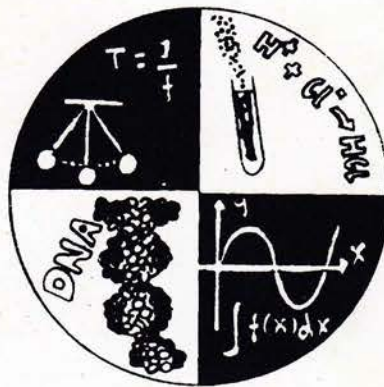


ISSN 1412-3770

JURNAL ILMIAH S A I N S

Volume 8 Nomor 1 April 2008



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SAM RATULANGI
MANADO

AKTIVITAS ANTIKANKER KATARANTIN PADA SEL *MOUSE MAMMARY CANCER* MmT06054

Dingse Pandiangan¹⁾, R. Esyanti²⁾, Edwin de Queljoe¹⁾

ABSTRAK

Kebutuhan terhadap obat anti kanker yang sangat mahal harganya mendorong para peneliti dan industri farmasi untuk mencari terobosan baru dengan harapan mendapatkan senyawa antikanker baru. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mendapatkan senyawa antikanker baru dengan memanfaatkan katarantin sebagai prekursor, sehingga harga kemoterapi kanker dapat ditekan. Tujuan khususnya adalah memperoleh informasi ilmiah mengenai aktivitas antikanker katarantin untuk menekan pertumbuhan sel kanker. Penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antikanker senyawa aktif katarantin. Uji yang harus ditempuh suatu senyawa aktif yang dikaitkan dengan antikanker adalah uji aktivitas. Uji aktivitas katarantin ini dilakukan dengan teknik *in vitro* dengan menggunakan sel *mouse mammary cancer* MmT06054. Daya hambat pertumbuhan kanker ditentukan dengan menghitung sel hidup dan mati. Penentuannya dengan menggunakan uji MTT. Absorbansi formazan (hasil reduksi MTT) diukur pada panjang gelombang 560 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa morfologi sel kanker terlihat jelas epiteloid dan tidak mengalami perubahan morfologi selama perlakuan. Jumlah sel semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi katarantin. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MTT menunjukkan adanya penurunan absorbansi dengan persamaan $Y = -0,0034x + 0,8339$ dengan $R^2 = 0,9765$. Dari persamaan tersebut dapat ditentukan ID_{50} yaitu 98,2 $\mu\text{g/mL}$. ID_{50} yang demikian tidak mendukung dan membantah pernyataan beberapa publikasi sebelumnya yang menyatakan bahwa katarantin adalah senyawa antikanker. Dinyatakan suatu senyawa murni sebagai antikanker apabila $ID_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa katarantin murni tidak aktif sebagai antikanker. Namun berperan penting sebagai prekursor antikanker dimeralkaloid. Produksi katarantin sangat penting diteruskan dan ditingkatkan, oleh karena melalui kultur *in vitro* kandungan katarantin dapat ditingkatkan, sedangkan alkaloid dimerik yang digunakan sebagai antikanker selama ini sangat rendah. Jelas bahwa produksi antikanker secara *in vitro* akan mengalami kesulitan dan produksinya sangat rendah. Produksi antikanker akan berhasil dengan memanfaatkan bioreaktor hanya dengan produksi monomer kemudian dengan metoda semi-sintetik digabungkan menjadi antikanker dimerik alkaloid. Produksi monomerik tinggi dan cepat tentu produksi antikanker dimerik juga tinggi dan cepat.

Kata kunci : Anti kanker, katarantin.

ANTICANCER ACTIVITY OF CATHARANTHINE TO CELL OF MOUSE MAMMARY CANCER MmT06054

ABSTRACT

Cancer is not easy to be cured. More over its could reappear after a surgery proses. To cure cancer is very difficult beside that the medicines used are very expensive. Some researcher reported that through tissue culture such as suspension cells, callus, roots and aggregates cultures production of alkaloid in *C. Roseus* were enhance. This research aims was to investigated the new anticancer substances by using the catharanthine as precursor, then the cost of chemotherapy could be decreased. The objective of this research were to investigated the information about catharanthine activity to supressed the cancer cell growth and to find out the cell cancer respons by *in vitro* to bioactive substances from cell aggregate extract. This research was done for catharanthine and extract cell aggregat anticancer activity assays. Its done by *in vitro* and using mouse mammary cancer MmT 06054. The growth inhibition of cancer was determined with MTT assays. The

1) Program Studi Biologi FMIPA UNSRAT, Manado

2) Program Studi Biologi, SITH ITB Bandung

absorbance of formazan (MTT reduction) was determined at 560 nm. This absorbances used to determined the ID₅₀.

The result indicated that the cell morphology was epitheloid and change not occurred belong treatment. The amount of cell decreased be in accordance with catharanthine and extract cell aggregate concentration. The measuring of absorbance indicated that catharanthine treatment was decreased amount of cancer cell, with the equality, $Y = -0,0034x + 0,8339$ with $R^2 = 0,9765$. From this equality the ID was find out 98.2 µg/ml. This result indicated that catharanthine didn't active as anticancer but it have a role as precursor or monomer dimeric alkaloid anticancer at *C. roseus*. Production of catharanthine very important to continued and increased, because the catharanthine contents by *in vitro* was high, while dimer alkaloid content was a little. The anticancer production succeed with useful catharanthine as monomer. Production anticancer alkaloid dimeric succeed by *in vitro* with technology semi-synthetic among catharanthine and alkaloid monomeric other. If the amount catharanthine abundant, then the amount of anticancer abundant too. Because of that catharanthine production in bioreactor be needed at the 2008 year.

Keywords: Anticancer, catharanthine

PENDAHULUAN

Penelitian tentang senyawa bioaktif secara konvensional saat ini sudah banyak dilakukan di Indonesia. Namun sampai hanya pada batas wacana, belum sampai pada skala industri. Penggunaan tanaman secara konvensional akan menimbulkan habisnya sumberdaya alam apabila tidak diikuti dengan teknik kultur jaringan atau bioreaktor. Salah satu kelebihan teknik ini adalah dapat dilakukan pengontrolan pertumbuhan sel dan pengaturan proses-proses metabolisme secara otomatis untuk peningkatan produktivitas. (Anderson *et al.*, 1986; Fowler, 1983; Zenk *et al.*, 1977).

Salah satu masalah pembangunan nasional yang menjadi prioritas adalah kesehatan masyarakat. Akhir-akhir ini banyak yang menderita penyakit kanker. Pada awalnya penyakit kanker disebut penyakit genetik, namun sekarang ini tidaklah demikian. Keluarga yang tidak pernah menderita penyakit kanker pun, sekarang ini sudah jadi penderita. Hal ini menunjukkan bahwa kesehatan masyarakat semakin tidak baik. Pada tahun 2000, frekuensi penyakit kanker payudara pada wanita menduduki peringkat pertama. Di Indonesia mencapai 25.208 kasus per tahun dan kematian hampir 50% yaitu 10.881 orang per tahun (Parkin *et al.*, 2005). Kematian tersebut 90% disebabkan karena observasi dilakukan pada stadium lanjut. Hal ini terjadi karena mahalnya obat-obatan dan terapi di Indonesia, karena masih tergantung dengan luar negeri. Apabila produksinya sudah dilakukan sendiri di

Indonesia sudah tentu dapat menekan harga obat kanker. Obat kanker dan terapi tumbuhan tradisional sangat baik juga menekan angka resiko tersebut. Dengan adanya penelitian ini besar harapan produksi antikanker bisa dilakukan di Indonesia yang tentu dimulai dari perguruan tinggi yang menciptakan peneliti yang ulet dan tangguh.

Pengobatan kanker sangat sulit dan obat-obatannya yang sangat mahal, seperti vinblastin yang berharga 16,70 US\$ per miligram atau sekitar Rp. 1.670.000,00 per gram (catalog Sigma-aldrich, 2001, dengan 1 Dolar Amerika sama dengan Rp 10.000). Kemoterapi kanker leukemia dengan menggunakan vinblastin diberikan dosis normal untuk dewasa 1-1,4 mg/m² permukaan tubuh setiap 1 kali seminggu (De Padua & Bunyapraphatsara, 1999). Berbagai jenis alkaloid antikanker seperti katarantin, vinblastin, vindesin, vinorelbin dan vinkristin telah di produksi dari *C. roseus* secara *in vivo*. Produksi 50 mg vinkristin dan 2 g vinblastin membutuhkan 1 ton daun kering *C. roseus*, karena kandungan dalam daun hanya sekitar 0,70-0,82 % (Samiran, 2000). Namun Verpoorte *et al.* (1993) menyatakan bahwa katarantin dapat diproduksi 230 mg/l dalam kultur suspensi sel setelah 1 minggu pertumbuhan. Hal tersebut menunjukkan bahwa penerapan kultur jaringan atau bioreaktor dalam memproduksi alkaloid antikanker sangat menguntungkan, konsisten dan cepat.

Pada penelitian sebelumnya oleh penulis telah dilakukan berbagai upaya untuk membuktikan kandungan katarantin dalam

kulur jaringan mulai dari kalus sampai pada tingkat sel. Disamping itu juga dilakukan proses peningkatan dengan berbagai cara seperti penambahan zat pengatur tumbuh NAA, prekursor, dan elisitasi. Ada hasil yang menggembirakan untuk memproduksi katarantin tersebut dengan memanfaatkan hasil-hasil tersebut. Namun ada hal yang menjadi pertanyaan selama penelitian berjalan. Apakah benar katarantin ini mempunyai kemampuan untuk menekan pertumbuhan kanker? Untuk menjawabnya peneliti mencoba menelusuri beberapa pustaka baik jurnal, buku, internet bahkan kontak person lewat e-mail kepada Prof. Jolicuour di Belanda yang telah meneliti tentang katarantin dalam hal sintesisnya. Beliau memberi jawaban bahwa hal itu belum pernah dipelajari sehingga pertanyaan belum terjawab sampai saat ini. Laporan yang sudah ada adalah bahwa katarantin adalah senyawa prekursor untuk sintesis vinblastin dan vinkristin. Tapi pada beberapa buku ditulis secara implisit bahwa katarantin juga sebagai antikanker, namun belum ada yang menyatakan dalam jurnal (hasil penelitian). Untuk mengatasi masalah di atas maka perlu dilakukan suatu penelitian untuk menguji aktivitas antikanker katarantin dengan menggunakan lini sel

Tujuan dan Manfaat Penelitian

- 1 Mampu melakukan uji penghambatan pertumbuhan sel oleh katarantin dengan mengamati viabilitas sel yang dilakukan secara *in vitro* tanpa harus menggunakan hewan utuh yang merupakan suatu langkah mengurangi pembunuhan hewan sebagai langkah efisiensi.
- 2 Mampu membuktikan seberapa besar ID_{50} katarantin dan ekstrak hasil kultur jaringan terhadap sel kanker, sebagai rujukan untuk melangkah pada penelitian selanjutnya.
- 3 Memperoleh informasi ilmiah mengenai efektifitas katarantin untuk menekan pertumbuhan kanker sebagaimana informasi yang sudah lama beredar di masyarakat.
- 4 Mengetahui respons sel kanker terhadap senyawa bioaktif katarantin yang diharapkan dapat menekan pertumbuhan sel-selnya sebagai acuan untuk menetapkan apakah katarantin sendiri

dapat dijadikan sebagai senyawa antikanker atau tidak.

METODOLOGI PENELITIAN

Pembuatan Larutan Induk Katarantin

Ekstrak kering hasil isolasi pada tahun 2006 yang berisi katarantin dan katarantin murni ditimbang sebanyak 1 mg dan dimasukkan ke dalam eppendorf ukuran 1 mL. Pada tabung ditambahkan 0,1 mL larutan DMSO steril sampai larut. Kemudian ditambahkan aquadest steril sampai garis tanda 1 mL dan divortex sampai homogen. Larutan yang diperoleh disaring dengan membran filter 0,45 μ m dan dimasukkan ke dalam tabung bertutup steril. Konsentrasi larutan induk yang diperoleh 1000 mg/L.

Pembuatan Larutan Uji Katarantin (Sampel)

Tabung bertutup steril dipersiapkan sebanyak 3 buah. Tambahkan 880 μ L larutan DMSO 10 % steril pada tabung 1, 2 dan 3. Tabung 1 tidak diisi katarantin dan sebagai larutan kontrol digunakan larutan DMSO 10 % steril. Pada tabung 2 ditambahkan 120 μ L larutan induk katarantin hasil ekstraksi kemudian digoyang perlahan sampai homogen. Tabung 3 ditambahkan larutan induk katarantin murni 120 μ L kemudian digoyang perlahan sampai homogen. Konsentrasi larutan uji yang diperoleh 120 mg/L. Pembuatan konsentrasi lainnya dilakukan dengan cara yang sama, sehingga variasi katarantin standar dari 0, 15, 30, 60, 120, mg/L demikian juga katarantin hasil ekstraksi agregat sel.

Cara Kerja Uji Antikanker

Bahan percobaan

Pada penelitian ini digunakan sel *mouse mamary cancer MmT 06054* yang dipelihara di dalam botol kultur berisi medium pemeliharaan yang mengandung medium dasar RPMI-1640 dari Gibco dan *Fetal Bovine Serum* (Gibco) 10%). Sel diinkubasi dalam inkubator CO_2 (Forma Scientific) pada suhu inkubasi $36,5^{\circ}C$, kelembaban 90% dan kadar CO_2 5%. Katarantin yang digunakan adalah katarantin murni yang diperoleh dari Verpoorte dan

Magdy El-Sayed dari Laboratorium Gorlaeus, Pusat Ilmu Pengetahuan Biofarma, Leiden-Nedherland.

Sterilisasi alat dan medium

Alat-alat medium yang digunakan berada dalam keadaan steril. Semua alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu. Alat-alat gelas dan plastik disonikasi dengan sonikator (Baranson a Smith kline Company) selama 30 menit, kemudian dikeringkan dalam oven (Heraeus) 60°C. Alat-alat gelas disterilkan dengan oven (Heraeus) pada suhu 180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan autoklaf (*Electric pressure steam sterilizer* model 25X) pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs/inch² selama 20 menit.

Medium dasar disterilkan dengan metode filtrasi menggunakan membran milipore 0,2 µm (Gelman Sciences) Medium perlakuan, larutan tripsin serta larutan EDTA difiltrasi dengan menggunakan *Acrodisc syringe filter* yang memiliki pori 0,2 µm. Larutan FBS disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs/inch² selama 30 menit.

Kultur sel

Pengkulturan sel dilakukan dalam kondisi steril. Sel *mouse mamary cancer MmT 06054* dipelihara dengan 5 mL medium pemeliharaan dalam botol kultur 25 cm² (Nuncclon). Medium pemeliharaan diganti setiap 2 hari dan subkultur dilakukan ketika kultur sel telah memenuhi 80% substrat. Subkultur dilakukan seperti cara yang digunakan Alley (1998)

Kuantifikasi jumlah sel

Kultur sel yang telah memenuhi 80% substrat siap untuk didisosiasi. Disosiasi dilakukan dengan cara pencucian kultur sel dengan FBS sebanyak 3 kali lalu dibilas dengan EDTA 0,02 % dan diberi tripsin 0,25 % serta diinkubasi pada suhu 37 °C dalam inkubator CO² selama 2 menit sampai sel lepas dari substrat botol kultur. Suspensi sel ditambah dengan medium pemeliharaan yang mengandung 5% FBS dengan perbandingan volume 1:1 Sel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan

pelet sel diberi medium pemeliharaan. Sel hidup dihitung dengan menggunakan hemasitometer tipe Improved Neubauer dengan rumus perhitungan Freshney, (2000).

Perlakuan Sel Kanker dengan Katarantin

Perlakuan dilakukan dengan menggunakan *multiwell plate* dengan 96 sumur. Dalam percobaan, sebelum sel diberi perlakuan, masing-masing 2.000 sel per sumur ditanam dengan medium dasar yang diberi 2% FBS dalam *multiwell plate* dan diinkubasi semalam atau 24 jam agar sel melekat pada substrat. Pada hari berikutnya sel diberi perlakuan.

Kelompok percobaan dibagi menjadi dua yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol yaitu sel yang dipelihara dalam medium SFDM tanpa diberi katarantin (K). Kelompok perlakuan merupakan sel yang dipelihara dalam medium Serum Free Define Medium (SFDM). Pada setiap kelompok percobaan, sel ditanam dalam cawan petri kultur multiwell dengan 96 sumur (Nuncclon).

Sel diinkubasi selama 48 jam dan medium perlakuan diganti setiap 24 jam. Pengamatan morfologi sel dengan menggunakan mikroskop fase kontras (Nikon eclipse TE 300) dilakukan pada masa inkubasi 0, 24 dan 48 jam. Tahap pengerjaan ini diulang sebanyak 3 kali. Hasil pengamatan didokumentasikan dengan *Nikon Digital camera DXF 1200F* dan program ACT-1 versi 2.

Pengukuran aktivitas antikanker dengan MTT Assays

Aktivitas proliferasi sel setelah perlakuan diukur dengan pemberian larutan MTT. Medium dibuang dan diberi 200 µL medium dasar yang mengandung 2% FBS dan 50 µL larutan MTT untuk setiap sumur. Sel diberi MTT untuk mengukur efek sitotoksik sampel (katarantin dan ekstrak). Sel diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C dengan kondisi gelap. Setelah itu, medium dibuang dan diberi 200 µL DMSO dan 25 µL bufer glisin. Intensitas warna kemudian diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 560 nm. Intensitas absorbansi warna dibuat untuk mencari nilai *Inhibition concentration*

sebanyak 50 % (IC_{50}) dari katarantin dan ekstrak agregat sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

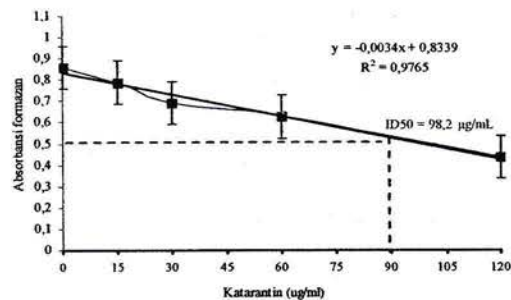
Hasil pengamatan uji MTT dari sel kanker dengan perlakuan katarantin murni dapat dilihat pada Tabel 1. Data tersebut merupakan rata-rata absorbansi dari 8 kali pengukuran yang sudah dikurangi absorbansi blanko masing-masing. Kemudian rata-rata absorbansi di buat persamaan regresinya (Gambar 13), yaitu $Y = -0,0034x + 0,8339$ dengan $R^2 = 0,9765$. ID_{50} dihitung dengan menentukan Y (absorbansi formazan) 0,5, yang artinya 50% sel mati dan 50 % sel hidup (Fresney (2000). Melalui substitusi $Y = 0,5$ pada persamaan tersebut diperoleh ID_{50} adalah 98,2 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa katarantin murni itu sangat rendah antikankernya, atau tidak aktif.

Tabel 1. Rata-rata hasil pengukuran absorbansi formazan pada uji MTT sel mouse mammary cancer MmT 06054 pada λ 560 nm dengan perlakuan berbagai konsentrasi katarantin murni.

Katarantin ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi λ 560 nm $\pm$ Stdv
0	0,861 $\pm$ 0,037
15	0,788 $\pm$ 0,057
30	0,691 $\pm$ 0,052
60	0,626 $\pm$ 0,051
120	0,0435 $\pm$ 0,054

Menurut Alley (1988) dan Geran *et al.* (1972) bahwa suatu senyawa murni dikatakan aktif apabila nilai IC_{50} sekitar 2-4 $\mu\text{g/mL}$. Bila dibandingkan dengan hasil pengamatan maka katarantin itu sendiri bukan antikanker. Katarantin merupakan prekursor atau monomer untuk antikanker dimerik alkaloid seperti vinblastin, vinkristin (ISO, 2006; Noble, 1990), vinorelbine, vindesin (de Papua *et al.*, 1999; Roberge *et al.*, 2000). Penelitian ini menegaskan kesalahan persepsi yang selama ini terjadi bahwa katarantin adalah senyawa antikanker (Wijawakusuma *et al.* 1992 dan Dalimartha, 2004). Nama katarantin memang merupakan nama yang sama dengan *Catharanthus roseus*. Uji sitotoksik pada ekstrak *C. roseus*

yang sangat aktif sebagai antikanker bukan karena katarantin yang ada di ekstrak tersebut, tetapi karena adanya vinkristin, vinblastin, vindesin dan vinorelbin dalam ekstrak tersebut.



Gambar 1. Persamaan garis hasil MTT katarantin pada konsentrasi 0, 15, 30, 60, 120 $\mu\text{g/mL}$ dan penentuan ID_{50} pada 98 $\mu\text{g/mL}$

Hasil analisis regresi absorbansi uji MTT digunakan untuk penentuan ID_{50} . Hasil menunjukkan bahwa katarantin kurang efektif sebagai antikanker. Hal ini dibuktikan dengan membandingkan antara kontrol dengan katarantin. Dari hasil uji t pada $\alpha = 0,001$ maka diperoleh hasil bahwa katarantin tidak berbeda nyata dengan kontrol. Walaupun perbedaan itu jika dikaitkan dengan aktivitas sebagai antikanker tetap tidak afektif, hal itu disebabkan karena ID_{50} nya masih jauh dari yang ditentukan yaitu $\leq 20 \mu\text{g/mL}$. ID_{50} ekstrak agregat sel masih di 58,5 $\mu\text{g/mL}$.

Jika dikaitkan dengan aktivitas antikanker obat antikanker vinkristin dan vinblastin, maka katarantin tidak efektif sebagai antikanker. Hal ini dibahas dari hasil uji antiproliferasi dan anti-calmodulin vinkristin dan vinblastin yang dilakukan oleh Molnar *et al.* (1995) menunjukkan bahwa IC_{50} vinkristin adalah 400 μM atau ID_{50} adalah 0,39 $\mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} vinblastin adalah 430 μM atau ID_{50} adalah 0,37 $\mu\text{g/mL}$. Apabila dibandingkan dengan hasil tersebut, maka katarantin tidak dapat dijadikan antikanker sendiri, tetapi harus digabungkan dengan vindolin atau monomerik alkaloid lainnya (Verma *et al.* 2007).

Sebagaimana dilaporkan oleh de Padua *et al.* (1999), Verma *et al.* (2007) dan Roberge *et al.* (2000) senyawa antikanker vinkristin dan vinblastin tidak dapat didapatkan dengan teknik sintetik kimia total,

disamping itu selama ini antikanker komersial tersebut dibuat secara semisintetik dan teknik semisintetik tersebut dikerjakan dengan menggabungkan monomer katarantin dengan monomer alkaloid lainnya dengan oksidasi katarantin singlet oksigen dalam larutan asam HCL 0,1 M (Verma, et al. 2007).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- Penghambatan pertumbuhan sel kanker oleh katarantin yang dilakukan secara *in vitro* atau ID₅₀ katarantin terjadi pada 98,2 µg/mL.
- Katarantin tidak efektif untuk menekan pertumbuhan kanker melalui uji MTT. Lebih efektif digunakan monomer atau prekursor antikanker dimer alkaloid (obat antikanker).
- Ekstrak agregat sel dan katarantin tidak efektif setelah dibandingkan dengan aktivitas antikanker vinkristin dan vinblastin.

Saran

Perlu dilanjutkan produksi katarantin pada skala bioreaktor, ini sangat penting karena produksi senyawa antikanker dimerik alkaloid seperti vinorelbin, vindesin, vinblastin dan vinkristin, sangat rendah pada *in vitro* sedangkan untuk mengatasi eksplorasi sumber daya alam sebagai tumbuhan obat agar tidak mengalami kepunahan teknik *in vitro* sangat dibutuhkan. Semisintetik merupakan solusi produksi antikanker yang tepat dengan menggabungkan katarantin dengan monomerik alkaloid lainnya agar antikanker baru didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandrova, R., I. Alexandrova, M. Velcheva, T. Varadinova. 2000. Phytoproduct and Cancer. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 4, 15-26
- Anonim. 2007a. Protocols MTT Assay (http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=2509) 15 Januari 2007.
- Anonim. 2007b. MTT assay for cell proliferation http://www.protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Cell_Growth_Cytotoxicity/MTTCell_Proliferation_Assay/index.html (15 Januari 2007).
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., and Boyd, M.R. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*. 48: 589-601.
- Asada, M. & M. L. Shuler. 1989. Stimulation of Ajmalicine Production and Excretion from *Catharanthus roseus* : Effect of Adsorption *in situ* Elicitor and Alginate immobilization. Dalam : *Applied of Microbiology Biotechnology*. 30 : 474 – 481.
- de Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. And Lemmens, R.H.M.J. (Editors). 1999. *Plant Resources of South East Asia* no. 12(1). *Medicinal and Poisonous plants* 1. PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia. p. 185-190
- Dicosmo, F. & M. Misawa. 1995. Plant Cell and Tissue Culture : Alternatives for Metabolites Productions. Dalam : *Biotechnology Advances*. 3 : 425 – 453.
- Fowler, M. W. 1983. *Commercial Application and Economic Aspect of Mass Plant Culture*, dalam: *Plant Biotechnology*. Mantell, S. H. & H. Smith. Cambridge University. London.
- Freshney, R.I. 2000. *Culture of animal cell: a manual of basic technique*, 4th ed. Willey-Liss Inc. Canada
- Hidayat, M. H. 2002. Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Heksana Daun *Eupatorium triplinerve* Vahl. Terhadap Kultur Sel Mieloma. *Jurnal ILMU DASAR*, Vol. 3 No.2, hal: 92-97
- ISO Indonesia. 2006. Informasi Spesialite Obat Indonesia Vol 41. Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. Jakarta

- Lazo Lab Protocol online MTT Assays
http://www.protocolonline.org/prot/CellBiology/Cell_Growth__Cytotoxicity/MTT_Cell_Proliferation_Assay/index.html (down load 15 Oktober 2006).
- Molnar, A., Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B.G., Ovadi, J. Anti-Calmodulin potency of indol alkaloids in *in vitro* systems.
- Noble, R.L. 1990. The discovery of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem. Cell Biol.* 68: 1344-1351.
- Oliff A, J.B.Gibbs, F. Cormick. 1996. New molecular targets for cancer therapy. *Scienti Am* 275 (3) : 110-115
- Pandiangan, D., B. Doodoh, D.M.F. Sumampow. 2000. Induksi kalus dan tunas *Catharanthus roseus*. Prosiding Seminar Nasional MIPA I "Pengembangan sains dan teknologi dalam pemanfaatan sumber daya alam". FMIPA UNSRAT Manado.
- Pandiangan, D. dan N. Nainggolan. 2006a. Produksi Alkaloid dari kalus tapak dara, *Jurnal Ilmiah Sains*. 6: 48-54.
- Pandiangan, D. dan N. Nainggolan. 2006b. Peningkatan produksi katarantin pada kultur kalus *C. roseus* yang diberi NAA. *Jurnal Hayati* 13:3 p.90-94
- Pandiangan, D., Rompas, D., Aritonang, H., Esyanti, R., Marwani, E. 2006a. Pengaruh triptofan terhadap pertumbuhan dan kandungan katarantin pada kultur kalus *C. roseus*. *Jurnal Matematika dan Sains* 11:4. p. 111-118.
- Pandiangan, D., Rompas, D., Aritonang, H., Esyanti, R., Marwani, E. 2006b. Produksi katarantin pada kultur agregat sel *C. roseus*: Optimasi dan peningkatan produksi. Laporan Penelitian Hibah Pekerti. Lembaga Penelitian UNSRAT.
- Roberge, R, Cinel, B., Anderson,H.J., Lim,L., Jiang, X., Xu, L., Bigg, C.M., Kelly, M.T. and Andersen, R.J. 2000. Cell-based Screen for Antimitotic Agents and identification of Analogues of Rhizoxin, Eleutherobin, and Paclitaxel in Natural Extracts. *Cancer Research* 60, 5052-5058.
- Scragg, A. H. 1994. Bioreactors for The Mass Cultivation of Plant Cells. Dalam : *Plant Biotechnology*. Fowler, M. W., Warren, G. S., & Moo-Young, M. Pergamon Press. Inc. New York. p. 49 - 62.
- Samiran. 2001. Tapak dara penumpas kanker payudara. Laboratorium Fitokimia, Balitbang Botani (Herbarium) LIPI Bogor. Dalam Majalah Intisari bulan Januari 2001.
- Shuler, M. L. & F. Kargi. 1992. *Bioprocess Engineering : Basic Concepts*. Prentice-Hall Inc. Engelwood Cliffs. New Jersey.
- Seger, R. Hanoch, T., Kraus, S., Fridman, Y., Bendetz-Nezer, S., Churland, D., Maik-Rachline, G., Shaul, Y.D., & Butenko, Y. 2004. Intracellular signaling cascades. Departement of Biological Regulation dalam <http://www.weizmann.ac.il/BiologicalReg/NewFiles/rony/publication.html>
- Stevan, F.R., Oliveira, M.B., Bucchi, D.F., Nosedá, Iacomini, M., & Duarte, M.E.2001. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. *J Submicrosc Cytol pathol* 33: 477-84
- Swanson, S.M., Pezzuto, J.M. 1990. Bioscreening Technique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis, in : Thompson, E.B., *Drug Bioscreening :Drug Evaluation Technique in Pharmacology*, VCH Publishers Inc., New York, p. 273-295.
- Wetter, L. R. & F. Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Ed. 2. Penerbit ITB. Bandung.
- Wijayakusuma, H.M.H., Dalihmarta, S., Winar, AS. 1992.*Tanaman Berkasiat Obat di Indonesia*, Jilid I. Pustaka Kartini, Ikapi Jaya.