

Pengaruh Penambahan DL-Triptofan terhadap Pertumbuhan Kalus dan Produksi Alkaloid-Reserpin Pule Pandak [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz.] secara In Vitro

The effect of DL-tryptophan on callus growth and alkaloid-reserpin production of pule pandak [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz] in vitro

HENI ARYATI, ENDANG ANGGARWULAN, SOLICHATUN

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126

* Korespondensi: Jl. Ir Sutami 36A Surakarta 57126. Telp. & Fax.: +62-271-663375. email: eanggarwulan@yahoo.com

Diterima: 21 Maret 2005. Disetujui: 7 Juni 2005.

Abstract. The purposes of this research were to study the effect of amino acid DL-tryptophan at various concentrations on culture callus growth and production of alkaloid-reserpin of *Rauvolfia serpentina* and to determine optimum concentration of DL-tryptophan to yield maximum alkaloid reserpin of the callus. This research was consisted of three phases. First phase was to determine compatible sterilan for *R. serpentina* leaf explants. Second phase was to initiate/ to induce callus formation from the explants. Third phase was treatment phase to know the influence of DL-tryptophan addition on growth and alkaloid-reserpin production of the callus. Experimental design that used was Completely Randomized Design (CRD). The treatment was concentration of the amino acid DL-tryptophan with three levels concentration three restating for each level. The levels were 0 mg/L, 10 mg/L and 20 mg/L. Obtained data were analyzed quantitatively and qualitatively. Quantitative data were wet weight, dry weight, growth rate and alkaloid contain of the callus at each level of concentration. Qualitative data have been measured were compatible sterilan test and callus morphology (color and texture). Quantitative data then have been analyzed by analysis of variance (ANOVA) and continued with DMRT test at level 95%. The result indicated that addition of DL- tryptophan precursor had an effect on the reduction of the callus growth of *R. serpentina* in media MS in vitro. Addition of DL-tryptophan precursor to production of alkaloid-reserpin of the callus of *R. serpentina* in media MS in vitro and optimum concentration of DL-tryptophan precursor that must be added to yield of alkaloid-reserpin could not be determined yet, it caused by the alkaloid-reserpin was not detected yet by the thin layer chromatography (TLC).

Key words: *Rauvolfia serpentina*, DL-tryptophan, callus growth, alkaloid, reserpin.

PENDAHULUAN

Pada saat ini pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan baku obat terus meningkat. Peningkatan kebutuhan akan bahan baku tersebut sejalan dengan kembalinya masyarakat memanfaatkan tumbuhan sebagai bahan obat alami (Amzu dan Haryanto dalam Lestari dan Mariska, 1997). Salah satu jenis tumbuhan obat yang saat ini banyak dibutuhkan adalah pule pandak. Pule pandak atau akar tikus [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz] banyak digunakan untuk bahan baku obat tradisional maupun obat modern. Tumbuhan ini mengandung antara lain reserpin, ajmalisin, sterol, dan alseroksilon (Youngken dalam Lestari dan Mariska, 2001). Senyawa-senyawa tersebut merupakan alkaloid indol monoterpenoid (Ramawat et al., 1999). Kegunaannya antara lain adalah sebagai obat penurun panas, penurun tekanan darah tinggi, radang jantung dan radang usus (Zuhud dkk. dalam Lestari dan Mariska, 2001).

Saat ini pule pandak dilaporkan termasuk tumbuhan yang langka dan mulai kritis keberadaannya (Zuhud dkk. dalam Lestari dan Mariska, 2001). Kebutuhan akar untuk membuat

ekstrak pule pandak diperkirakan hampir 650 ton per tahun (Ramawat et al., 1999), sehingga diperlukan cara yang tepat untuk mengatasi masalah ini; salah satunya adalah dengan kultur in vitro. Teknik kultur in vitro telah banyak digunakan sebagai salah satu alternatif untuk menghasilkan metabolit sekunder; karena dengan teknik ini senyawa yang dikehendaki dapat ditingkatkan jumlahnya dengan cara memanipulasi media maupun dengan penambahan senyawa prekursor/prazat (Sugiarso, 1999). Triptofan merupakan prazat alkaloid indol monoterpenoid, terutama untuk senyawa reserpin.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan prekursor triptofan terhadap pertumbuhan kalus *R. serpentina* dalam media MS (Murashige-Skoog); dan mengkaji pengaruh penambahan prekursor triptofan terhadap produksi alkaloid-reserpin pada kalus *R. serpentina*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh penambahan prekursor triptofan terhadap pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid-reserpin pada *R. serpentina* dalam media MS secara in vitro.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dari bulan Agustus tahun 2003 hingga Juli tahun 2004 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, UNS, Surakarta. Analisis reserpin dilakukan di Pusat Penelitian Obat Tradisional (PPOT) UGM, Yogyakarta.

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga taraf, yaitu 3 faktor tunggal konsentrasi DL-triptofan (0/kontrol, 10, dan 20 mg/L), tiap-tiap perlakuan dengan 3 ulangan.

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap, meliputi (i) persiapan, (ii) penentuan metode sterilisasi eksplan, (iii) induksi pembentukan kalus, (iv) penanaman kalus pada media perlakuan, dan (v) pengamatan dan pengujian hasil.

Data yang diamati meliputi pertumbuhan kalus pule pandak dan produksi alkaloid-reserpin yang terkandung di dalam kalus tanaman tersebut pada setiap perlakuan yang diberikan. Pengamatan pertumbuhan kalus meliputi berat kering kalus dan morfologi kalus (warna kalus dan tekstur kalus), sedangkan pengambilan data untuk mengetahui produksi alkaloid-reserpin yang dihasilkan dalam kalus pule pandak dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).

Analisis kuantitatif digunakan pada pengamatan parameter pertumbuhan kalus yang meliputi berat kering kalus dan kandungan alkaloidnya pada tiap perlakuan. Data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan Analisis Varian (ANOVA) dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT pada taraf 5%. Analisis kualitatif digunakan dalam penentuan uji sterilan yang cocok serta morfologi kalus yang meliputi warna dan tekstur kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui jenis sterilan yang cocok terhadap eksplan yang berupa daun pule pandak, dicoba dengan menggunakan berbagai macam metode sterilisasi yang tercantum dalam Tabel 1. Metode sterilisasi yang terbaik adalah yang mampu menekan tingkat kontaminasi serendah mungkin dengan tetap mempertahankan kesegaran jaringan tanaman setinggi mungkin.

Pertumbuhan kalus *R. serpentina* dalam media yang berbeda disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan tabel ini, metode sterilisasi yang paling baik digunakan untuk eksplan tersebut adalah metode sterilisasi nomor 5. Dari hasil pengamatan dapat diambil kesimpulan bahwa jenis media terbaik adalah nomor 2 karena pertumbuhan kalus *R. serpentina* yang paling baik terjadi pada jenis media tersebut dibandingkan dengan jenis media yang lain. Selanjutnya formulasi tersebut dipakai untuk menginduksi kalus pada eksplan daun pule pandak.

Tabel 1. Uji sterilan pada eksplan daun *R. serpentina*.

	Jenis sterilan (metode sterilisasi)	Waktu sterilisasi (menit)	Tingkat kontaminasi (%)	Kesegaran jaringan (*)	Jenis dan jumlah kontaminan (**)
1	Etanol 70% Akuades Clorox 30% Akuades 3x	0,5 3 5 @ 3	0	-	-
2	Etanol 70% Akuades Clorox 20% Akuades 3x	0,5 3 10 @ 3	0,65	+	Jamur ++
3	Etanol 65% Akuades Clorox 30% Akuades	0,5 3 5 @ 3	0	++	-
4	Etanol 65% Akuades Clorox 20% Akuades 3x	0,5 3 10 @ 3	0	+	-
5	Etanol 60% Akuades Clorox 30% Akuades 3x	0,5 3 5 @ 3	0	++ +	-
6	Etanol 60% Akuades Clorox 20% Akuades 3x	0,5 3 10 @ 3	2,6	-	Bakteri ++

Keterangan: *) Kesegaran Jaringan: (-): tidak segar, (+) kurang segar, (++) cukup segar, (+++) segar. **) Jumlah kontaminan: (-) tidak ada, (+) sedikit, (++) sedang, (+++) banyak.

Tabel 2. Pertumbuhan kalus *R. serpentina* dalam media yang berbeda.

Jenis media	Warna eksplan	Warna kalus	Pertumbuhan kalus	Keterangan lain
1	Hijau tua	Hijau muda	++	-
2	Hijau tua	Hijau muda	+++	-
3	Hijau-coklat	Kuning-coklat	+	-
4	Hijau-coklat-kuning	Hijau-coklat-kuning	++	Tumbuh akar
5	Hijau tua	Hijau-kuning	+	-

Keterangan: 1. Media dasar MS + NAA 1 mg/L + kinetin 1 mg/L, 2. Media dasar MS + NAA 2 mg/L + kinetin 2 mg/L, 3. Media dasar MS+NAA 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L + air kelapa 100 ml/l, 4. Media dasar MS+NAA 2 mg/L + kinetin 1 mg/L + air kelapa 100 ml/l, 5. Media dasar MS+NAA 2 mg/L + kinetin 0,5 mg/L + air kelapa 200 ml/l; (+) kurang baik, (++) cukup baik, (+++) sangat baik.

Pertumbuhan kalus pada media perlakuan

Morfologi (tekstur dan warna) kalus

Morfologi kalus pada ketiga media perlakuan dari awal sampai akhir pengamatan tidak mengalami perubahan, tekstur kalus kompak dan warna kalus hijau tua. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata (tidak signifikan) terhadap perbedaan tekstur dan warna kalus.

Berat kering kalus

Hasil pengamatan mengenai berat kering kalus *R. serpentina* pada media perlakuan tersaji pada Tabel 3. Dari hasil analisis varian dan uji DMRT pada taraf 5% diketahui bahwa setiap perlakuan yang diberikan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap rata-rata berat kering kalus *R. serpentina* pada media perlakuan tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan asam amino DL-triptofan kurang berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus yang salah satu penerapannya dapat diketahui melalui perubahan (pertambahan) berat kering yang signifikan.

Tabel 3. Rata-rata berat kering (gram) kalus *R. serpentina* (umur 15 hari pada media perlakuan)

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rerata
	1	2	3		
T ₀	0,48	0,40	0,47	1,3500	0,4500
T ₁₀	0,38	0,72	0,59	1,6900	0,5633
T ₂₀	0,47	0,58	0,19	1,2400	0,4133

Keterangan: T₀ = konsentrasi DL-triptofan 0 mg/L, T₁₀ = konsentrasi DL-triptofan 10 mg/L, T₂₀ = konsentrasi DL-triptofan 20 mg/L.

Analisis kandungan alkaloid-reserpin pada kalus

Hasil analisis alkaloid-reserpin yang terkandung pada kalus *R. serpentina* dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) adalah negatif karena kandungan alkaloid di dalam jaringan tanaman terlalu rendah sehingga tidak dapat dideteksi. Hasil yang negatif tersebut kemungkinan disebabkan:

(i) Eksplan yang digunakan (berupa daun muda) yang mengandung alkaloid lebih rendah daripada di dalam akar *R. serpentina*, sehingga kalus yang diperoleh dari eksplan tersebut juga menghasilkan kadar alkaloid yang rendah. Hal ini menyebabkan tidak terdeteksinya alkaloid indol monoterpenoid (AIM) pada pelat KLT. Hasil tersebut serupa dengan laporan penelitian Kinnersley dan Dougall dalam Ernawati (1992) bahwa nikotin yang dihasilkan kalus *Nicotiana tabacum* sangat ditentukan oleh genotipe tanaman induk asal eksplan yang digunakan untuk menginisiasi kalus tersebut. Selain itu menurut Zenk et al. dalam Wattimena (1992) pada kultur *Catharanthus roseus*, kalus yang berasal dari eksplan yang menghasilkan alkaloid tinggi cenderung untuk menghasilkan alkaloid yang tinggi pula.

(ii) Sifat kimia alkaloid yang paling penting ialah kebiasaannya. Metode pemurnian dan pencirian

umumnya mengandalkan sifat tersebut. Masalah yang timbul pada beberapa kasus ialah bahwa alkaloid berada dalam bentuk terikat yang tidak dapat dibebaskan pada kondisi ekstraksi yang biasa. Senyawa pengompleksnya mungkin polisakarida atau glikoprotein yang dapat melepaskan alkaloid jika diperlakukan dengan asam (Robinson, 1995).

(iii) Bentuk kultur kalus yang digunakan kurang tepat karena kalus yang digunakan belum mengalami diferensiasi. Kesimpulan tersebut diambil berdasarkan pada: (a) Metabolisme sekunder merupakan bentuk diferensiasi dari sel-sel tanaman. Beberapa bentuk diferensiasi dapat diciptakan dengan mudah ke dalam kultur-kultur sel daripada ke dalam kultur-kultur lainnya. Dengan mempertimbangkan bahwa kultur larutan sel terdiri dari bagian-bagian sel yang tumbuh dengan cepat maka hal ini bukan merupakan kondisi yang optimal bagi diferensiasi. Produksi alkaloid dari berbagai kultur sel dan kultur organ dari spesies *Cinchona* secara jelas menunjukkan bahwa diferensiasi paralel dengan produksi alkaloid (Sakya, 1995). (b) Pembentukan metabolit sekunder akan lebih banyak pada saat kalus berdiferensiasi menjadi tunas maupun akar (Staba, 1980). (c) Keberhasilan pembentukan metabolit sekunder melalui kultur in vitro sangat tergantung pada faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan metabolit tersebut pada tanaman utuh. Satu hal yang sangat penting yaitu keeratan hubungan antara pembentukan metabolit sekunder dengan proses diferensiasi, sebab terjadinya metabolit sekunder pada kultur in vitro hanya merupakan hasil sampingan dari diferensiasi (Dalimoenthe, 1987). (d) Diferensiasi dari kalus atau suspensi sel seringkali dapat menyebabkan munculnya kembali kemampuan biosintesis untuk memproduksi metabolit sekunder (Charlwood et al., dalam Subroto dan Artanti, 1996).

(iv) Tumbuhan yang sudah jelas-jelas dikenal sebagai tumbuhan alkaloid ternyata tidak semua jaringannya mengandung alkaloid atau tidak mengandung alkaloid pada setiap tahap pertumbuhan dan pada semua lokasi geografis (Robinson, 1995). Kondisi geografis ternyata juga mempengaruhi kadar alkaloid (Hamid, 1995).

(v) Rendahnya ekspresi dari gen-gen yang mengontrol tahap-tahap penting dari jalur biosintesis (Subroto dan Artanti, 1996). Hal ini didukung oleh: (a) Metabolit sekunder biasanya diekspresikan dalam jumlah banyak (highly expressed) dalam organ-organ yang terdiferensiasi dan jaringan-jaringan dari tanaman utuh/ lengkap, dan ditekan (repressed) dalam sel-sel kultur (Trolinder, 1991). (b) Metabolisme sekunder dalam tanaman kemungkinan juga sangat dipengaruhi oleh perubahan ekspresi dari gen-gen pengatur (Edwards dan Gatehouse, 1999). (c) Penelitian pada saat ini menyimpulkan bahwa bagian (compartmen) spesifik dari sel, jaringan dan organ pada biosintesis AIM, dan metabolisme sekunder secara umum, diatur oleh ekspresi yang berbeda dari jalur-jalur biosintesis dan dikontrol oleh transport intermedier pada tempat yang tepat untuk akumulasi (Pierre et

al., 1999). (d) Hubungan tentang perbedaan esensial dalam jalur keseluruhan ekspresi gen-gen antara disorganised dan organised culture adalah bahwa meskipun jalur struktural gen-gen yang tepat dapat menunjukkan keberadaannya dalam disorganised culture, gen-gen tersebut seringkali tidak diekspresikan. Hal ini mungkin menyebabkan kenyataan bahwa faktor-faktor transkripsi yang tepat menjadi tidak aktif. Bila pembentukan faktor-faktor transkripsi yang tepat dapat diaktifkan (switched on), maka pembentukan produk sekunder dapat terjadi (Walton et al., 1999).

(vi) Adanya kendala biologis dari sel atau jaringan yang menghambat sintesis metabolit sekunder. Hal ini didasarkan pada: (a) Salah satu faktor utama yang menentukan ada atau tidaknya akumulasi metabolit sekunder, ditentukan juga oleh hubungannya dengan pembentukan dan diferensiasi (perbedaan sifat) sel dari tanaman tersebut. Selain itu, keberhasilan sintesis metabolit sekunder pada kultur in vitro dipengaruhi oleh faktor lingkungan media (yaitu cahaya, ZPT, prekursor serta nutrisi) dan kendala biologis (yaitu pertumbuhan, perbedaan morfologi dan perbedaan aktivitas biosintesis) (Butcher dan Tabata dalam Dalimoenthe, 1987). (b) Perbedaan morfologi: pada tanaman tingkat tinggi, ada senyawa-senyawa tertentu yang disintesis atau diakumulasikan hanya oleh organ atau jaringan tertentu. Misalnya nikotin disintesis oleh bagian akar tembakau, kemudian diangkut (ditranslokasikan) ke daun untuk disimpan. Pembentukan morfin tidak dapat terjadi, karena bentuk sel yang tidak teratur pada kultur tersebut. Tetapi ada juga senyawa-senyawa yang tidak membutuhkan organ atau jaringan khusus untuk menghasilkan metabolit sekunder, misalnya derivat shikonin, resin, opium dan lain sebagainya (Tabata dalam Dalimoenthe, 1987). Mengingat reserpin terlokalisasi sebagian besar pada bagian akar tanaman *R. serpentina* di alam, maka kemungkinan akumulasinya di dalam kultur in vitro tidak dapat terjadi karena organ penyimpanannya yang berupa akar tidak tersedia di dalam kultur kalus tersebut. (c) perbedaan aktivitas biosintesis: perbedaan bentuk dan fungsi sel merupakan faktor lain yang juga berpengaruh terhadap sintesis metabolit sekunder (Tabata dalam Dalimoenthe, 1987). Dengan demikian kemungkinan terdapat perbedaan bentuk dan fungsi sel pada kalus *R. serpentina* dalam kultur in vitro dan di dalam tanaman *R. serpentina* in vivo, sehingga menyebabkan perbedaan aktivitas biosintesis dan sintesis metabolit sekunder di dalam kalus tidak dapat berlangsung dengan baik. Butcher dalam Dalimoenthe (1987) menyatakan bahwa tampaknya enzim, organel spesifik, kecocokan antara enzim dengan substrat, dan ketersediaan lokasi untuk penyimpanan, merupakan pembatas untuk sintesis senyawa-senyawa metabolit sekunder.

(vii) Prekursor DL-triptofan tidak digunakan untuk membentuk alkaloid-reserpin, tetapi digunakan untuk membentuk senyawa yang lain, misalnya: (a) asam nikotinat, karena triptofan juga merupakan prazat dari asam nikotinat/ niasin

(vitamin B) (Manitto, 1992). (b) fitoaleksin, glukosinolat, indole- dan anthranilat. Tanaman juga menggunakan jalur biosintesis triptofan untuk menyediakan prekursor terhadap sintesis hormon auksin (Indole-3-acetic acid/ IAA), fitoaleksin, glukosinolat, dan indole- serta anthranilat yang keduanya merupakan derivat alkaloid (Radwanski dan Last, 1995). (c) hormon auksin (Indole-3-acetic acid/ IAA) (Salisbury dan Ross, 1995; Radwanski dan Last, 1995).

(viii) Pada proses biosintesis AIM dibutuhkan tipe sel spesifik dan kontrol perkembangan yang tidak tersedia di dalam kultur *R. serpentina*, sehingga proses biosintesis AIM menjadi terhambat. Kesimpulan ini didasarkan hasil penelitian Pierre et al. (1999) bahwa koordinasi pengaturan dari gen-gen *tdc* dan *str 1* mRNAs (gen-gen yang menyandikan enzim triptofan dekarboksilase dan striktosidin sintase) pada tanaman *Catharanthus roseus* berhubungan (berasosiasi) dengan tipe sel spesifik dan kontrol perkembangan (developmental control). Dalam morfogenesis, proses perkembangan menghasilkan spesialisasi biokimia dari sel-sel pada biosintesis dan/atau akumulasi metabolit sekunder, seperti fenilpropanoid, monoterpenoid dan alkaloid.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil pengamatan dan pembahasan, dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan prekursor DL-triptofan berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhan kalus *R. serpentina* dalam media MS secara in vitro. Selain itu penambahan prekursor DL-triptofan terhadap produksi alkaloid-reserpin pada kalus *R. serpentina* dalam media MS secara in vitro belum dapat diketahui secara pasti, karena belum terdeteksi pada hasil analisis dengan KLT.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang analisis kandungan alkaloid-reserpin secara kualitatif dan kuantitatif sekaligus isolasinya dengan metode dan alat lain yang lebih baik, misalnya dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)/ high performance liquid chromatography (HPLC) yang mempunyai tingkat kepekaan yang lebih tinggi daripada KLT dalam menganalisis kandungan senyawa kimia dalam jaringan tumbuhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Dalimoenthe, S.L. 1987. Kultur jaringan sebagai sarana untuk menghasilkan metabolit sekunder. Dalam Pramono, S., D. Gunawan dan C.J. Soegihardjo (ed.) Buku Risalah Seminar Nasional Metabolit Sekunder 1987. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Edwards, R. and J.A. Gatehouse. 1999. Secondary Metabolism. In Lea, P.J. and R.C. Leegood (eds.) Plant Biochemistry and Molecular Biology. Second edition. London: John Wiley and Sons Ltd.
- Ernawati, A. 1992. Produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder dengan kultur jaringan tanaman. Dalam

- Wattimena, G.A. (ed.) Bioteknologi Tanaman. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Hamid, A. 1995. Khasiat pule pandak. *Trubus* 304: 72-73.
- Lestari, E.G. dan I. Mariska. 1997. Kultur in vitro sebagai metode pelestarian tumbuhan obat langka. *Buletin Plasma Nutfah* 2 (1): 1-8.
- Lestari, E.G. dan I. Mariska, 2001. Perbanyakkan dan penyimpanan tanaman *Rauvolfia serpentina* secara in vitro. *Bul. Plasma Nutfah*. 7 (1): 40-45.
- Manitto, P. 1992. Biosintesis Produk Alami. Penerjemah: Koensoemardiyah. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Pierre, B.S., F.A.V. Flota, and V.D. Luca. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predict intercellular translocation of a pathway intermediate. www.plantphysiol.org.
- Radwanski, E.R., and R.L. Last. 1995. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell* 7 (7): 921-934.
- Ramawat, K.G., R. Sharma, and S.S. Suri. 1999. Medicinal plants. In Ramawat, K.G. and J.M. Merillon (ed.) *Biotechnology Secondary Metabolites*. New Hampshire: Science Publishers, Inc.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerjemah: Padmawinata, K. Bandung: Penerbit ITB.
- Sakya, A.T. 1995. Produksi metabolit sekunder melalui pengembangan sel tanaman. *Caraka Tani* 11: 7-17.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. Bandung: Penerbit ITB.
- Staba, E.J. 1980. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemistry*. London: CRC Press, Inc.
- Subroto, M.A. dan N. Artanti. 1996. Produksi metabolit sekunder dari tanaman melalui teknik biak sel dan jaringan: suatu rintisan ke arah tahap komersialisasi industri. *Warta Biotek* 10 (1): 5-9.
- Sugiarso, D. 1999. Kadar alkaloid total kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don pada media MS dengan penambahan triptofan. *Abstrak Hasil Penelitian* 12: 59-60.
- Trolinder, N.L. 1991. Use of plant bioregulators in tissue culture. In Gausman, H.W. (ed.) *Plant Biochemical Regulators*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Walton, N.J., A.W. Alfermann, and M.J.C. Rhodes. 1999. Production of secondary metabolites in cell and differentiated organ cultures. In Wink, M. (ed.) *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield: Sheffield Academic Press and CRC Press.
- Wattimena, G.A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*, Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.