

Peningkatan Kandungan Katarantin pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* dengan Pemberian *Naphtalene Acetic Acid*

The Enhancement of Catharanthine Content in Catharanthus roseus Callus Culture Treated with Naphtalene Acetic Acid

DINGSE PANDIANGAN^{1*}, NELSON NAINGGOLAN²

¹Jurusan Biologi, ²Jurusan Matematika, FMIPA, Universitas Sam Ratulangi, Jalan Kampus Bahu, Manado 95115

Diterima 16 September 2005/Disetujui 26 Mei 2006

The research aim was to examine the enhancement of catharanthine content in *Catharanthus roseus* callus culture added with different concentration of Naphtalene Acetic Acid (NAA). NAA treatment produced callus that formed hairy roots. Fresh and dry weight of callus increased as the increasing of NAA concentration. The catharanthine content of *C. roseus* callus culture was increased by adding NAA as well. The highest catharanthine content was found in 2.5 ppm NAA added callus.

Key words: *Catharanthus roseus*, callus, catharanthine, NAA

PENDAHULUAN

Tapak dara (*Catharanthus roseus* (L) G. Don), adalah semak tahunan yang banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias dan obat. Alexandrova *et al.* (2000), menyatakan tanaman ini berguna untuk mengobati hipertensi, diabetes, pendarahan akibat penurunan jumlah trombosit, *chorionic ephthelioma*, leukemia limfositik akut, leukemia monositik akut, limfosarkoma, dan sarcoma sel retikulum. Sekitar 100 macam alkaloid telah diidentifikasi pada tanaman ini (De Padua *et al.* 1999). Diantaranya adalah alkaloid antikanker seperti vinblastin, vinkristin, katarantin, dan leurosin (Wijayakusuma *et al.* 1992). Demikian juga Renault *et al.* (1999) mengemukakan bahwa penghasil vindolin, vinkristin, dan vinblastin yang dikomersialkan umumnya berasal dari tapak dara. Produksi 50 mg vinkristin dan 2 g vinblastin membutuhkan 1 ton daun kering *C. roseus*, karena kandungan dalam daun hanya sekitar 0.2-1.0% (Renault *et al.* 1999). Namun, Zhao *et al.* (2001b) menyatakan bahwa katarantin dapat diproduksi sebanyak 230 mg/l dalam kultur suspensi sel. Senyawa antikanker ini menekan atau menghambat pembelahan sel dengan membekukan protein mikrotubular pada metafase (Alexandrova *et al.* 2000).

Kultur jaringan tanaman seperti kultur suspensi sel, kalus, tunas, akar, dan agregat sel dapat memproduksi senyawa kimia berupa alkaloid dan sejenisnya yang tergolong metabolit sekunder. Alkaloid tertentu dihasilkan dalam kadar yang lebih tinggi melalui kultur jaringan daripada kandungan tanaman induknya (Vazquez-Flota *et al.* 1994; Zhao *et al.* 2001b). Keuntungan lain penggunaan kultur jaringan ini untuk produksi alkaloid adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksi lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil, dan mengurangi penggunaan lahan (Alexandrova *et al.* 2000).

Supaya produksi metabolit sekunder tinggi perlu dilakukan optimasi faktor-faktor internal dan eksternal (Zhao *et al.* 2001a). Optimasi faktor tersebut dapat dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap pertumbuhan dan tahap produksi. Zhao *et al.* (2001c) melaporkan bahwa produksi alkaloid pada media yang menggunakan 2,4-D mengalami penurunan bila dibandingkan dengan menggunakan NAA. Namun pertumbuhan kalus pada media yang menggunakan 2,4-D sangat tinggi, dan terjadi pertumbuhan yang rendah dengan NAA. Hal inilah yang melatarbelakangi penggunaan NAA dalam penelitian ini.

Tujuan penelitian ini adalah mengamati respons pembentukan (induksi) dan pertumbuhan kalus *C. roseus* terhadap pemberian perlakuan NAA, mencari media yang mengandung katarantin paling tinggi, dan mengukur kandungan katarantin pada setiap kalus dengan perlakuan NAA.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian. Bahan-bahan yang digunakan adalah komponen media MS, NAA, kinetin, agar, sukrosa, daun ke-3 atau ke-4 dari tunas apikal *C. roseus* yang berbunga putih. Media yang digunakan adalah MS + 0.15 ppm kinetin dengan variasi NAA seperti pada Tabel 1.

Penanaman. Daun yang telah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran 0.7 x 0.7 cm², selanjutnya ditanam pada medium. Setelah kalus terbentuk lalu disubkultur dengan cara memindahkan seluruh kalus yang terbentuk pada medium baru yang mempunyai komposisi nutrisi yang sama dengan medium sebelumnya. Subkultur pertama dilakukan pada umur empat minggu setelah penanaman (tiga minggu setelah terbentuk kalus), sedangkan subkultur kedua dan ketiga dilakukan pada kalus yang berumur tiga minggu setelah subkultur.

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-431-833216,
Fax. +62-431-853715, E-mail: dingsepan@yahoo.com

Ekstraksi dan Isolasi Alkaloid. Bahan kalus yang telah kering ditimbang sekitar 1 g. Pengekstrak yang digunakan sesuai dengan metode Pandiangan dan Nainggolan (2006) yang dimodifikasi, yaitu mengganti klorofom dengan diklorometana. Bahan kering digerus dengan metanol, lalu disaring. Residu dibilas dengan metanol sebanyak dua kali. Ekstrak metanol digabungkan, kemudian diuapkan. Sari metanol kental diasamkan dengan 10 ml HCl 0.5 M, sehingga diperoleh sari asam. Sari asam ditambahkan dengan NaOH 4 N, sehingga pH mencapai 10, kemudian diekstraksi dengan diklorometana sehingga diperoleh dua fraksi yaitu fraksi air dan diklorometana. Fraksi diklorometana diambil, sedangkan fraksi air dibuang. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali. Fraksi diklorometana dikeringkan dengan serbuk Na_2SO_4 anhidrat. Filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga kering kemudian dilarutkan dengan 1 ml metanol.

Analisis Kualitatif. Untuk mengidentifikasi adanya katarantin dalam ekstrak bahan, dilakukan analisis kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat kaca berlapis silika gel E. Merck GF₂₅₄. Sebagai pembanding dalam mengidentifikasi digunakan katarantin yang diperoleh dari Magdi El-Sayed dari Laboratorium Gorlaeus, Pusat Ilmu Pengetahuan Biofarma, Leiden-Nedherland. Pelat dipanaskan dalam oven 50 °C selama satu jam, lalu didinginkan. Selanjutnya, contoh dan senyawa pembanding diaplikasikan sekitar 2.0-3.0 ml dengan menggunakan mikropipet. Jarak aplikasi adalah 2.0 cm dari bawah, pinggir kiri, dan pinggir kanan. Jarak antar aplikasi contoh adalah 1.5 cm. Setelah itu, pelat dikeringkan selama kira-kira lima menit untuk menguapkan sisa pelarut metanol yang tertinggal. Kemudian, pelat dikembangkan dalam suatu bejana berisi larutan pengembang yang mengandung diklorometana, metanol, dan asam asetat (perbandingan 85:15:1), sampai mencapai 7 cm dari titik awal aplikasi contoh. Setelah diangkat dari bejana, pelat dikeringkan di udara terbuka selama 15 menit. Untuk menampakkan noda, pelat disinari di bawah sinar ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm. Kromatogram disemprot dengan reagen Dragendorf untuk menampakkan senyawa alkaloid. Selanjutnya, nilai Rf noda yang muncul pada kromatogram ditentukan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh setiap noda}}{\text{Jarak yang ditempuh larutan pengembang}}$$

Jarak diukur dari awal aplikasi contoh.

Analisis Kuantitatif Kandungan Katarantin. Analisis kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS, dengan GBC-Spectral Software. Kandungan senyawa alkaloid

katarantin diukur dengan menggerus gel pelat yang sudah diberi tanda di bawah UV. Kemudian gel pelat hasil gerusan tersebut dilarutkan dalam 4 ml metanol. Selanjutnya larutan disentrifugasi dan supernatannya diambil untuk menentukan kandungan katarantin. Sebelum dianalisis menggunakan spektrofotometer, larutan terlebih dahulu diberi reagen Dragendorf untuk mewarnai katarantin. Standar katarantin dan contoh dibaca dalam panjang gelombang 254 nm.

Analisis Data. Data dari hasil pengukuran dengan perlakuan konsentrasi NAA dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95%, kemudian diuji lanjut dengan Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Uji Statistik menggunakan program SPSS 10.01 ©2004.

HASIL

Induksi dan Pertumbuhan Kalus. Eksplan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium MS dengan penambahan NAA dari 0-2.5 ppm dan kinetin 0.15 ppm menunjukkan proliferasi sel yang dilanjutkan dengan pembentukan (induksi) kalus. Umumnya kalus mulai terbentuk pada hari ke-8 setelah penanaman, diikuti dengan pertumbuhan kalus yang makin membesar. Bulu akar muncul di atas kalus setelah 14 hari penanaman. Struktur ini terbentuk pada semua medium dengan konsentrasi NAA 0.5-2.5 ppm dan kinetin 0.15 ppm. Medium dengan konsentrasi kinetin 0.15 ppm tanpa NAA tidak terjadi pembentukan bulu akar. Ukuran kalus sangat kecil, dengan rata-rata berat kering 24.90 ± 8.70 mg (Tabel 2).

Eksplan yang ditanam pada medium dengan NAA 0.5 ppm pada umumnya membentuk kalus dan sedikit membentuk bulu akar. Pertumbuhan kalus lambat dan ukurannya kecil, dengan rata-rata berat kering 111.90 ± 30.10 mg (Tabel 2). Pada medium dengan NAA 1.0 dan 1.5 ppm terjadi pembentukan kalus dan akar yang hampir bersamaan. Akar yang mencapai permukaan medium akan kembali membentuk kalus. Proliferasi sel meningkat ketika konsentrasi NAA dinaikkan menjadi 2.0 ppm dan 2.5 ppm yang ditunjukkan dengan meningkatnya massa sel yang dihasilkan. Pada medium dengan NAA 2.0 dan 2.5 ppm sel-sel kalus aktif membelah, terlihat dari ukuran kalus yang cukup besar. Pembentukan akar terus terjadi disertai pembentukan kalus pada akar, sehingga ukuran kalus bertambah besar. Pada umur enam minggu kalus telah menutupi seluruh permukaan eksplan, sehingga dapat dibedakan tipe kalus yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi NAA. Setelah subkultur, pertumbuhan kalus terlihat lebih cepat, bila dibandingkan dengan kultur sebelumnya (tahap

Tabel 2. Nilai rata-rata dan persentase peningkatan berat kering kalus berakar *C. roseus* yang diberi NAA pada berbagai konsentrasi

Kalus/NAA (ppm)	Berat kering (mg) \pm std	Persentase peningkatan
K (0.0)	24.90 \pm 8.70a	-
A (0.5)	111.90 \pm 30.10ab	349.12
B (1.0)	166.60 \pm 31.60bc	568.46
C (1.5)	186.80 \pm 69.90bc	649.52
D (2.0)	241.20 \pm 60.80c	867.90
E (2.5)	335.70 \pm 138.20d	1246.95

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 1. Tipe media yang digunakan dengan penambahan berbagai konsentrasi NAA

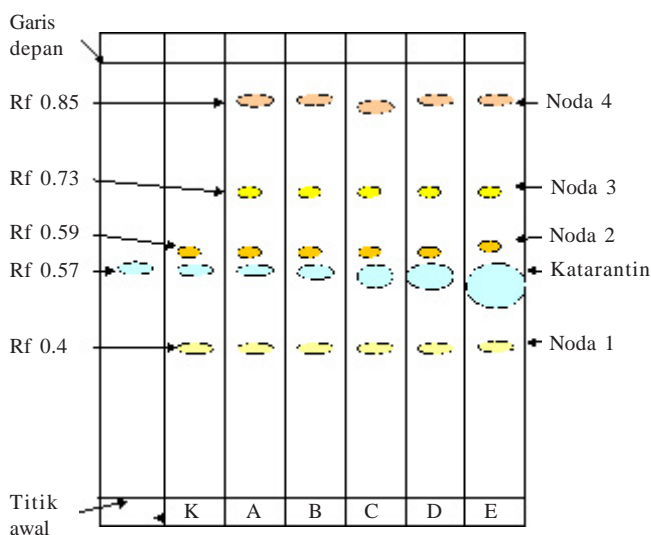
Tipe media	NAA (ppm)
K (Kontrol)	0.0
A	0.5
B	1.0
C	1.5
D	2.0
E	2.5

induksi) dan warna kalus semakin terang. Hal ini menunjukkan bahwa sel sudah mulai beradaptasi dengan lingkungannya terutama dengan media, sehingga kalus yang terbentuk tampak lebih baik. Besar atau ukuran kalus mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi NAA yang diberikan pada media. Berat kering kalus juga mengalami hal yang sama (Tabel 2).

Kandungan Katarantin. Hasil KLT senyawa standar katarantin, kalus K, A, B, C, D, dan E menghasilkan nodanoda dan Rf tertentu. Secara visual pengamatan katarantin pada UV 254 nm dari hasil KLT tampak berpendar putih kebiruan. Katarantin tampak paling dominan di antara alkaloid yang lainnya. Senyawa standar katarantin mempunyai nilai Rf 0.57 (Gambar 1). Ekstrak kontrol menghasilkan 3 noda, yaitu 1 noda untuk katarantin dan 2 noda lain, sedangkan pada kalus yang diberi NAA (A, B, C, D, dan E) menghasilkan 5 noda yang berbeda yaitu 1 noda katarantin dan 4 noda lain yang tidak dikenal. Noda katarantin ditemukan pada semua contoh, namun terdapat perbedaan dalam pendarannya. Pendaran noda meningkat dengan meningkatnya konsentrasi NAA.

Kandungan katarantin paling rendah terjadi pada kalus kontrol (Tabel 3). Perlakuan NAA pada media pertumbuhan kalus dapat meningkatkan kandungan katarantin. Perlakuan dengan 0.5 ppm NAA hanya meningkatkan katarantin sekitar 3.38% yaitu dari 119.69 $\mu\text{g/g}$ berat kering menjadi 123.74 $\mu\text{g/g}$ berat kering. Kandungan katarantin pada kalus *C. roseus* meningkat terus seiring dengan meningkatnya pemberian NAA pada media tumbuh (MS) (Tabel 3). Peningkatan A ke B ke C tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) pada taraf kepercayaan 95%, tetapi kandungan katarantin pada kalus E (2.5 ppm NAA) berbeda nyata dengan perlakuan NAA yang lebih rendah.

Data pengukuran katarantin menunjukkan peningkatan kandungan katarantin pada kalus yang diberi NAA. Kandungan katarantin kalus *C. roseus* yang diberi NAA



Gambar 2. Gambar skematik kromatografi lapis tipis gel silika ekstrak kalus *C. roseus* yang diberi NAA, dengan $\lambda = 254$ nm. Std = standar menggunakan katarantin murni; K, A, B, C, D, E merujuk pada Tabel 1.

Tabel 3. Nilai rata-rata dan persentase peningkatan kandungan katarantin kalus *C. roseus* yang diberi NAA pada berbagai konsentrasi

Kalus/NAA (ppm)	Kandungan katarantin ($\mu\text{g/g}$ berat kering) \pm std	Persentase peningkatan
K (0.0)	119.69 \pm 44.45a	-
A (0.5)	123.74 \pm 32.85a	3.38
B (1.0)	174.13 \pm 76.16a	42.10
C (1.5)	291.35 \pm 183.22ab	143.41
D (2.0)	620.14 \pm 79.95bc	418.11
E (2.5)	738.67 \pm 143.89c	517.13

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

meningkat mulai dari perlakuan 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 2.5 ppm NAA, berturut-turut menghasilkan berat kering katarantin sebesar 123.74, 174.13, 291.35, 620.14, 738.67 $\mu\text{g/g}$. Peningkatan yang paling tinggi terjadi pada kalus E sekitar 517.13% (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Induksi dan Pertumbuhan Kalus. Umumnya kalus terbentuk pada hari ke-8 sampai ke-10 setelah penanaman, diikuti dengan pertumbuhan kalus yang semakin membesar. Bulu akar kemudian muncul di bagian atas kalus setelah 14 hari tanam. Pada setiap pemberian NAA terbentuk bulu akar. Banyaknya bulu akar seiring dengan naiknya NAA. Hal ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh Fitriani (1999), yaitu pada perlakuan NAA 0.1 μM dan BAP 0.1 μM terbentuk kalus saja, demikian juga pada konsentrasi yang lebih tinggi, tapi harus diimbangi dengan BAP yang sama. Tapi jika NAA lebih tinggi maka akar akan terbentuk juga. Perlakuan 0.15 ppm NAA dalam penelitian ini tidak diamati, kemungkinan pada konsentrasi yang seimbang antara kinetin dan NAA akan terbentuk kalus saja. Namun, penelitian ini membuat variasi konsentrasi mengikuti hasil penelitian Pandiangan dan Nainggolan (2006), yang menggunakan variasi 2,4-D dan kinetin serta pertumbuhan kalus yang terbaik yaitu 1.5 ppm dan 0.15 ppm.

Selain hormon eksogen, respons kultur jaringan juga dipengaruhi oleh hormon endogen. Eksplan daun yang ditanam pada media tanpa NAA dengan kinetin 0.15 ppm tumbuh membentuk kalus sangat kecil yang ada hanya di pinggiran eksplan saja. Hal ini terjadi karena auksin endogen daun tidak cukup menginduksi kalus lebih besar. Kejadian ini juga menunjukkan bahwa konsentrasi NAA dan kinetin untuk induksi kalus berada pada konsentrasi yang seimbang.

Pada awal pertumbuhan, kalus berwarna putih dan umumnya terbentuk kalus kompak. Hal yang sama ditunjukkan oleh Zhao *et al.* (2001a), bahwa kalus yang terbentuk adalah kalus kompak dan mengandung ajmalisin tinggi. Struktur kalus yang dikultur pada medium MS dengan 2,4-D menunjukkan pertumbuhan kalus yang meremah dan berwarna keputihan-putihan sampai bening (Pandiangan & Nainggolan 2006). Kalus yang kompak mengandung alkaloid (katarantin, vindolin, ajmalisin, dan serpentin) lebih tinggi dibandingkan dengan kalus yang meremah. Akan tetapi, pertumbuhan kalus kompak lebih lambat dari pada kalus yang meremah. Pertumbuhan yang

lambat pada awal pembentukan kalus diduga karena adanya persaingan untuk mendapatkan prekursor yang sama untuk metabolisme primer dan sekunder.

Perlakuan NAA memberi pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan kalus (Tabel 2). Berat kering kalus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi NAA dibandingkan dengan kontrol. Seiring dengan peningkatan NAA, pembentukan akar juga meningkat. Dalam penelitian ini kalus dan akar ditimbang bersama-sama sebagai komponen pertumbuhan kalus akibat perlakuan NAA. Tampak bulu-bulu akar di permukaan kalus. Munculnya bulu-bulu akar di permukaan kalus terjadi akibat pemberian NAA terhadap kalus. NAA merangsang organogenesis akar. NAA dapat mengurangi kandungan N dan Ca tapi meningkatkan kandungan K (Ouma & Rice 2001). Adanya pengaruh perubahan Ca dan N serta K dalam sel yang ditimbulkan oleh NAA mengakibatkan aktifnya enzim protein kinase c (Salisbury & Ross 1992). Enzim tersebut akan mengaktifkan enzim fosforilase dan enzim lainnya yang berperan dalam pembentukan bulu akar. Terbentuknya bulu akar juga merupakan bukti bahwa kandungan alkaloid dalam kalus akan tinggi. Hal ini didukung oleh Vazquez-Flota *et al.* (1994), yang menyatakan bahwa kandungan ajmalisin dan katarantin lebih tinggi pada kultur akar berambut dari pada kultur yang lain. Demikian juga Jung dan Kwak (1992), Moreno-Valenzuela *et al.* (1998) bahwa diferensiasi sel ke akar dapat meningkatkan kandungan alkaloid melalui peningkatan enzim triptofan dekarboksilase dan stiktosidin sintetase. Enzim tersebut berperan penting dalam sintesis katarantin. Dediferensiasi menjadi sel atau bagian lain justru menurunkan kedua aktivitas enzim tersebut.

Rataan berat kering kalus yang diberi perlakuan NAA juga mengalami hal yang sama dengan berat basah kalus. Berat kering terendah terjadi pada kalus kontrol dan berat kering tertinggi pada kalus dengan perlakuan NAA paling tinggi. Secara berurutan berat kering kalus yang diberi NAA meningkat sesuai peningkatan konsentrasi NAA. Hasil uji lanjut DMRT 95% menunjukkan bahwa kalus kontrol dengan kalus A (0.5 ppm NAA) tidak berbeda nyata, sedangkan berat kering D dan E berbeda sangat nyata dengan kalus yang lain. Peningkatan kalus E juga paling besar yaitu 1246.95% atau sekitar 335.70 ± 138.20 mg (Tabel 2). Bila ditinjau dari biomasnya, penelitian lanjutan disarankan untuk menggunakan konsentrasi NAA 2.5 ppm.

Kandungan Katarantin. Katarantin adalah alkaloid indol yang terdapat pada *C. roseus*. Pada strukturnya dapat dilihat adanya indol (Gambar 1). Alkaloid indol pada *C. roseus* antara lain katarantin disintesis melalui dua jalur metabolisme yaitu jalur shikimat atau jalur indol dan jalur mevalonat atau jalur

terpenoid (Moreno-Valenzuela *et al.* 1998; Gaines 2004). Jalur shikimat menghasilkan triptamin, sedangkan jalur terpenoid menghasilkan sekologanin. Triptamin akan bergabung dengan sekologanin membentuk striktosidin oleh striktosidin sintetase, kemudian dengan bantuan enzim striktosidin β -glukosidase akan membentuk 4,21-dehidrogeisosijin yang selanjutnya akan membentuk stemadin. Stemadin akan diubah lagi menjadi katarantin yang disebut sebagai alkaloid indol (Moreno-Valenzuela *et al.* 1998; El-Sayed 2004; Gaines 2004).

Kandungan katarantin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi NAA. Peningkatan tersebut mungkin disebabkan oleh aktivasi gen untuk sintesis alkaloid indol yang dirangsang oleh NAA (Salisbury & Ross 1992). Zhao *et al.* (2001c) melaporkan juga bahwa, kandungan alkaloid lebih tinggi dengan perlakuan NAA. Perlakuan dengan penambahan NAA 0.5 ppm pada kultur kalus dapat menghasilkan katarantin yaitu sekitar 120 $\mu\text{g/g}$ berat kering, sedangkan dengan penambahan 2,4-D sebanyak 0.5 ppm tidak terdeteksi atau sangat rendah. Peningkatan kandungan katarantin setelah diberi NAA kemungkinan disebabkan juga oleh peningkatan sintesis protein atau enzim yang terlibat langsung dalam sintesis katarantin. El-Sayed *et al.* (2004), Whitmer dan Verpoorte (1998), dan Whitmer *et al.* (2002), melaporkan bahwa kultur sel *C. roseus* dengan penambahan NAA dan kinetin meningkatkan transkripsi mRNA untuk enzim striktosidin sintase (SS) dan triptofan dekarboksilase (TDC). Kedua enzim ini sangat penting dalam sintesis alkaloid indol. Secara keseluruhan sintesis alkaloid indol dikatalisis oleh kedua enzim tersebut. Gaines (2004) dan Whitmer *et al.* (2002) menjelaskan bahwa alkaloid seperti ajmalisin dan katarantin mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan enzim tersebut di atas.

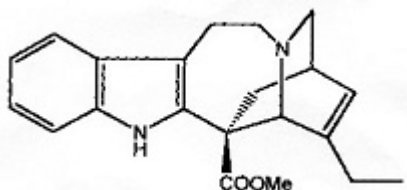
Peningkatan kandungan katarantin terjadi sampai pada perlakuan NAA yang paling tinggi. Hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mencari kandungan katarantin yang paling tinggi dengan perlakuan NAA optimum. Disamping itu perlu diidentifikasi alkaloid baru yang muncul akibat perlakuan NAA pada kalus *C. roseus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada proyek pengkajian dan penelitian ilmu pengetahuan terapan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Penulis mendapat bantuan dana melalui program Penelitian Dasar tahun 2004 dengan kontrak no. 87/P21 IPT/DDPM/PID/III/2004. Demikian juga saya ucapkan terima kasih banyak kepada Magdi El-Sayed atas bantuannya mengirimkan katarantin murni untuk penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandrova R, Alexandrova I, Velcheva M, Varadinova T. 2000. *Phytoproduct and Cancer: Experimental Pathology and Parasitology*. Bulgaria: Bulgarian Acad Sci.
- El-Sayed M, Choi H, Frederich M, Roytrakul S, Verpoorte R. 2004. Alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension culture fed with stemmadenine. *Biotechnol Lett* 26:793-798.



Gambar 1. Struktur kimia katarantin (Renault *et al.* 1999).

- De Padua LS, Bunyapraphatsara N, Lemmens RHMJ. 1999. *Medical and Poisonous Plants 1*. Bogor: PROSEA.
- Fitriani A. 1999. Pengaruh pemberian homogenat jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus tapak dara. *Hayati* 6:65-69.
- Gaines JL. 2004. Increasing alkaloid production from *Catharanthus roseus* suspensions through methyl jasmonate elicitation. *Pharm Eng* 24:1-6.
- Jung KH, Kwak SS. 1992. Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. *Biotechnol Lett* 14:695-700.
- Moreno-Valenzuela OA, Galaz-Avalos RM, Minero-Garcia Y, Loyola-Vargas VM. 1998. Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Reports* 18:99-104.
- Ouma G, Rice A. 2001. Effects of Naphthalene acetic acid, carbaryl and accel on thinning of apples. *J Agr Sci Technol* 3:45-56.
- Pandiangan D, Nainggolan N. 2006. Produksi alkaloid dari kalus tapak dara. *J Ilmiah Sains* 6:48-54.
- Renault JH, Nuzillard JM, Crouerour GL, Thepenier P. 1999. Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode. *J Chromatography A* 849:421-431.
- Salisbury FB, Ross CW. 1992. *Plant Physiology*. Ed ke-4. California: Wadsworth Publ Comp.
- Vazquez-Flota F, Moreno-Valenzuela O, Miranda-Ham ML, Coello-Coello J, Loyola-Vargas VM. 1994. Catharanthine and ajmalisine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 38:273-279.
- Whitmer S, Heijden R, Verpoorte R. 2002. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *J Biotechnol* 96:193-203.
- Whitmer S, Verpoorte R. 1998. Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss Org* 53:135-141.
- Wijayakusuma HMH, Dalihmarta S, Winar AS. 1992. *Tanaman Berkasiat Obat di Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Pustaka Kartini Ikapi Jaya.
- Zhao J, Hu Q, Guo YQ, Zhu WH. 2001a. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:693-698.
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q. 2000. Rare earths promote alkaloid production by *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnol Lett* 22:825-828.
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q. 2001b. Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. *Enzyme Microb Technol* 28:673-681.
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q. 2001c. Effect of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindolin and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. *Plant Growth Regul* 33:43-49.