

ELISITASIPENINGKATANPRODUKSI AJMALISIN OLEH KALUS
Catharantus roseus (L.) G. Don.¹
[Elicitation Increasing Production Ajmalicine by Callus Cultures
Catharantus roseus (L.) G. Don.]

Marina Silalahi

Prodi Pendidikan Biologi, Fakultas Ilmu Pendidikan dan Keguruan, Universitas Kristen Indonesia,
JlnMayjen Sutoyo Cawang, Jakarta Timur 13630 Telp (021) 8009190 ext 315
e-mail: Marina.Silalahi@uki.ac.id

ABSTRACT

An experiment to study the effect of soft fraction derived from *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen) to elicit ajmalicine production by *Catharantus roseus* (L.) G. Don. callus cultures has been conducted. Callus were induced from leaf segment and grew on Zenk medium supplemented with $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-6} M BAP respectively. Callus on the third subculture level were elicited with soft fraction derived from *S. cerevisiae*. The following concentrations of elicitor tested were 0, 0,5, 1,0 and 2,5 % (g/v), and the harvesting times were 0, 18, 36 and 72 hour respectively. Influence of elicitor to production of ajmalicine by the callus were analyzed qualitatively and quantitatively by using high performance liquid chromatography (HPLC). A significant increasing of ajmalicine content in the callus ($303,475 \pm 5,602 \mu\text{g/gDW}$) was achieved by addition of elicitor of 0,5 % (g/v) after 36 hour. This study showed a significant increase of ajmalicine production in *C. roseus* callus cultures after being challenged with elicitor derived from *S. cerevisiae* i.e. 69,334%.

Kata kunci/ key words: Ajmalisin/ ajmalisine, elisitor/ elicitor, *Catharantus roseus*, kalus/callus.

PENDAHULUAN

Senyawa-senyawa kimia yang digunakan dalam industri farmasi sebagian besar merupakan metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan. Metabolit tersebut mempunyai peranan penting dalam usaha pengembangan obat-obatan. Salah satu sumber tanaman obat yang banyak digunakan adalah *Catharantus roseus* (L.) G. Don. Terdapat lebih 100 senyawa alkaloid yang telah diisolasi dari tanaman *C. roseus* diantaranya ajmalisin dan serpentin dari akar serta vinkristin dan vinblastin dari daun (Verpoorte *et al*, 1991). Senyawa ajmalisin yang dihasilkan tanaman *C. roseus* banyak digunakan untuk mengobati penyakit gangguan sirkulasi (peredaran) darah dan hipertensi (Moreno *et al*, 1994). Ajmalisin merupakan senyawa golongan alkaloid indol yang dihasilkan oleh tanaman dan dapat digunakan untuk mengatasi penyakit hipertensi. Secara alami ajmalisin dapat diisolasi terutama dari bagian akar tanaman *C. roseus*, namun kadarnya sangat kecil dan juga biaya pemurniannya sangat mahal. Verpoorte *et al.*, (1991) untuk mendapatkan 3,6 kg ajmalisin diperlukan sekitar 200-300 ton akar *C. roseus*.

Kultur jaringan dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder,

karena dapat dilakukan modifikasi media, zat pengatur tumbuh, sumber karbon untuk menghasilkan metabolit yang diinginkan. 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).

Teknik yang telah banyak diteliti untuk meningkatkan senyawa kandungan metabolit sekunder diantaranya melalui amobilisasi, modifikasi media, dan juga elisitasi. Elisitasi adalah suatu metode untuk meningkatkan fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya dengan menambahkan berbagai elisitor, baik berupa faktor biotik maupun abiotik (Buitelaar *et al.*, 1991 dan Wiendief *al.*, 1992).

Pada tanaman *C. roseus* elisitasi dengan menggunakan jamur *Pythium aphanidermatum* sudah banyak diteliti dan terbukti mampu meningkatkan kandungan ajmalisin. Elisitasi menggunakan homogenat jamur *P. aphanidermatum* ternyata dapat meningkatkan kandungan ajmalisin sebesar 66,4% pada kultur kalus *C. roseus*, sedangkan pada kultur kalus berakar meningkatkan kandungan ajmalisin sebesar 148,9% pada konsentrasi elisitor 1mg BK/mL (Aprianita, 1999 dan Fitriani, 1998).

Penggunaan jamur *P. aphanidermatum* sering mengalami hambatan karena jamur tersebut pathogen yang berbahaya bagi kesehatan manusia, sehingga perlu dicari alternatif lain. Penggunaan ragi sebagai bahan elisitor mempunyai beberapa kelebihan diantaranya, mudah diperoleh dan tidak pathogen pada manusia, siklus hidupnya pendek dan mudah ditemukan. Funk *et al.* (1986) melaporkan bahwa glukon dari ekstrak ragi efektif menginduksi sintesis phaseolin pada kultur sel *Glicine max*. Produksi barberin pada kultur sel *Thalictrum rugosum* dapat meningkat 4 kali lipat, dan alkaloid pada kultur *Eschscholzia californica* meningkat 30 kali lipat setelah dielisitasi dengan ekstrak ragi (Buiteilaaref *a/.*, 1991).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan menguji apakah *S. cerevisia* juga memiliki efek elicit atau tidak. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan alternatif pemecahan masalah dalam meningkatkan produksi ajmalisin untuk bahan obat.

BAHANDANMETODE

Bahan Elisitor

Biakan murni *S. cerevisiae* ditumbuhkan pada medium "glucose yeast extract". Media tersebut mengandung pepton (10g); ekstrak ragi (5g); glukosa (20g), akuades (1L) dan pH 5. Kultur diaktivasi pada medium padat maupun medium cair. Pada medium cair dilakukan pengocokan dengan kecepatan 100 rpm. Kurva pertumbuhan diperoleh dengan menggunakan metode "plate count" hingga diketahui seluruh fase pertumbuhannya. Ragi yang sudah mencapai pertumbuhan maksimum dibuat menjadi homogenat serbuk halus. Pembuatan serbuk *S. cerevisiae* dilakukan dengan cara: *S. cerevisiae* yang telah mencapai pertumbuhan maksimum diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit, kemudian dikeringkan hingga beratnya konstan. Kemudian *S. cerevisiae* digerus dengan menggunakan mortar hingga halus dan dilarutkan dalam akuades steril sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Konsentrasi serbuk *S. cerevisiae* yang digunakan adalah 0,5, 1,0 dan 2,5% (Suvarnalatha *et al.*, 1994; Eilert *et al.*, 1986).

Induksi Kalus

Ekspan yang digunakan adalah daun kedua

dari tanaman *C. roseus* yang berumur 3 bulan. Daun dipotong-potong dengan ukuran 1 x 1 cm² dan ditanam pada medium Zenk dengan penambahan 2,5 x 10⁻⁴M naphthalena acetat acid (NAA) dan 10⁻⁵M benzyl amino purine (BAP) (Fitriani, 1998). Kultur diinkubasi pada suhu kamar dalam kondisi gelap. Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan ke medium yang baru sebanyak 3 kali dan dilakukan setiap 3 minggu.

Penentuan Kurva Tumbuh Kalus dan Kandungan Ajmalisin

Kurva tumbuh kalus dan kurva kandungan ajmalisin ditentukan dari berat kering kalus. Pemanenan kalus dilakukan setiap 2 hari dan dihentikan setelah seluruh fase pertumbuhan kalus dan kandungan ajmalisin diketahui. Kalus diekstraksi dengan metode modifikasi Lee *et al.* (1981 dalam Asada and Shuler, 1989). Untuk menentukan kandungan ajmalisin dilakukan dengan menggunakan HPLC. Dari kurva pertumbuhan kalus dan kandungan ajmalisin dapat ditentukan waktu yang tepat untuk melakukan elisitasi.

Elisitasi

Elisitasi dilakukan pada kultur yang telah disubkultur 3 kali dengan menambahkan homegenat serbuk halus *S. cerevisiae* sesuai dengan konsentrasi (0,5, 1,0 dan 2,5% g/v) sebanyak 1mL pada kalus, sedangkan pada kalus control ditambahkan akuades steril. Pemanenan dilakukan pada jam ke 0,18,36, dan 72 (Eilert *et al.*, 1986) setelah kontak dengan elisitor. Kalus yang dipanen dikeringkan dalam oven hingga beratnya konstan pada suhu 50°C.

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif

Senyawa ajmalisin dalam ekstrak dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif dengan HPLC. Jenis kolom yang digunakan adalah Shim-Pack CLC-ODS 0,15 m dengan diameter 6,0 mm, sedangkan analisis dilakukan dengan kromatopak Shimadzu CR-7A Plus. Fase gerak yang digunakan adalah larutan metanol, asetonitril dan 5 mM diamonium hidrogen fosfat dengan perbandingan 3:4:3 dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Panjang gelombang UV yang digunakan adalah 298 nm (Sim *et al.*, 1994). Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara ajmalisin standar dengan waktu retensi sampel. Analisis kuantitatif dilakukan dengan cara mengkonversikan

luas area sampel dengan luas area standar pada kurva kalibrasi standar.

Uji statistik

Uji statistik yang digunakan untuk mengetahui kandungan ajmalisin pada kultur akar *C. roseus* sebelum dan sesudah perlakuan elisitasi adalah analisis variansi (ANOVA), apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan DMRT (Duncan's Multiple Range Test) pada tingkat kepercayaan 95%.

HASIL

Kurva tumbuh ragi

Kurva pertumbuhan ragi yang dikultur pada medium "glucose yeast extract" dapat dilihat pada gambar 1. Gambar tersebut memperlihatkan bahwa fase pertumbuhan cepat dimulai dari jam kedua sampai jam keempat belas, dan jam selanjutnya selanjutnya memasuki fase stasioner.

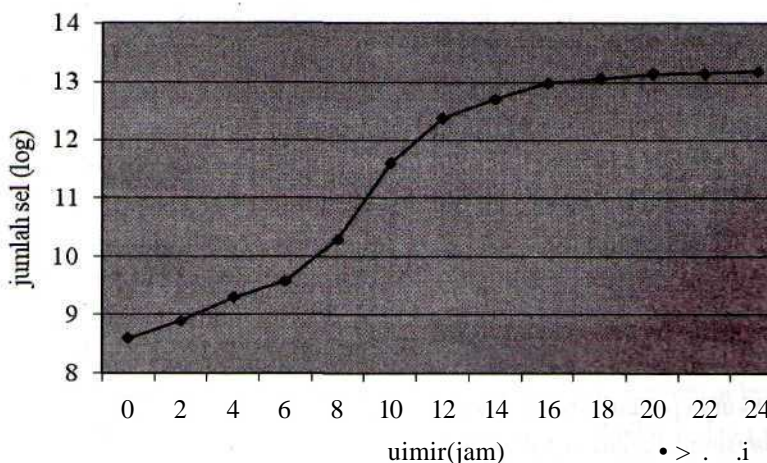
Induksi kalus

Potongan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium Zenk dengan penambahan $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-5} M BAP menunjukkan terjadinya proliferasi sel yang dilanjutkan dengan pembentukan kalus. Respon eksplan terhadap media dimulai pada hari ketiga, hal ini terlihat dengan terjadinya pengkerutan dan perbesaran pada eksplan. Inisiasi kalus dimulai pada hari ketujuh setelah penanaman dan terbentuk pada daerah yang mengalami luka atau pada bagian tepi dari

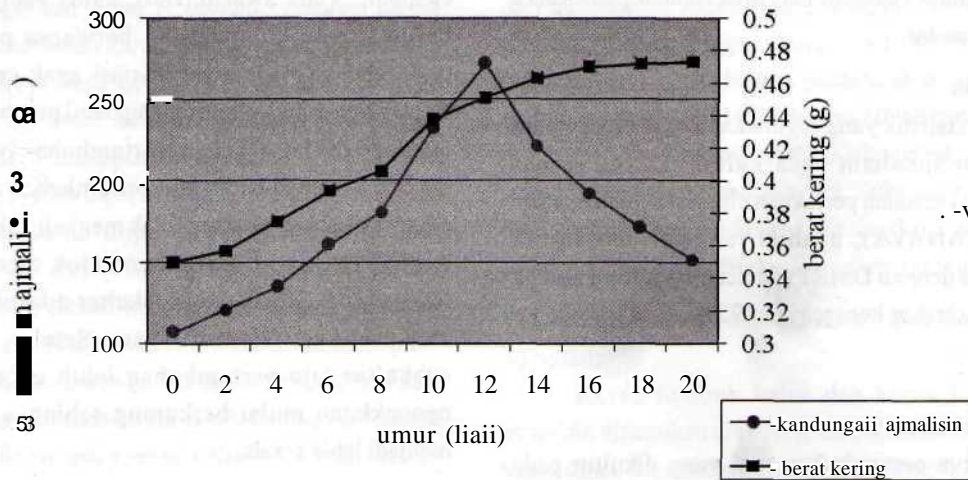
eksplan. Pada awal inisiasi, kalus yang terbentuk berupa kalus kompak dan berwarna putih, laju pertumbuhan pada awal inisiasi agak cepat, tetapi setelah tiga minggu kalus mengalami perubahan warna menjadi coklat dan laju pertumbuhannya menjadi lambat. Penghambatan laju pertumbuhan disebabkan adanya sisa eksplan yang tidak menjadi kalus dan juga berkurangnya zat makanan. Untuk mengatasi hal tersebut maka dilakukan subkultur dilakukan setelah empat minggu setelah tanam. Setelah dilakukan subkultur laju pertumbuhan lebih cepat dan pencoklatan mulai berkurang sehingga warnanya menjadi lebih cerah.

Kurva tumbuh kalus dan kandungan ajmalisin

Pertumbuhan kultur kalus *C. roseus* medium Zenk dengan penambahan $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-5} M BAP setelah disubkultur tiga kali mengikuti pola kurva sigmoid. Pertumbuhan kalus dibagi menjadi 3 fase yaitu fase pertumbuhan lambat (fase adaptasi), fase pertumbuhan cepat, dan fase pertumbuhan stasioner. Kultur kalus *C. roseus* mengalami fase adaptasi terjadi hanya sebentar yaitu dari hari 0 hingga hari ke-2, fase pertumbuhan cepat mulai hari ke-4 hingga hari ke-16, sedangkan fase pertumbuhan stasioner hari ke-16 hingga hari ke-20. Kurva kandungan ajmalisin menunjukkan peningkatan hingga hari ke-12, dan setelah itu terjadi penurunan kandungan ajmalisin (Gambar 2).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan ragi *S. cerevisiae*



Gambar 2. Kurva pertumbuhan kalus dan kandungan ajmalisin *C.roseus*

Tabel 1. Pengaruh pemberian elisitor *S. cerevisiae* terhadap kandungan ajmalisin µg/g BK pada kultur kalus *C. roseus*

Kons. Elisitor % (g/v)	Kandungan Ajmalisin Pada Pemanenan Jam ke			
	0	18	36	72
0,0 (Kontrol)	167,735±7,354 b	173,107±3,621 be	179,217± 1,734 c	168,479±1,576 b
0,5	166,032±5,220 b	261,493±2,460 g	303,475±5,602 h	211,619±5,887 e
1,0	166,942±2,121 b	201,908±2,056 de	245,447±5,694 f	160,132±6,491 ab
2,5	165,505±2,792 b	195,548±6,527 d	203,711±1,646 de	152,786±3,615 a

Ket :

- Nilai diatas adalah rata-rata kandungan ajmalisin (µg/g BK) ± simpangan baku
- Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf kepercayaan 95%

Pada hari ke-0 hingga hari ke-2 pertumbuhan sel sangat lambat namun kandungan ajmalisinnya sudah cukup tinggi. Setelah hari ke-2 pertumbuhan kalus relatif lebih cepat, seiring dengan peningkatan kandungan ajmalisin. Kandungan ajmalisin tertinggi dicapai pada hari ke-12 sebesar 271,901 ± 4,991(µg/g BK). Mulai hari ke-12 hingga hari ke-20 terjadi penurunan kandungan ajmalisin dan pada saat ini laju pertumbuhan kalus juga kembali lambat dan kemudian memasuki fase stasioner.

Pengaruh pemberian elisitor terhadap kandungan ajmalisin

Berdasarkan kurva pertumbuhan kalus dan kurva kandungan ajmalisin maka elisitasi dilakukan pada hari ke-8 yaitu pada saat kalus memasuki fase pertumbuhan cepat. Pada fase pertumbuhan cepat

diduga sel-sel berada pada kondisi optimum sehingga bila terjadi gangguan sel akan berespon dengan cepat. Kalus yang dielisitasi dengan serbuk *S. cerevisiae* warnanya lebih gelap (lebih coklat) dibandingkan dengan kalus control (tidak dielisitasi) dan juga mengalami penurunan berat kering.

Pemberian elisitor serbuk *S. cerevisiae* mempengaruhi kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus*. Kandungan ajmalisin tertinggi diperoleh dengan pemberian elisitor pada konsentrasi 0,5% (g/v) dengan waktu pemanenan 36 jam yaitu sebesar 303,475±5,602 µg/gBK(tabel 1). Daritabeltersebut dapat dilihat bahwa pemberian elisitor pada konsentrasi tertentu dapat meningkatkan kandungan ajmalisin tetapi pada konsentrasi lain tidak. Hal ini berarti bahwa kandungan ajmalisin sangat dipengaruhi

oleh konsentrasi elisitor. Selain ditentukan oleh konsentrasi elisitor kandungan ajmalisin juga ditentukan oleh waktu pemanenan. Kandungan ajmalisin cenderung meningkat hingga waktu pemanenan 36 jam, tetapi pada waktu pemanenan yang lebih lama (72) jam kandungan ajmalisin mengalami penurunan kembali.

Berdasarkan uji DMRT pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa kandungan ajmalisin kontrol (0%) tidak berbeda nyata dengan perlakuan (0,5; 1,0; 2,5%) pada saat pemanenan 0 jam (Tabel 1). Hal yang berbeda terjadi pada saat pemanenan 18, 36 dan 72 jam, kandungan ajmalisin kalus kontrol berbeda nyata dengan kandungan ajmalisin perlakuan. Kandungan ajmalisin tertinggi terdapat pada waktu pemanenan 36 jam sebesar $303,475 \pm 5,602 \mu\text{g/g BK}$ (h) terdapat pada konsentrasi elisitor 0,5% dan kandungan ajmalisin kontrol pada kontrol sebesar $179,217 \pm 1,734 \mu\text{g/g BK}$ (c). Pada waktu pemanenan yang lebih lama (72 jam) kandungan ajmalisin kembali mengalami penurunan naik pada control maupun perlakuan.

PEMBAHASAN

Induksi kalus

Untuk induksi kalus digunakan medium Zenk dengan penambahan $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^5 M BAP. Potongan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium Zenk mulai membentuk kalus sejak hari ke-7. Hal yang hampir sama juga ditunjukkan Pandiangan (2006) bahwa setelah 7 (tujuh) hari setelah tanam eksplan membesar dan terbentuk kalus pada jaringan yang mengalami luka. Inisiasi kalus dimulai pada jaringan yang mengalami luka, hal tersebut berhubungan dengan sejumlah faktor yang antara lain adalah respon sel tumbuhan terhadap pelukaan, tersedianya oksigen yang lebih besar dan nutrien yang cukup (Yeoman dan Aitchison, 1973).

Pada awal inisiasi, kalus yang terbentuk adalah kalus kompak berwarna putih kemudian berubah menjadi berwarna coklat. Zao *et al.* (2001) menyatakan bahwa struktur kalus *C. roseus* berhubungan dengan kemampuannya mensintesis indol alkaloid. Kalus kompak *C. roseus* menghasilkan indol alkaloid lebih tinggi sebesar 1,9 - 2,4 kali dibandingkan dengan kalus meremah (Zao *et al.*, 2001). Hal yang sama ditunjukkan

oleh Morris (1986), yaitu bahwa kultur kalus *C. roseus* yang dipelihara pada medium Zenk akan membentuk kalus kompak, berwarna coklat dengan kandungan ajmalisin yang tinggi. Hal tersebut disebabkan kultur kalus kompak pith, xylem dan phloem berkembang dengan baik (Pieron *et al.*, 1998).

Kurva tumbuh kalus dan kandungan ajmalisin

Pada hari ke-0 hingga hari ke-2 pertumbuhan sel sangat lambat namun kandungan ajmalisinnya sudah cukup tinggi. Tingginya kandungan ajmalisin pada kalus saat fase tersebut selain karena kandungan adanya ajmalisin yang diperoleh dari kalus sebelum subkultur sebelumnya, dan adanya cekaman. Rudge *et al.* (1986) menyatakan bahwa pada kultur kalus *C. roseus* cekaman osmotik mengakibatkan penghambatan pembelahan sel dan mengakibatkan peningkatan produksi alkaloid, karena cekaman merupakan suatu efektor untuk meningkatkan produksi alkaloid. Setelah hari ke-2 pertumbuhan kalus relatif lebih cepat, seiring dengan peningkatan kandungan ajmalisin. Terjadinya penurunan kandungan ajmalisin setelah hari ke-12 diduga karena terjadinya perubahan ajmalisin menjadi serpentin. Verpoorte *et al.* (1991) menyatakan ajmalisin dan serpentin dapat berubah satu ke bentuk lainnya melalui reaksi oksidasi dan reduksi. Oksidasi mengakibatkan kandungan oksigen di dalam medium makin berkurang. Senoussi *et al.* (2007) menyatakan bahwa pada kultur sel *C. roseus* kurangnya oksigen mengakibatkan penghambatan akumulasi senyawa indol alkaloid hal tersebut disebabkan berkurangnya enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis ajmalisin. Dos Santos *et al.* (1994) menyatakan bahwa pada fase stasioner kandungan ajmalisin menjadi lebih rendah dan terjadi akumulasi serpentin, hal tersebut disebabkan adanya penangkapan (*trapped*) ajmalisin kedalam vakuola, diubah menjadi serpentin oleh enzim peroksidase.

Pengaruh pemberian elisitor terhadap kandungan ajmalisin

Elisitasi serbuk *S. cerevisiae* mengakibatkan pencoklatan dan penurunan berat kering kultur kalus *C. roseus*. Pencoklatan dan penurunan berat kering disebabkan adanya peningkatan senyawa fenolik dan metabolit sekunder lain, yang mengakibatkan

penghambatan pertumbuhan. Senyawa fenolik yang dihasilkan oleh kultur *C. roseus* adalah asam 2,3 dihidroksibenzoat. Penurunan berat kering disebabkan adanya penghambatan aktivitas enzim IPP (isopentenildipospat) isomerase (Moreno *et al.*, 1994). Penghambatan aktivitas enzim IPP isomerase mengakibatkan penghambatan akumulasi senyawa squalen, yang merupakan prekursor untuk biosintesis triterpen dan fitosterol. Senyawa-senyawa tersebut dibutuhkan untuk multiplikasi (perbanyak) sel (Moreno *et al.*, 1994).

Konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan mempengaruhi peningkatan kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus*. Konsentrasi elisitor 0,5% g/v meningkatkan kandungan ajmalisin lebih tinggi dibandingkan dengan 1,0 dan 2,5% g/v. Hal tersebut diduga bahwa sel mempunyai jumlah reseptor untuk *S. cerevisiae* yang terbatas pada sel. Moreno *et al.* (1994) menyatakan bahwa konsentrasi ajmalisin dapat tinggi jika konsentrasi elisitor tidak terlalu tinggi dan akan menurun pada saat konsentrasi elisitor tinggi. Konsentrasi elisitor yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan nekrosis yang kemungkinan mengakibatkan kerusakan atau kematian sel (Funk *et al.*, 1986 dan Wiendi *et al.*, 1992).

Peningkatan kandungan ajmalisin pada kalus yang dielisitasi diduga karena elisitor yang diberikan menginduksi aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis ajmalisin. Endress (1994) menyatakan bahwa pada kultur sel *C. roseus* yang dielisitasi dengan *Pythium aphanidermatum* terjadi peningkatan transkripsi mRNA untuk sintesis SS (strikosidin sintase) dan TDC (triptofan dekarboksilase). Enzim tersebut merupakan enzim kunci dalam biosintesis ajmalisin.

Kandungan ajmalisin tertinggi diperoleh pada waktu pemanenan 36 jam, tetapi pada waktu pemanenan 72 jam kandungan ajmalisin mengalami penurunan kembali. Hal tersebut diduga diakibatkan penurunan aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis ajmalisin, baik pada kultur secara keseluruhan maupun aktivitas enzim "post binding". Peltonen *et al.* (1997) menunjukkan bahwa aktivitas enzim PAL (fenilalanil ammonia liase) pada kultur suspensi sel *Hordeum vulgare* mencapai maksimum setelah 4 jam pemberian

elisitor ekstrak ragi, dan aktivitas enzim PAL menurun kembali 24 jam setelah pemberian elisitor.

Dari hasil pembahasan di atas dapat dikatakan bahwa konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan hasil elisitasi sangat berpengaruh terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus*.

KESIMPULANDANSARAN

Konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan sangat mempengaruhi kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus*.

Konsentrasi elisitor 0,5 % (g/v) merupakan konsentrasi elisitor terbaik, dengan waktu pemanenan optimum 36 jam menghasilkan kandungan ajmalisin sebesar 303,475±5,602 ng/g BK.

SARAN

Peningkatan kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus* selain dipengaruhi oleh elisitor juga dipengaruhi oleh waktu pemanenan. Untuk mengetahui kondisi yang optimum dan kandungan ajmalisin yang lebih tinggi disarankan untuk penelitian lebih lanjut tentang zat pengatur tumbuh, media, sumber karbon dan lain-lain yang mempengaruhi kandungan ajmalisin kultur kalus *C. roseus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. R. Verpoorte, Divisi Farmakognosi, Universitas Leiden, Belanda yang memberikan senyawa ajmalisin standar.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandrova R, I Alexandrova, M Velcheva and T Varadinova. 2000. Phytoproduct and Cancer. *Exp. Pathol. Parasitol.* 4, 15-26.
- Aprianita. 1999. Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Terhadap kandungan Ajmalisin dalam Kultur Kalus Berakar *C. roseus* (L) G. Don. *Tesis Magister.* Jurusan Biologi. Institut Teknologi Bandung.
- Asada M and ML Shuler. 1989. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharantus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitor and alginate immobilization. *Applied of Microbiology Biotechnology* 30, 475-481.
- Buiteelaar RM, MT Cesario and J Trampller. 1991. Elicitation of thiopene production by root *Tagetes patula*. In: RM Buiteelaar (Ed.) *Production and Secretion of Secondary Metabolites by Plant Cell Cultures of Tagetes*, 119-133. Wageningen.

- Dos Santos RI, J Schripsema and R Verpoorte. 1994.** Ajmalicine metabolism in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Phytochemistry* **15(3)**, 667-681.
- Eilert U, F Constabel and WGW Kurz. 1986.** Elicitor stimulation of monoterpene indol alkaloid formation in suspensi cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology* **126**, 11-22.
- Endress R. 1994.** *Plant Cell Biotechnology*, 121-142. Spiringer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hongkong Barcelona Budapest.
- Fitriani A. 1998.** Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Terhadap Kandungan Ajmalisin Dalam Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Tesis Pasca-Sarjana*. ITB. Bandung.
- Funk C, K Gugler and P Brodelius. 1986.** Increased secondary product formation in plant suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry* **26(2)**, 401-405.
- Mantell SH, and H Smith. 1983.** Culture Factor That Influence Secondary Metabolite Accumulation in Plant Cell and Tissue. In: SH Mantell and H Smith (Eds). *Plant Biotechnology*, 75-108. Cambridge University Press. New York.
- Moreno PRH, R van der Heijden and R Verpoorte. 1994.** *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Cell suspension cultures: a literature survey, updating from 1988-1993. *Plant Cell Report* **12**, 702-705.
- Morris P. 1986.** Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. III. Alkaloid metabolism in cultured leaf tissue and primary callus. *Planta Medica* **12**, 123-132.
- Pandiangan D. 2006.** Respon pertumbuhan kalus *Catharanthus roseus* yang diberi perlakuan triptofan. *biotika* **5(2)**, 48-56.
- Pieron S, P Boxus and D Dekegel. 1998.** Hystological sudy of nodule morphogenesis from *Cinchorium intybus* L. leaves cultivated in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **34**, 87-93.
- Peltonen S, L Mannonen and R Karjalainen. 1997.** Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures. *Plant Cell and Organ Culture* **50**, 185-193.
- Rudge K and P Morris. 1986.** The effect of stress osmotic on growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. In: *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*, 85-191. P Morris, AH Scragg, A Stanford and MW Fower. Cambridge University Press.
- Senoussi MM, J Crèche and M Rideau. 2007.** Relation between hypoxia and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension *Journal of Applied Sciences Research* **3(4)**, 287-290.
- Sim SJ, HN Chang and JR Liu. 1994.** Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: effects of in situ adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **78(3)**, 229-234.
- Suvarnalatha G, L Rajendran, GA Ravishankar and LV Venkataraman. 1994.** Elicitation of anthocyanin production in cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) by using elicitor an abiotik stress. *Biotechnology Letters* **16(12)**, 1275-1280.
- Verpoorte R, R Van der Heijden, WM Van Gulik and HJG Ten Hoopen. 1991.** *Plant Biotechnology for Production of Alkaloid: Present Status and Prospects*. **40**, 109-153. Academic Press. Inc. New York.
- Wiendi NMA, GA Wattimena dan LW Gunawan. 1992.** Produksi Metabolit Sekunder dengan Kultur Jaringan. Dalam: *Bioteknologi Tanaman*. GA Wattimena (Ed.), 168-219. Depdikbud. Direktorat Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Yeoman MM and PA Aitchinson. 1973.** Growth Pattern in Tissue (Callus). In: *Plant Tissue and Cell Culture*, 240-268. Blackwell Sci. Publ. Oxford.
- Zbao J, W Zhu, Q Hu, and Y Guo. 2001.** Compact callus cluster suspension cultures of *Catharanthus roseus* with enhanced indole alkoaloid biosynthesis *J. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* **37(1)**, 68-72.