



## Jurnal Matematika & Sains

Volume 11 No. 4 Desember 2006

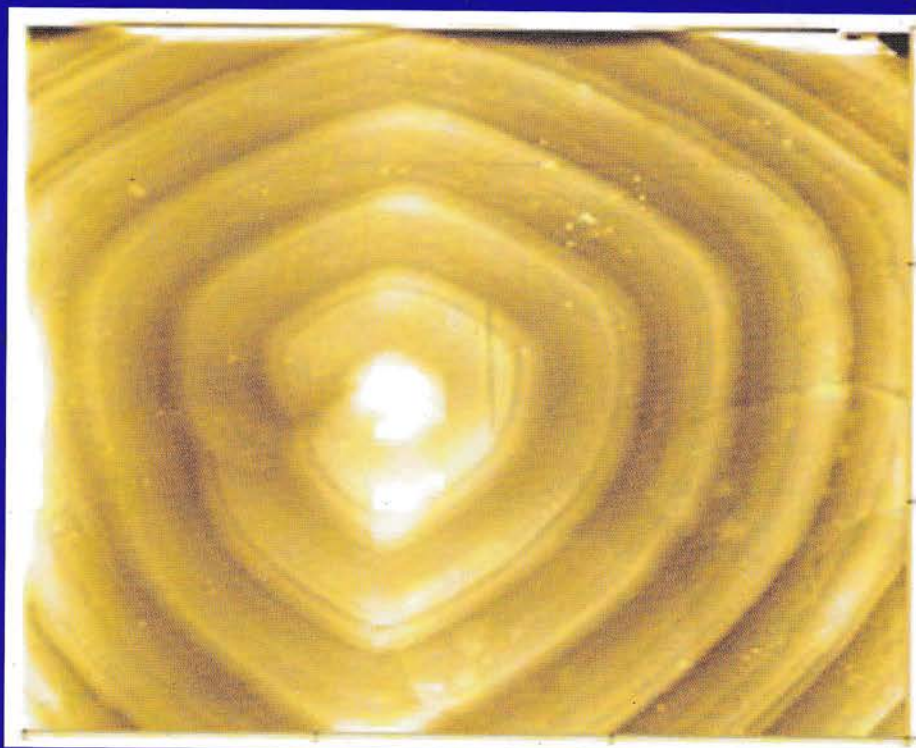
Pengaruh Triptofan pada  
Pertumbuhan dan Kandungan  
Katarantin dari Kalus  
*Catharanthus roseus*  
Dingse Pandiangan dkk

Pengembangan Program Aplikasi  
Komputer untuk Mengolah Data  
Uji Bioekivalensi  
Sukmadjaja Asyarie dkk

Immobilizing Chitosan-Stabilized  
Palladium Nanoclusters on  
Titanium Dioxide and Their  
Catalytic Hydrogenation Properties  
Adlim

Synthesis and Characterization of  
Poly(methyl methacrylate)/SiO<sub>2</sub>  
Hybrid Membranes: Effect of Silica  
Contents on Membrane Structure  
Muhammad Ali Zulfikar *et al.*

*Ex Situ* Investigation of Surface  
Topography of Borax Crystals by  
AFM: Relation Between Growth  
Hillocks and Supersaturation  
Interpreted by Spiral Growth Theory  
Suharso



Reactions of the First Cisplatin Hydrolytes  
*cis*-[PtCl(<sup>15</sup>NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>  
Sutopo Hadi



## Pengaruh Triptofan pada Pertumbuhan dan Kandungan Katarantin dari Kalus *Catharanthus roseus*

Dingse Pandiangan<sup>1)</sup>, Dennie Heroike Rompas<sup>2)</sup>, Henry Fonda Aritonang<sup>3)</sup>,  
Rizkita Rachmi Esyanti<sup>4)</sup>, dan Erly Marwani<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado

<sup>2)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado, Tondano

<sup>3)</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado

<sup>4)</sup>Program Studi Biologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Bandung  
e-mail: dingsepan@yahoo.com

Diterima Juni 2006, disetujui untuk dipublikasikan Desember 2006

### Abstrak

Pengaruh triptofan terhadap pertumbuhan dan kandungan katarantin pada kultur kalus *Catharanthus roseus* telah diteliti. Pertumbuhan kalus *C. roseus* yang diberi triptofan 100, 125 dan 225 mg/L rendah pada hari ke-21, namun yang diberi penambahan 150, 175 dan 200 mg/L pertumbuhannya lebih baik dari kontrol. Kandungan katarantin kontrol atau tanpa triptofan adalah 423,22 µg/g bk. Kandungan katarantin pada keenam kalus yang diberi perlakuan triptofan 100, 125, 150, 175, 200, 225 mg/L adalah 485,00, 588,32, 875,10, 905,26, 784,10 dan 950,54 µg/g bk. Perlakuan yang optimal untuk pertumbuhan dan produksi katarantin dengan penambahan prekursor triptofan adalah 175 mg/L dengan peningkatan kandungan katarantin sebesar 113,90 %.

Kata Kunci: *Catharanthus roseus*, Kalus, Katarantin, Triptofan

### Abstract

Research on the growth and catharanthine content of *Catharanthus roseus* callus which were treated with tryptophan had been done. Wet and dry weight of *Catharanthus roseus* callus decreased when treated with 100, 125 and 225 mg/L tryptophan, but callus treated with 150, 175 and 200 mg/L tryptophan grew better. Catharanthine contents of the control callus was 423,22 µg/g dw. The treatment calli contains 485,00, 588,32, 875,10, 905,26, 784,10 and 950,54 µg/g dw of catharanthine respectively. The optimal tryptophan treatment for callus growth and catharanthine production was 175 mg/L tryptophan with a 113,90 % increase of catharanthine content.

Keywords: *Catharanthus roseus*, Callus, Catharanthine, Tryptophan

### 1. Pendahuluan

*Catharanthus roseus* (L) G. Don yang sering disebut tapak dara adalah semak tahunan yang banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias dan obat. Tanaman tapak dara ini berguna untuk mengobati hipertensi, diabetes, pendarahan akibat penurunan jumlah trombosit, *chorionic epithelioma*, *acute lymphocytic leukemia*, *acute monocytic leukemia*, limfosarkoma dan sarkoma sel retikulum (Wijayakusuma *et al.*, 1992). Sekitar 100 macam alkaloid telah diidentifikasi pada tanaman ini, diantaranya adalah alkaloid anti kanker seperti vinblastin, vinkristin, katarantin dan leurosine (de Padua *et al.*, 1999). Vinkristin dan vinblastin yang telah dikomersialkan kebanyakan berasal dari tapak dara (de Padua *et al.*, 1999). Senyawa antikanker ini menekan atau menghambat pembelahan sel dengan membekukan protein mikrotubular, terutama pada metafase (Alexandrova *et al.*, 2000; de Padua *et al.*, 1999).

Kultur suspensi sel, kalus, tunas, akar dan agregat sel *C. roseus* dapat menghasilkan alkaloid yang lebih banyak (Vazquez-Flota *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Verpoorte *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1987; McCaskill *et al.*, 1988). Keuntungan lain dari penggunaan kultur jaringan untuk produksi alkaloid ini adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksinya lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil dan mengurangi penggunaan lahan (Sugiarso, 1999; Bajaj *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1990a dan 1990b).

Menurut Mattel and Smith (1983), agar produksi metabolit sekunder tinggi maka perlu optimasi faktor-faktor internal dan eksternal. Optimasi dapat dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap pertumbuhan dan pada tahap produksi. Pada tahap pertumbuhan, pengaturan kondisi kultur diarahkan untuk memproduksi biomassa dalam waktu dekat, sedangkan tahap produksi, pengaturan kondisi kultur untuk produksi metabolit sekunder. Selain optimasi pada kedua tahap di atas,



pendekatan lain yang dapat dilakukan secara efektif untuk meningkatkan produksi biomassa sel dan metabolit sekunder adalah penambahan prekursor (prazat), elisitasi dan amobilisasi.

Triptofan merupakan prekursor alkaloid indol kompleks, seperti katarantin. Penambahan zat tersebut dapat mengaktifkan sintesis alkaloid indol kompleks pada *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2001).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari respons pertumbuhan kalus *C. roseus* terhadap pemberian perlakuan variasi triptofan; serta pengaruhnya terhadap produksi katarantin pada kalus.

## 2. Metode

### 2.1 Eksplan

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun ke-3 atau ke-4 dari tunas apical *C. roseus* yang berbunga putih. Eksplan tersebut di peroleh dari Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

### 2.2 Medium

Medium untuk induksi kalus yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium induksi kalus yang terdiri dari medium dasar Murashige dan Skoog (MS), 2 mg/L naphthalene *acetic acid* dan 0,2 mg/L Kinetin. Medium perlakuan adalah medium induksi kalus yang ditambahkan dengan berbagai konsentrasi triptofan, yaitu: 100, 125, 150, 175, 200 dan 225 mg/L.

### 2.3 Sterilisasi

Medium dan alat-alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Sterilisasi triptofan dilakukan dengan membran filter selulosa asetat (PTFE) 0,45 µm.

Sumber eksplan yang akan ditanam pada medium terlebih dahulu dicuci di bawah air mengalir selama 15 menit, kemudian direndam dalam etanol 70% selama enam menit dan dibilas dengan H<sub>2</sub>O steril. Eksplan selanjutnya disterilisasi dengan natrium hipoklorit (NaClO) 2% selama sepuluh menit, lalu dibilas dengan H<sub>2</sub>O steril sebanyak tiga kali. Peralatan kultur disterilkan secara aseptik dengan perendaman pada etanol 90% dan pembakaran pada setiap kali pemakaian.

### 2.4 Induksi kalus

Penanaman dan induksi kalus dilakukan di dalam kotak pemindah beraliran udara. Daun yang telah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup> dan selanjutnya ditanam pada medium. Setelah penanaman, semua botol kultur disimpan dalam ruang kultur pada suhu kamar.

### 2.5 Kultur kalus perlakuan triptofan

Kalus yang terbentuk setelah sekitar 28 hari disubkultur sebesar 0,2 g ke media MS yang mengandung triptofan. Setiap botol dikultur 2-3 kalus. Setelah 21 hari dalam medium perlakuan (subkultur 1), kemudian dilakukan subkultur kembali ke media perlakuan yang sama, dengan besar kalus yang sama dengan subkultur 1 untuk semua perlakuan. Kalus dipanen pada hari ke-10 setelah subkultur ke-2. Kemudian kalus dikeringkan dalam *freeze dryer*. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dan analisis katarantin dari kalus yang sudah kering.

### 2.6 Ekstraksi dan Isolasi alkaloid katarantin

Prosedur ekstraksi yang digunakan adalah menurut metode Tikhomirof and Jolicoeur (2002), Sumarsi *et al.* (1990), Pandiangan dan Nainggolan (2006) yang telah dimodifikasi. Sel dikeringkan dengan *freeze dryer* selama satu malam atau sekitar 12 jam. Bahan yang telah kering (0,1 g) dihaluskan dalam mortar dan diekstraksi dalam 5 ml larutan metanol selama 2 jam sambil dikocok. Campuran kemudian disentrifugasi pada 15.000g selama 5 menit dan supernatan (ekstrak metanol) diambil kemudian diuapkan dengan evaporator pada suhu 40 °C selama 1 malam. Ekstrak metanol kental diekstraksi lagi dengan diklorometana dan selanjutnya dikeringkan sehingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak tersebut dilarutkan dalam 1 ml metanol HPLC, dan disaring dengan filter selulosa asetat (PTFE) 0,45 µm.

### 2.7 Analisis Kandungan Katarantin secara Kualitatif dan Kuantitatif dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Analisis kualitatif dan kuantitatif untuk katarantin dilakukan dengan KCKT yang dihubungkan dengan kromatopak Shimadzu CR-7A Plus. Fase gerak yang digunakan berupa larutan yang terdiri dari metanol : asetonitril : 5 mM diamonium hidrogen fosfat = 3:4:3 secara isokratik. Kecepatan aliran 1ml/menit. Jenis kolom yang digunakan adalah Shim-pack VP-ODS C18 0,15 m dengan diameter 4,6 mm. Panjang gelombang UV yang digunakan untuk mendeteksi katarantin adalah 220 nm. Sebelum analisis dilakukan, terlebih dahulu dilakukan filtrasi terhadap fase gerak dan larutan sampel dengan membran PTFE 0,45 µm. Sebagai senyawa pembanding digunakan standar katarantin.

## 3. Hasil dan Diskusi

### 3.1 Induksi Kalus

Eksplan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium induksi kalus mengandung NAA 2 mg/L dan kinetin 0,2 mg/L. Respons awal terjadi dengan mengerutnya eksplan pada hari ke-6 setelah penanaman



(kultur). Proliferasi sel secara umum mulai terjadi pada hari ke-8 setelah kultur.

Pembentukan kalus pada hari ke-8 setelah penanaman umumnya diikuti oleh pertumbuhan kalus yang makin membesar. Pada medium induksi kalus dengan menggunakan NAA 2 mg/L dan kinetin 0,2 mg/L tidak terjadi pembentukan akar sampai pada hari ke-14 setelah kultur. Setelah hari ke-18 terlihat adanya bulu-bulu akar yang muncul di permukaan kalus. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh keseimbangan auksin dan sitokinin terhadap respons jaringan. Krikorian (1995) melaporkan bahwa akar terbentuk dari kalus pada medium yang ditambahkan auksin dengan konsentrasi lebih tinggi daripada sitokinin. Hasil penelitian Fitriani (1998) juga menunjukkan akar terbentuk pada medium dengan konsentrasi NAA antara 1 - 10  $\mu\text{M}$  atau setara dengan 0,2 - 2,0 mg/L. Eksplan pada awal penanaman masih mengandung zat pengatur tumbuh (zpt) endogen yang dibentuk pada tanaman sebelum eksplan dikultur. Setelah zpt endogen pada eksplan habis terpakai, maka zpt medium yang ditambahkan yang paling banyak berperan untuk induksi kalus. NAA berperan penting untuk induksi akar.

Tipe kalus yang dihasilkan berupa kalus kompak (data tidak ditampilkan). Kalus tipe ini menjadi kultur agregat sel pada kultur cair. Kalus yang terbentuk pada awal pertumbuhan berwarna putih. Pada tahap selanjutnya kalus mulai berwarna kuning kehijauan dan akhirnya warna kalus menjadi kecoklatan pada bagian dasar pinggiran kalus. Setelah disubkultur, kalus yang sebelumnya kecoklatan perlahan-lahan kembali berwarna krem sampai kehijauan diiringi pertumbuhan yang semakin membesar. Pertumbuhan kalus menjadi lebih cepat dan pencoklatan mulai berkurang dibandingkan dengan kultur sebelumnya.

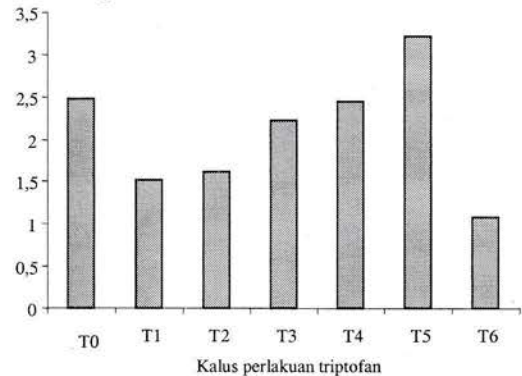
### 3.2 Pertumbuhan Kalus pada Media dengan Perlakuan Triptofan

Penampakan kalus pada media yang diberi perlakuan triptofan pada awalnya tidak ada perbedaan antara kontrol dengan perlakuan triptofan. Kalus tampak tumbuh bersama-sama dan mengalami perbesaran secara bersama-sama, namun keadaan yang demikian hanya berlangsung sampai hari ke 20. Setelah hari ke-21, kalus kontrol tampak sebagian mengalami kematian sel atau nekrotis dengan warna coklat kemerahan. Kalus yang dikultur pada perlakuan triptofan, masih tumbuh baik setelah 21 hari kultur pada media perlakuan (kalus tidak mengalami nekrotis) dan warnanya putih keabu-abuan. Hal ini menunjukkan bahwa kalus kontrol lebih cepat mengalami penuaan dari pada kalus perlakuan triptofan. Hal ini diduga karena pertumbuhan kalus yang lebih cepat pada kontrol yang diakibatkan auksin dalam sel kontrol lebih tinggi (Dahab and Abdul-aziz, 2006). Cepatnya

pertumbuhan kalus menyebabkan media cepat habi dan kalus kekurangan nutrisi. Penambahan triptofan diduga mendorong perubahan sintesis auksin menjadi sintesis terpenoid indol alkaloid sehingga pertumbuhan menjadi lambat (El Sayed and Verpoorte, 2002).

Pertumbuhan kalus yang diamati dari penimbangan berat basah kalus (Gambar 1) menunjukkan bahwa berat dan ukuran kalus kontrol (tanpa triptofan) pada umumnya lebih besar daripada kalus perlakuan triptofan. Berat dan ukuran kalus tidak selalu menurun dengan peningkatan konsentrasi triptofan. Ada penurunan pada T1 dan T2, tetapi pada T3 dan T4 hampir sama dengan kontrol, T5 lebih tinggi dari kontrol, selanjutnya menurun lagi pada T6. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh triptofan sangat spesifik terhadap pertumbuhan sel. Ketika subkultur diperpanjang sampai 72 hari, pada kalus T5 muncul tunas daun, sedangkan perlakuan lainnya tidak ada tunas daun. Hal ini menguatkan pemikiran bahwa ekspresi gen dan aktivitas enzim untuk pertumbuhan meningkat dan produksi metabolit sekundernya tentu menurun.

Berat basah kalus (g)



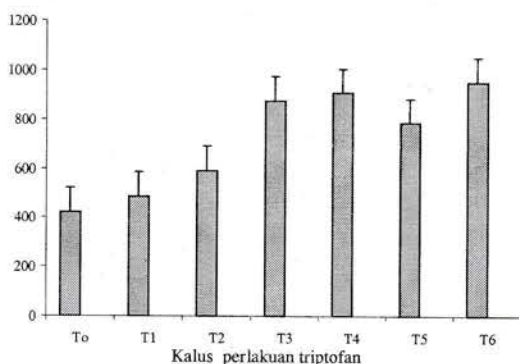
**Gambar 1.** Berat basah kalus yang diberi perlakuan triptofan (mg/L). 0 (T0) atau kontrol, 100 (T1), 125 (T2), 150 (T3), 175 (T4), 200 (T5) dan 225 (T6) pada hari ke-10 setelah subkultur.

### 3.3 Analisis Kualitatif dan kuantitatif katarantin sel *C. roseus*

Sampel kalus *C. roseus* dianalisis kandungan katarantinnya pada umur sel yang sama, yaitu pada umur 10 hari setelah subkultur pada media MS. Analisis kualitatif dengan menggunakan KCKT menunjukkan bahwa waktu retensi untuk katarantin standar adalah sekitar 8,16 menit. Hasil analisis kualitatif dan kuantitatif menunjukkan bahwa sel *C. roseus* menghasilkan katarantin pada semua sampel, baik yang diberi perlakuan triptofan maupun kontrol. Kandungan katarantin kontrol (T0) adalah sebesar 423,22  $\mu\text{g/g}$  bk. Katarantin pada T0 tersebut



merupakan kandungan yang paling rendah. Kandungan katarantin mengalami peningkatan secara berurutan, dari T1 = 485,00  $\mu\text{g/g}$  bk, T2 = 588,32  $\mu\text{g/g}$  bk, T3 = 875,10  $\mu\text{g/g}$  bk, T4 = 905,26  $\mu\text{g/g}$  bk dan T6 = 950,54  $\mu\text{g/g}$  bk. Namun, T5 mengandung katarantin sebesar 784,10  $\mu\text{g/g}$  bk atau lebih rendah dari T4 dan menunjukkan adanya pengecualian. T5 merupakan sel yang paling tinggi pertumbuhannya. Hal ini mungkin disebabkan nutrisi untuk sintesis alkaloid, seperti katarantin, digunakan untuk pertumbuhan. Penelitian Fitriani (1998) menunjukkan bahwa kalus dengan berat kering rendah mempunyai kandungan alkaloid ajmalisin tinggi. Kondisi cekaman dapat menginduksi sintesis alkaloid. Sebaliknya pada perlakuan T6 kandungan katarantinnya tinggi dibandingkan dengan sel yang lain yang diberi triptofan. Hal ini terjadi karena nutrisi dimanfaatkan untuk sintesis dan metabolisme katarantin, bukan untuk pertumbuhan sel. Secara keseluruhan kandungan katarantin pada T3 dan T4 tinggi demikian juga pertumbuhannya, bahkan lebih tinggi dari kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pada T4 (175 mg/L triptofan) merupakan media yang baik untuk peningkatan kandungan katarantin.

Katarantin ( $\mu\text{g/g}$  bk)

**Gambar 2.** Kandungan katarantin pada kalus *C. roseus* yang diberi triptofan (mg/L). 0 (T0) atau kontrol, 100 (T1), 125 (T2), 150 (T3), 175 (T4), 200 (T5) dan 225 (T6).

Peningkatan kandungan katarantin terjadi juga pada semua kalus perlakuan triptofan. Peningkatan tertinggi terjadi pada T6 sebesar 124,60% (Tabel 1), namun pertumbuhan kalusnya sangat rendah (lebih rendah dari kontrol (Gambar 1)). Pertumbuhan yang sama dengan kontrol dengan peningkatan kandungan katarantin 113,90% terjadi pada kalus T4 (1754 mg/L triptofan). Maka dari hasil tersebut perlakuan yang terbaik untuk produksi katarantin dengan prazat triptofan adalah 175 mg/L (sel T4). Produksi katarantin akan maksimal apabila pertumbuhan sel (biomassa) dan kandungan katarantin berada pada kondisi optimal.

**Tabel 1.** Peningkatan kandungan katarantin pada kalus perlakuan triptofan

Kalus perlakuan	Katarantin ( $\mu\text{g/g}$ bk)	Peningkatan (%)
T0	423,22	0
T1	485,00	14,60
T2	588,32	39,01
T3	875,10	106,77
T4	905,26	113,90
T5	784,10	85,27
T6	950,54	124,60

Triptofan (mg/L): 0 (T0) atau kontrol, 100 (T1), 125 (T2), 150 (T3), 175 (T4), 200 (T5) dan 225 (T6).

Zhao *et al.* (2001) melaporkan juga bahwa kandungan katarantin meningkat dengan penambahan triptofan 300 mg/L dan 500 mg/L yang dikombinasikan dengan asam suksinat pada kultur kalus kompak dari *C. roseus*. Pengaruh triptofan terhadap kultur itu bisa meningkatkan atau menurunkan kandungan alkaloid tergantung tipe kultur yang digunakan.

## 5. Kesimpulan

1. Perlakuan triptofan terhadap kultur kalus menekan pertumbuhan pada umumnya.
2. Kandungan katarantin meningkat pada semua kalus perlakuan triptofan, dengan peningkatan tertinggi 124,60% pada kalus T<sub>6</sub> (200 mg/L).
3. Perlakuan triptofan optimal adalah kandungan katarantin tinggi dengan pertumbuhan sama dengan kontrol adalah kalus T<sub>4</sub> (175 mg/L).

## Ucapan Terima kasih

Penelitian ini didanai oleh program Penelitian Hibah PEKERTI 2005 dengan nomor kontrak 051/SPPP/PP/DP3M/IV/2005, tanggal 11 April 2005. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Dr. Magdi El-Sayed yang telah memberikan katarantin murni.

## Daftar Pustaka

- Alexandrova, R., I. Alexandrova, M. Velcheva and T. Varadinova, 2000, Phytoproduct and Cancer, *Exp. Pathol. Parasitol.*, **4**, 15-26
- Bajaj, Y.P.S., M. Furmanowa and O. Olszowska, Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal and Aromatic Plants, in Bajaj, Y.P.S. (Ed.), 1988, *Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4. Medicinal and Aromatic Plants*, Springer-Verlag. Berlin, 60 – 113.
- Dahab, T.A.M.A. and N.G. Abdul-aziz, 2006, Physiological Effect of Diphenylamin and

- Tryptophan on the Growth and Chemical Constituents of *Philodendron erubescens* Plants, *World J. Agr. Sci.*, **2**:1, 75-81
- de Padua, L.S., N. Bunyaphatsara, and R.H.M.J. Lemmens, (Eds.), 1999, *Plant Resources of South East Asia* no. 12(1). *Medicinal and Poisonous plants* 1. PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia, 185-190
- El-Sayed, M. and R. Verpoorte, 2002, Effect of Phytohormones on Growth and Alkaloid Accumulation by a *C. roseus* Cell Suspension Cultures Fed with Alkaloid Prekursors Triptamine and Loganin. *Plant Cell Tissue Org Cult*, **68**:3, 265-270
- Fitriani, A., 1998, Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Terhadap Kandungan Ajmalisin dalam Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, [Tesis], Pascasarjana ITB, Bandung.
- Hirata, K., M. Horiuchi, T. Ando, K. Miyamoto and Y. Miura, 1990a, Vindoline and Catharanthine Production in Multiple Shoot Cultures of *Catharanthus roseus*, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**:3, 193-195.
- Hirata, K., A. Yamanaka, N. Kurano, K. Miyamoto and Y. Miura, 1990b, Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*, *Agric. Biol. Chem.* **51**:5, 1311 - 1317.
- Kim, S.W., K.H. Jung, S.S. Kwak and J. R. Liu, 1994, Relationship between cell morphology and indole alkaloid production in suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Plant Cell Rep.* **14**, 23-26.
- Krikorian, A.D., 1995, Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer, 774-796.
- Mattel, S.H. and H. Smith, 1983, Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell and Tissue Cultures, in Mattel, S.H. and H. Smith (Eds.), *Plant Biotechnology*, Cambridge University, London, 75-102.
- McCaskill, D.G., D.L. Martin, and A.I. Scott, 1988, Characterization of alkaloid uptake by *Catharanthus roseus* protoplast, *Plant Physiol.*, **87**, 402-408.
- Pandiangan, D. dan N. Nainggolan, 2006, Peningkatan Kandungan Katarantin pada Kultur Kalus *C. roseus* yang Diberi NAA, *Hayati*, **13**:3, 90-94.
- Smith, J.I., N.J. Smart, M. Misawa, W.G.W. Kurt, S.G. Tallevi and F. DiCosmo, 1987, Increase Accumulation of Indole Alkaloids by Some Cell Lines of *Catharanthus roseus* in Response to Addition of Vanadyl Sulfate, *Plant Cell Rep.*, **6**, 142-145.
- Sumarsi, S. Darjianto, dan Suprpto, 1990, Isolasi Komponen Aktif Daun Tapak Dara, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian.
- Sugiarso, D., 1999, Kadar Alkaloid Total Kalus *Catharanthus roseus* (L.)G. Don pada Media MS dengan Penambahan Triptofan, Hasil Penelitian Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, XII.
- Tikhomiroff, C. and M. Jolicœur, 2002, Screening of *Catharanthus roseus* Secondary Metabolites by High-performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr A*, **955**, 87-93.
- Vazquez-Flota, F., O. Moreno-Valenjuela, M.L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, and V.M. Loyola-Vargas, 1994, Catharanthine and Ajmalisine Synthesis in *Catharanthus roseus* Hairy Root Cultures, *Plant Cell Tissue Org Cult*, **38**, 273-279.
- Verpoorte, R., R. van der Heijden, J. Schripsema, 1993, Plant Cell Biotechnology for the Production of Alkaloids: Present Status and Prospects, *J. Nat. Prod.*, **56**:2, 186-207.
- Wijayakusuma, H.M.H., S. Dalihmarta, A.S. Winar, 1992, *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Jilid I, Pustaka Kartini, Ikapi Jaya.
- Zhao, J., Q. Hu, Y.Q. Guo, W.H. Zhu, 2001, Effects of Stress Factors, Bioregulators, and Synthetic Prekursors on Indole Alkaloid Production in Compact Callus Clusters Cultures of *Catharanthus roseus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**:6, 693-8.