada tahun 1876 oleh Tresh, dan struktur molekul diselesaikan oleh Nelson dan Dawson pada tahun 1919 (Nelson and Dawson, 1923).

Capsaicin terdapat pada plasenta buah, tempat melekatnya biji (Astawan dan Kasih, 2008). Capsaicin yang merupakan sebuah alkaloid, digunakan sebagai aditif makanan untuk memberikan rasa pedas dalam makanan yang diformulasikan. Capsaicin juga digunakan dalam sediaan farmasi sebagai stimulan pencernaan dan untuk gangguan rematik.

Biosintesis capsaicin pada tanaman didefinisikan oleh dua jalur: fenilpropanoid, yang menentukan struktur fenolik, dan metabolisme asam lemak, yang menentukan molekul asam lemak (Ochoa-Alejo and Gómez-Peralta, 1993). Struktur fenolik berasal dari jalur fenilpropanoid, di mana fenilalanin adalah prekursor. Pembentukan asam ferulat dari fenilalanin dipahami dengan baik pada tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Empat enzim, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamic acid-4-hydroxylase (C4H), asam *r*-coumaric-3-hydroxylase (C3H), dan asam caffeic-*o*-methoxytransferase (CAOMT) terlibat dalam proses. Capsaicinoids terbentuk dari vanillylamine dan isocapryl-CoA melalui capsaicinoid synthetases (CS) (Fujiwake, et al., 1982; Sukrasno dan Yewman, 1993; Curry, et al., 1999).

Capsaicin adalah molekul kecil dengan titik leleh rendah dan hidrofobik sedang. Sifat-sifat ini memfasilitasi penetrasi stratum korneum kulit oleh capsaicin dari aplikasi topikal. Capsaicin telah digunakan

selama bertahun-tahun sebagai pengobatan topikal untuk kondisi nyeri kronis, termasuk neuralgia *postherpetic*, neuropati diabetes yang menyakitkan, dan osteoarthritis. Namun, capsaicin diklasifikasikan sebagai iritan, menyebabkan sensasi terbakar lokal, eritema, atau menyengat, dan aerosol capsaicin dapat menyebabkan batuk atau bersin. Oleh karena itu, capsaicin harus ditangani dengan hati-hati (Katritzky, 2003).

Dalam bidang farmasi selain untuk meredakan rasa sakit atau nyeri, capsaicin juga dikenal memiliki aktivitas antikanker (Surth, 2002). Ketika capsaicin digunakan melawan kultur sel kanker, ditemukan dapat mencegah relokasi sel kanker payudara; dan juga berhasil membunuh sel kanker prostat. Ketika dihydrocapsaicin ditambahkan, hal tersebut dapat menginduksi apoptosis pada sel-sel kanker usus manusia (Oh, et al., 2008; Thoennissen, et al., 2010; Yang, et al., 2010). Capsaicin juga diujicobakan sebagai obat diabetes oleh peneliti asal Toronto, Canada. Dia melaporkan bahwa resistensi insulin dan stres sel β pada tikus NOD prediabetic dicegah ketika neuron TRPV1 + dihilangkan. TRPV1NOD, terlokalisasi ke lokus diabetes-risiko *Idd41* yang merupakan mutan hipofungsional, mediasi neurogenik depresi tertekan. Memberikan substansi neuropeptida P melalui suntikan intra-arteri ke dalam pankreas NOD membalikkan resistensi insulin normal (Razavi, et al., 2006).

Capsaicin mempunyai potensi yang tinggi dalam bidang farmasi sebagai anti kanker, anti arthritis dan analgesik di samping turut mempunyai nilai komersil dalam industri makanan (Rao and Ravishankar, 2002 ; Satyanarayana, 2006 ; Vanisree, et al., 2004).

POKOK BAHASAN

Metode

Induksi Kalus

Kecambah cabai rawit putih berumur 14 hari diletakkan dalam petridish dan dipotong bagian hipokotil 0,5 - 1 cm. Hipokotil ditanam pada medium MS dengan variasi kadar nutrien dan kombinasi auksin-sitokinin secara aseptis. Mulut botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan disegel dengan *plastic wrap*. Botol kultur diletakkan di ruang inkubasi pada suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Kurniati, dkk., 2007).

Imobilisasi Sel dan Jaringan Plasenta

Buah hijau dari *C. annuum* (15-20 hari) yang permukaan disterilkan dengan 0,1% (b / v) merkuri klorida selama 7 menit dan dicuci dengan air suling steril. Jaringan plasenta dipotong di bawah kondisi aseptik dan dipotong menjadi bagian 2-3 mm. Kemudian bagian jaringan plasenta diimobilisasikan.

Imobilisasi sel dan jaringan plasenta (1g / 40 ml medium) dikultur dalam medium MS cair yang dilengkapi dengan 3% sukrosa, 2 mg 1-1 2,4-D dan 0,5 mg 1-1 KN, dengan

atau tanpa elisitor. Medium dengan elisitor yang tergabung disterilkan dengan autoclaving pada 1,3 kg / cm² selama 20 menit, sebelum inokulasi dengan manik-manik. Sel-sel dan jaringan imobilisasi yang dikulturkan dalam medium cair diagitasi pada 90 RPM pada *rotary shaker* di bawah cahaya kontinu (2000 lux) menggunakan tabung fluoresen sebagai sumber cahaya. Viabilitas sel dan jaringan plasenta imobilisasi diuji dengan teknik *fluorescein diacetate* (Widholm, 1972). Secara berkala, kultur dipanen, manik-manik dan medium dipisahkan dan dianalisis untuk produksi capsaicin (Johnson, et al., 1990).

Elcitation

Sampel murni dari curdian, xanthan dan chitosan diisolasi dari *Alcaligenes faecalis* (Harada 1979). Curdian dan xanthan diberikan pada konsentrasi 0,2 mg/ml medium. Ketika ditambahkan secara tunggal dan untuk mempelajari efek gabungan mereka masing-masing dimasukkan 0,1 mg / ml. Sodium alginat [Loba Chemie] pada tingkat 0,05 dan 0,1 % digunakan sebagai elisitor. Penambahan kitosan ke medium adalah 150 µg / ml.

Proses Ekstraksi dan Pemurnian

Partisi capsaicin dalam ATPS

Jumlah berat polimer dan garam yang telah ditentukan ditambahkan ke 10 mL tabung sentrifugasi, dan air suling

ditambahkan ke tabung untuk mencapai massa akhir 10 g di setiap sistem. Setelah *Capsicum oleoresin* ditambahkan, semua komponen dicampur dengan baik, dan pH sistem dikontrol menggunakan BR buffer (penyangga Britton-Robinson, terdiri dari 0,04 M asam fosfat, 0,04 M asam asetat, 0,04 M asam borat dan 0,20 M natrium hidroksida). Kemudian, setiap sistem disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit untuk memfasilitasi pemisahan fasa. Fase atas, yang telah terbukti memusatkan capsaicin dalam penelitian sebelumnya, dipilih untuk pemurnian lebih lanjut. Semua percobaan dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) dan nilai rata-rata dilaporkan.

Pemisahan dan Pemurnian Capsaicin oleh ADS-17 MAR

Ekstrak capsaicinoid pada fase atas ATPS diuapkan pada rotary evaporator untuk menghilangkan etanol dan diencerkan dengan air suling, dan pH disesuaikan menjadi 3 dengan 2% HCl atau 2% NaOH. Konsentrasi capsaicin yang diperoleh adalah 84,93 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Percobaan adsorpsi / desorpsi dinamis dilakukan dalam kolom gelas (2,5x20 cm), dan panjang resin yang dikemas adalah 15 cm. Volume pemuatan ADS-17 dan laju aliran sampel dipertahankan konstan pada 150 mL dan 1,5 BV / jam, masing-masing. Capsaicin dielusi menggunakan metode elusi gradien untuk menghilangkan capsaicin.

Eluat dikumpulkan oleh kolektor pecahan BSZ-100 (Shanghai Jiapeng Technology Co, Ltd Shanghai, Cina). Laju alir dari elusi gradien adalah 1,0 BV / jam.

Pemisahan dan Pemurnian Capsaicin oleh AB-8 MAR

Setelah mengeluarkan etanol pada rotary evaporator, ekstrak capsaicinoid yang diperoleh menggunakan ADS-17 MAR diencerkan dengan air suling, dan pH disesuaikan menjadi 2 dengan 2% HCl atau 2% NaOH. Konsentrasi capsaicin yang diperoleh adalah 85 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Percobaan adsorpsi / desorpsi dinamis dilakukan dalam kolom kaca yang dikemas (1,2 $\times$ 25cm), dan panjang resin yang dikemas adalah 20 cm. Volume pemuatan AB-8 dan laju aliran sampel dipertahankan konstan pada 50 mL dan 2,0 BV / jam. Capsaicin dielusi menggunakan metode elusi gradien untuk menghilangkan capsaicin. Eluat dikumpulkan oleh kolektor pecahan BSZ-100. Laju alir dari elusi gradien adalah 1,0 BV / jam.

Analisis HPLC

Konsentrasi capsaicin dalam setiap fase berair diidentifikasi dengan HPLC. Sistem HPLC analitis yang digunakan selama penelitian ini dilengkapi dengan Shimadzu Detektor dioda array SPD-M20A. Sebuah ODS-3 kolom Inertsil (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm) (Shimadzu Research Laboratory Co, Ltd Shanghai, Cina) digunakan untuk pemisahan

kromatografi dan dipertahankan pada 35°C. Elusi dilakukan dengan fase gerak yang terdiri dari metanol-air (70:30, v / v) pada laju alir 0,5 mL / menit. Sampel 10 µL diinjeksikan, dan dielusi pada panjang gelombang 280 nm.

Salah satu penelitian telah dilakukan oleh Kurniati, dkk., 2007 terkait penelitian induksi kalus yang menggunakan variasi kadar nutrisi MS ($\frac{1}{2}$ resep medium MS, $\frac{3}{4}$ resep medium MS, 1 resep medium MS, $1\frac{1}{4}$ resep medium MS, dan $1\frac{1}{2}$ resep medium MS) dan kombinasi auksin-sitokinin (1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP, 2 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kin, 0,04 mg/L IAA + 2 mg/L BAP). Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium 1 MS dengan penambahan IAA + BAP dapat menginisiasi kalus tercepat (5,67 hari), berat basah kalus terbesar (0,67 g), dan dapat menginduksi eksplan (100%). Tingginya kadar nutrisi medium MS dan penambahan kombinasi ZPT cenderung meningkatkan kandungan capsaicin. Medium $1\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan 2,4-D + Kin atau IAA + BAP dapat meningkatkan kandungan capsaicin 1,2 kali dibandingkan dengan medium 1 MS + 2,4-D + Kin atau 1 MS + IAA + BAP dan dapat meningkatkan kandungan capsaicin 1,4 kali dibandingkan dengan medium $1\frac{1}{2}$ MS kontrol.

Produksi capsaicin melalui kultur kalus ini relatif rendah jika dibandingkan dengan kandungan capsaicin pada buah cabai

rawit putih (Sukrasno, dkk., 1997) maupun produksi capsaicin melalui kultur suspensi sel (Kehie, et al., 2012) dan kultur imobilisasi sel (Rao and Ravishankar, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa metode kultur kalus kurang efektif untuk memproduksi metabolit sekunder capsaicin dalam jumlah yang besar. Selain itu, produksi metabolit sekunder dapat dipacu dengan adanya prekursor pada medium (Nunez-Palenius and Ochoa-Alejo, 2005 dan Prasad, et al., 2005).

Menurut Kalidass, et al., (2010), produksi metabolit sekunder pada kultur kalus dapat dikontrol melalui faktor lingkungannya, salah satunya adalah dengan memberi variasi pada komposisi medium.

Studi tentang konversi intermediet produksi capsaicin dalam imobilisasi sel dan jaringan plasenta terimobilisasi mengungkapkan bahwa asam *caffeic* dan asam ferulat tidak terdeteksi pada kultur imobilisasi sel. Sebaliknya, plasenta imobilisasi memberikan tingkat vanillamine lebih dari 10 kali lipat lebih tinggi dan 124 pg asam ferulat. Kandungan capsaicin dan dihydrocapsaicin adalah 30- dan 22,6 kali lipat lebih tinggi pada plasenta daripada di sel yang diimobilisasikan. Hasil ini menunjukkan bahwa jaringan plasenta memiliki konversi tinggi L-fenilalanin, asam *caffeic*, asam coumaric, dan asam cinnamic ke capsaicin moieties sebagaimana tercermin dalam jumlah yang lebih tinggi dari

capsaicinoids dan intermediat lainnya. Namun, kandungan vanillylamine yang tinggi pada plasenta terimobilisasi menunjukkan bahwa hal itu mungkin tidak membatasi produksi capsaicinoid. imobilisasi sel juga menunjukkan keberadaan vanillylamine, yang menunjukkan bahwa kedua sistem aktif dalam memproduksi intermediat ini. Secara umum, plasenta imobilisasi akan memiliki proses biokonversi yang efisien untuk melakukan *biotransforming* intermediat jalur capsaicinoid, sehingga menghasilkan produksi capsaicin dan dihydrocapsaicin yang lebih tinggi (Johnson, 1992).

Selanjutnya dengan menggunakan metode *elicitation* dalam kultur sel tanaman telah dilaporkan dalam berbagai spesies tanaman (Darvill, et al., 1984). *Elicitation* dapat dipertimbangkan untuk mengatasi masalah rendahnya produktivitas sel tumbuhan untuk aplikasi industri. Beberapa elisitor abiotik dan biotik telah dikenal untuk meningkatkan produksi fitokimia dalam sel kultur oleh beberapa lipatan (DiCosmo and Misawa 1985). Selain itu, pelepasan senyawa biosintesis dari sel ke dalam media akan meningkatkan nilai ekonomi untuk proses aplikasi industri.

Elicitation capsaicin dan phenolics dalam kultur sel *C.frutescens* dengan seiring peningkatan aktivitas fenilalanin amonia lyase dimediasi oleh *Gliocladium*

deliquescens telah dilaporkan (Holden, et al., 1988).

Elisitor Curdlan dan xanthan menghasilkan produksi capsaicin 1600 µg/g FW (Johnson, et al., 1991. Selain itu, efek sinergistik mereka pada sintesis capsaicin mungkin berguna dalam skala operasi. Elisitor lain seperti, natrium alginat atau chitosan kurang efektif dibandingkan kombinasi curdlan dan xanthan (Ravishankar, et al., 1999).

Selanjutnya yaitu pemisahan dan pemurnian Capsaicin. Capsaicin diekstrak dari *Capsicum oleoresin* menggunakan sistem fase dua air (ATPS) terdiri dari kopolimer etilena oksida-propilena oksida (EOPO), garam dan etanol. Capsaicin terkonsentrasi di fase polimer kaya atas. Untuk menentukan kondisi optimal, partisi capsaicin dalam ATPS diselidiki, mempertimbangkan percobaan faktor tunggal termasuk konsentrasi garam dan polimer, pH buffer, konsentrasi etanol, pembebanan sampel dan durasi ekstraksi. Metodologi permukaan respon diterapkan untuk menyelidiki efek dari konsentrasi polimer, pH buffer dan pemuatan sampel pada partisi capsaicin. Hasil capsaicin 95,5% diperoleh menggunakan sistem ekstraksi optimal, yang terdiri dari 16,3% UCON 50-HB-5100/10% K₂HPO₄ / 1% etanol, pH buffer 4,35 dan 0,24 g *Capsicum oleoresin*. Capsaicin dimurnikan dari ekstrak capsaicinoid

menggunakan metode two-step macroporous adsorption resin (MAR). Setelah pemurnian menggunakan MAR ADS-17 non-polar, pemulihan dan kemurnian capsaicin masing-masing adalah 83,7% dan 50,3%,. Setelah pemurnian menggunakan MAR-8 yang kurang polar, pemulihan dan kemurnian capsaicin masing-masing adalah 88,0% dan 85,1% (Fan, et al., 2017).

Strategi Meningkatkan Hasil Capsaicin

Dengan kemajuan bioteknologi, penelitian tentang kultur jaringan tanaman menjadi lebih aktif tidak hanya di institusi akademis tetapi juga di industri. Maka dari itu, perlu adanya suatu aplikasi industri teknologi untuk dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Telah dilaporkan bahwa tingkat sukrosa mempengaruhi akumulasi metabolit sekunder dalam kultur sel tumbuhan. Stres osmotik yang dibuat oleh sukrosa merupakan faktor kemungkinan yang bertanggung jawab untuk peningkatan metabolit sekunder. 8% (b / v) konsentrasi sukrosa ditemukan menjadi optimal dalam kisaran konsentrasi yang diuji 4-12% (b / v) untuk akumulasi alkaloid (Knobloch and Berlin, 1980). Namun, efek sukrosa pada akumulasi metabolit sekunder juga tergantung pada spesies tanaman dan juga pada alkaloid. Semua media kultur jaringan tanaman mengandung sumber nitrat dan nitrogen amonium. Namun, jumlah

produk sekunder yang terakumulasi juga ditentukan oleh rasio amonium terhadap nitrat dan tingkat keseluruhan nitrogen total. Telah ditemukan bahwa berkurangnya jumlah total nitrogen meningkatkan hasil capsaicin dalam *Capsicum frutescens*, antrakuinon pada *Morinda citrifolia* dan anthocyanin pada spesies *Vitis* (Zenk, 1975 ; Yeoman, et al., 1980; Yamakawa, et al., 1983).

Prekursor *feeding* adalah metode yang populer untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dalam sel-sel kultur. Konstituen capsaicin isocapric ke kultur sel *Capsicum frutescens* dapat meningkatkan akumulasi keseluruhan capsaicin dalam kultur sel (Yeoman, et al., 1980).

SIMPULAN

Produksi melalui metode kultur jaringan secara *in vitro* merupakan sebuah alternatif yang efektif, sangat ekonomis, dan sejumlah besar capsaicin dapat diperoleh. Metode yang saat ini efektif untuk memproduksi capsaicin dengan jumlah yang tinggi yaitu metode kultur *elicitation* yaitu 1600 µg/g dengan menggunakan elisitor.

Untuk penelitian lebih lanjut, studi klinis perlu dilakukan untuk menjamin otentikasi dari efikasi capsaicin dalam mengobati berbagai penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

- Astawan, M. dan Kasih, A. L. 2008. *Khasiat Warna Warni Makanan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Darvill, M.A., Albersheim, P., Schols, H.A., et al. 1984, An Hypothesis: The Same Six Polysaccharides are Components of The Primary Cell Walls of All Higher Plants, *Prog. Biotechnol*, 14: 47–55.
- DiCosmo and M. Misawa. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends Biotechnol*, 3: 318- 322.
- Holden, M.A., Holden., and M.M. Yeoman. 1988. The effects of fungal elicitation on secondary metabolism in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In: R.J. Robins and M.J.C. Rhodes (Eds.), *Manipulating Secondary Metabolism in Culture*, Cambridge University Press, pp. 67 - 72.
- Johnson, T.S., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V. 1990. In vivo capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. *Plant Sci*, 70: 223–229.
- Johnson, T.S., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V. 1991. Elicitation of capsaicin production in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Food Biotechnol*, 5: 197–205.
- Johnson, T.S., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V. 1992. Separation of Capsaicin from Phenylpropanoid Compounds by High Performance Liquid Chromatography to Determine the Biosynthetic Status of Cells and Tissues of *Capsicum frutescens* Mill. In *Vivo and in Vitro*. *J. Agrlc. Food Chem*, 40: 2461-2463.
- Kalidass, C., Mohan, V. R., and Daniel, A. 2010. Effect of Auxin and Cytokinin on Vincristine Production by Callus Culture of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 283-288.
- Katritzky, 2003. Model Compounds of Caged Capsaicin: Design, Synthesis, and Photoreactivity. *J. Org. Chem.*, 68(23).
- Kehie, M., Kumaria, S., and Tandon, P. 2012. Osmotic Stress Induced Capsaicin Production in Suspension Cultures of *Capsicum chinense* Jacq.cv. Naga King Chili. *Acta Physiol Plant*, 34(2).
- Knobloch, K.H. and Berlin, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. G. Don. *Z Naturforsch*, 35C: 551–6.
- Kurniati, Eveline E., Mursyanti, L. M., dan Ekawati Purwijantiningsih. 2007. Induksi Kalus dan Penghasilan Capsaicin pada Variasi Kadar Nutrien MS dan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh. *Jurnal Agrikultur*, 1(1).
- Nelson, E.K. and Dawson, L.E. 1923. The constitution of capsaicin, the pungent principle of *Capsicum*. *III. J. Am. Chem. Soc*, 45: 2179-2181.
- Nunez-Paleniuss, H. G., and Ochoa-Alejo, N. 2005. Effect of Phenylalanine and Phenylpropanoids on The Accumulation of Capsaicinoids and Lignin in Cell Cultures of Chili Pepper (*Capsicum Annuum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41: 801-805.
- Ochoa-Alejo, N. and Gómez-Peralta, J. E. 1993. Activity of Enzymes Involved in Capsaicin Biosynthesis in Callus Tissue and Fruits of Chili Pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Physiol*, 141: 147-152.
- Oh SH, Kim YS, Lim SC, et al. 2008. Dihydrocapsaicin (DHC), a saturated structural analogue of capsaicin, induces autophagy in human cancer cells in a catalase-regulated manner. *Autophagy*, 4: 1009–1019.
- Prasad, B. C. N., Gururaj, H. B., Kumar, V., et al. 2005. Influence of 8-Methyl-Nonenoic Acid on Capsaicin Biosynthesis in In Vivo and In Vitro Cell Cultures of *Capsicum* Spp. *Central Food Technological Research Institute*.

- Rao, S. Ramachandra and Ravishankar, G.A. 2002. *Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv.*, 20: 101-153.
- Ravishankar GA, Bhyalakshmi N, and Rao, S. Ramachandra. 1999. Production of food additives. In: Ramawat KG, Merillon JM, editors. *Biotechnology: Secondary Metabolites*. New Delhi: Oxford IBH, p. 89–110.
- Razavi R, Chan Y, Afifiyan FN, et al. 2006. "TRPV1+sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes." *Cell*. 15;127(6): 1123-35.
- Satyanarayana, M. 2006. *Capsaicin and Gastric Ulcers*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46(4): 275-328.
- Sukrasno, Kusmardiyani, S., Tarini, S., dkk. 1997. Kandungan Kapsaisin dan Dihidrokapsaisin pada Berbagai Buah *Capsicum*. *JMS*. 2: 28 – 34.
- Thoennissen NH, O'Kelly J, Lu D, et al. 2010. Capsaicin causes cell cycle arrest and apoptosis in ER-positive and-negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*, 29: 285–296.
- Vanisree, M., Chen-Yue, L., Shu-Fung., et al. 2004. *Studies on the Production of Some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. Bot. Bull.Acad.Sin.* 45: 1-22.
- Widholm. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47: 189-194.
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, et al. 1983. Production of anthocyanins by Vitis cells in suspension culture. *Agric Biol Chem*, 47: 2185–91.
- Yang, Z.H., Wang, X.H., Wang, H.P., et al. 2010. Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. *Urology*, 75: 735–741.
- Yeoman, M.M., Meidzybrodzka, M.B., Lindsey, K., et al. 1980. The synthetic potential of cultured plant cells. In: Sala F, Parisi B, Cella R, Cifferi O, Editors. *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*. Elsevier, p. 327–43.
- Zenk, M.H., El-Shagi, H., and Schulte, U. 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of Morinda citrifolia. *Planta Med Suppl*: 79–101.