

ISSN 1410 4695

JDP

JURNAL
DINAMIKA
PENDIDIKAN

Diterbitkan oleh:

Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Kristen Indonesia

 JDP JURNAL DINAMIKA PENDIDIKAN	Volume 6	Nomor 1	Hal. 1-46	Jakarta April 2013	ISSN 1410 4695
--	----------	---------	-----------	-----------------------	-------------------

PENINGKATAN KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER TUMBUHAN MELALUI PENAMBAHAN PREKUSOR PADA MEDIA KULTUR IN VITRO

Marina Silalahi

E-mail: marina_biouki@yahoo.com

ABSTRACT

Secondary metabolites produced plants used by humans for medicine. Utilization of medicinal plants is related to the content of secondary metabolites owned plants. In the intact plant contains very low levels of secondary metabolites and its formation is often associated with the stage of plant development. In vitro culture is an alternative considered efficient for producing secondary metabolites. One technique used to increase product secondary metabolites in vitro culture is the provision of precursors. Precursors are compounds that are at the beginning or in the middle of a secondary product biosynthetic pathways can affect the final product. The addition of precursors in vitro culture will induce the enzymes involved in secondary metabolism. Increased enzyme will increase the content of secondary metabolites.

Keywords: precursor, in vitro, secondary metabolites

PENDAHULUAN

Metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan telah lama manusia digunakan sebagai sebagai obat, pewarna, insektisida (Karuppusamy 2009). Salah satu fungsi metabolit sekunder yang menonjol bagi manusia adalah pemanfaatan sebagai obat. Badan kesehatan dunia memperkirakan sekitar 60-80% penduduk dunia masih mengantungkan kesehatannya yang berasal dari tumbuhan (Joy dkk. 1998; Fabricant and Farnsworth 2001; Tripathi and Tripathi 2003), dan 25% obat modern yang beredar diekstraksi langsung dari tumbuhan.

Berbagai tumbuhan yang digunakan sebagai obat adalah pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), pegagan (*Centella asiatica* L.Urban), kumis kucing (*Otrhosiphon stamineus* Benth), kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) (Achmad dkk 2009). Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat sejalan dengan perkembangan peradaban manusia. Pada awalnya manusia menggunakan tumbuhan dalam bentuk utuh (segar, simplisia) hingga senyawa yang telah dimurnikan.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat berhubungan dengan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan. Metabolit

sekunder adalah produk yang dihasilkan dari proses metabolisme sekunder. Fiehn (2002) menyatakan bahwa tumbuhan menghasilkan 200.000 lebih metabolit sekunder. Beberapa metabolit sekunder yang digunakan sebagai obat antara lain kodein, ephederin, ajmalisin, morfin, ppaperin, kuinin, reserpin, galantamin, scopolamine, berberine, kaffein, kapsiin, Kolkhisin, yombin, pilocarpin, glikosida jantung (Wink dkk., 2005). Hingga saat ini berbagai senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan memiliki struktur yang sangat kompleks dan tidak bisa dibuat senyawa sintetisnya.

Tumbuhan menghasilkan berbagai jenis metabolit sekunder, namun kadarnya sangat rendah dan pembentukannya sering berhubungan dengan tahap perkembangan tumbuhan. Metabolit sekunder tumbuhan dapat diperoleh dengan menekstrak tumbuhan utuh. Ekstraksi metabolit sekunder dari tumbuhan utuh, sering menghadapi kendala disebabkan keterbatasan jumlah pasokan serta besanya biaya yang dibutuhkan untuk purifikasi.

Kultur in vitro merupakan alternatif yang dianggap efisien untuk memproduksi metabolit sekunder. Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain (a) dengan teknologi kultur jaringan dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi

terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat (b) kultur bebas dari kontaminasi mikroba (c) setiap sel dapat dihasilkan untuk memper banyak senyawa metabolit sekunder tertentu (4) pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional) kultur jaringan tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim, dan musim (Isda & Sulianyah 2009).

Kebutuhan senyawa obat semakin tinggi sementara lahan dan plasma nutfah semakin menyusut, oleh karena itu diperlukan alternatif pemecahan. Teknik kultur jaringan tumbuhan dapat digunakan untuk mengatasi masalah tersebut. Melalui teknik ini, metabolit sekunder yang dihasilkan dalam jaringan tanaman utuh dapat dihasilkan juga dalam sel-sel yang dipelihara pada medium buatan secara aseptic.

Problem utama dalam produksi metabolit sekunder melalui teknik *in vitro*, konsentrasi produk yang menjadi target masih kecil. Salah satu teknik yang digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder pada kultur *in vitro* adalah dengan pemberian prekusor (Pandangan 2010). Prekusor adalah senyawa yang berada pada posisi awal atau ditengah-tengah jalur biosintesis produk sekunder sehingga dapat mempengaruhi produk akhir.

METODE

Naskah ini ditulis berdasarkan studi literatur dari berbagai naskah ilmiah.

METABOLIT SEKUNDER TUMBUHAN

Metabolit yang dimiliki tumbuhan dibedakan menjadi metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer adalah produk yang dihasilkan dari proses metabolisme primer seperti karbohidrat, protein, lemak dan asam nukleat. Metabolit sekunder merupakan hasil dari proses metabolisme sekunder. Metabolit sekunder pada tumbuhan kadarnya relatif sedikit dibandingkan dengan metabolit primer namun jenisnya sangat banyak. Fiehn (2002) menyatakan bahwa tumbuhan menghasilkan 200.000 lebih metabolit sekunder.

Pada tumbuhan senyawa metabolit sekunder berfungsi sebagai fitohormon, pigmen fotosintesis, pigmen aksesoris, alelopati, adaptasi, penarik polinator, serta pertahanan dari herbivore, mikroorganisme dan juga untuk pertumbuhan dan perkembangan (Manitto

1992; Hopkins, 1999). Metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan digunakan manusia sebagai pewarna, kosmetik, insektisida, penyedap rasa dan juga sebagai obat.

Salah satu pengelompokan metabolit sekunder tumbuhan dikelompokkan yang banyak digunakan adalah berdasarkan struktur kimia dan aktivitas fisiologi (Wiryowidagdo 2000). Berdasarkan struktur kimia metabolit sekunder dikelompokkan menjadi (1) senyawa fenol yang di dalamnya termasuk fenilpropaniol dan flavonoid; (2) senyawa yang mengandung nitrogen yang didalamnya termasuk alkaloid; (3) terpen dan terpenoid (Taiz & Zeinger 2003). Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat mengelompokkan tumbuhan metabolit sekunder berdasarkan aktivitas fisiologi dan efek terapeutik.

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan bervariasi dalam jenis dan kuantitasnya. Jenis metabolit sekunder yang dihasilkan sering berassosiasi dengan tingkat pertumbuhan. Sebagai contoh anthosianin dihasilkan saat fase pembungaan, dan klorofil dihasilkan pada daun. Jenis metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan juga bervariasi antara satu organ dengan organ tumbuhan lainnya. *Catharanthus roseus L.*(G.) Don mengakumulasi ajmalisin pada organ akar sedangkan katharantin dan vinblastin ditemukan dibagian daun (Verpoorte & Van der Heiden 1991), triterpenoid (asiatikosida, madekasid, asam asitik) ditemukan pada bagian daun *C. asiatica* (Zainol dkk,2008).

Perbedaan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan sangat dipengaruhi oleh lingkungan dan genetik (Das dan Mallik 1991). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *C. asiatica* memiliki variasi kandungan metabolit sekunder. Bermawie (2007) menyatakan bahwa perbedaan keragaman sifat morfologi seperti warna, ukuran,bentuk stolon dan daun mempengaruhi kandungan asiatikosida. Hal yang lain ditemukan oleh Tiwari dkk(2000) bahwa kandungan triterpenoid yang tinggi dapat diperoleh pada *C.asiatica* yang mendapat cahaya penuh.

Produksi alkaloid dari berbagai kultur sel dan kultur organ dari spesies *Cinchona* secara jelas menunjukkan bahwa diferensiasi paralel dengan produksi alkaloid (Sakya, 1995). Pembentukan metabolit sekunder akan lebih ban-

yak pada saat kalus berdiferensiasi menjadi tunas maupun akar (Staba, 1980). Keberhasilan pembentukan metabolit sekunder melalui kultur in vitro sangat tergantung pada faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan metabolit tersebut pada tanaman utuh.

KULTUR IN VITRO

Kultur in vitro merupakan teknik penanaman sel, jaringan, dan organ yang telah dipisahkan dari lingkungan alaminya dan ditumbuhkan pada medium buatan yang sesuai dalam kondisi steril (Staba, 1980; Dodds & Roberts, 1982). Kultur in vitro meliputi kultur kalus, suspensi sel, aggregat sel, kultur akar, meristem, akar adventif dan kultur organ (Jedinak dkk, 2004). Salah satu tujuan dilakukan kultur in vitro adalah produksi metabolit sekunder terutama senyawa yang berkhasiat obat.

Kultur in vitro mulai diperkenalkan pada akhir tahun 1960 sebagai alat untuk mempelajari produksi metabolit sekunder tumbuhan (Mulabagal & Tsay, 2004). Pemanfaatan kultur in vitro didasarkan oleh teori totipotensi sel yang menyatakan bahwa setiap sel membawa informasi genetik yang sama dengan genetik induknya. Hal ini berimplikasi bahwa tumbuhan yang dikultur secara in vitro akan menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan induknya (Jedinak dkk, 2004).

Penerapan kultur in vitro untuk menghasilkan metabolit sekunder mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggunaan konvensional. Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain (a) dengan teknologi kultur jaringan dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat (b) kultur bebas dari kontaminasi mikroba (c) setiap sel dapat dihasilkan untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tertentu (4) pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional kultur jaringan tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim, dan musim (Isda & Sulianyah, 2009).

Berbagai penelitian telah menggunakan kultur in vitro untuk menghasilkan metabolit sekunder baik berskala kecil maupun besar (Wardani dkk, 2004; Aryati dkk, 2005; Kiong 2005; Pandiangan, 2010). Usaha untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder melalui

pembentukan pada berbagai tumbuhan telah banyak dilakukan, antara lain senyawa glutropaeolin dari *Tropaeolum majus* (Wielanek & Urbanek, 1999), senyawa solasodine dari *Solanum aviculare* Forst (Kittipongpatana dkk., 1998) dan *Solanum nigrum* L. (Subroto dkk, 1998), senyawa ajmalisin (Yuyun dkk., 2001 & Silalahi, 2010) dan katarantin dari *C. roseus* (Pandiangan, 2010).

Keberhasilan kultur in vitro untuk menghasilkan metabolit sekunder dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain, jenis media dan zat pengatur tumbuh. Medium yang umum digunakan pada penelitian kultur in vitro adalah medium MS (Murashige-Skoog) dan B5. Medium MS digunakan secara luas untuk tujuan mikropropagasi baik morfogenesis langsung (Raghu dkk., 2007), maupun morfogenesis tidak langsung (Aziz dkk., 2006), dan produksi metabolit sekunder (Kiong dkk., 2005). Pemilihan medium yang digunakan dalam kultur in vitro yang tepat dapat menentukan keberhasilan pertumbuhan dan perkembangan suatu kultur. Pada *C. roseus* kultur yang dipelihara pada medium B5 menghasilkan ajmalisin yang lebih tinggi dibandingkan dengan medium MS.

Pertumbuhan dan perkembangan kultur juga dipengaruhi oleh penambahan zat pengatur tumbuh. Auksin dan sitokinin merupakan dua macam zat pengatur tumbuh yang digunakan secara luas untuk kultur. Syahid dan Hernani (2001) menyatakan bahwa pada kultur kalus *O. Aristatus* pada penambahan 2,4-D (2,4-diclorofenoksi acetate acid) mengakibatkan kalus meremah dengan kandungan sinestesin yang rendah sedangkan pada penambahan 2,4-D dan BAP (benzyl amino purine) secara bersamaan akan membentuk kalus relatif lebih kompak dengan kandungan sinestesin yang lebih tinggi. Zao dkk., (2001) menyatakan bahwa struktur kalus *C. roseus* berhubungan dengan kemampuannya mensintesis indol alkaloid. Kalus kompak *C. roseus* menghasilkan indole alkaloid lebih tinggi sebesar 1,9 - 2,4 kali dibandingkan dengan kalus meremah (Zhao dkk., 2001). Hal yang sama ditunjukkan oleh Silalahi (2010), yaitu bahwa kultur kalus *C. roseus* yang dipelihara pada medium Zenk akan membentuk kalus kompak, berwarna coklat dengan kandungan ajmalisin yang tinggi.

Pemanfaatan kultur in vitro untuk mem-

produksi metabolit sekunder telah berkembang dengan pesat, namun demikian kultur invitro memiliki beberapa kelemahan diantaranya kandungan metabolit sekunder yang diinginkan rendah. Hanstein (1985) menyatakan untuk memproduksi metabolit sekunder melalui teknik invitro diperlukan langkah-langkah sebagai berikut: (1) pemilihan tanaman yang memiliki produksi metabolit sekunder yang tinggi; (2) pembuatan kultur in vitro dari sel tanaman terpilih; (3) pengembangan medium pertumbuhan optimum; (4) pengembangan metode untuk menginduksi pembentukan metabolit yang diinginkan dan (5) pengembangan medium produksi yang optimum.

Endress (1994) menyatakan bahwa pola pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder dikelompokkan menjadi ;(1) pembentukan metabolit sekunder terjadi pada akhir fase lag, misalnya produksi antrakuinon pada kultur suspensi sel Morinda; (2) pembentukan metabolit sekunder terjadi pada fase akselerasi, misalnya produksi asam sinamat pada kultur Daucus; (3) pembentukan metabolit sekunder sejalan dengan pertumbuhan sel, misalnya produksi nikotin pada kultur suspensi sel Nicotiana tabacum; (4) produksi metabolit sekunder pada fase stationer misalnya produksi sikonin pada kultur sel *Lithospermum erythrorhizon*.

PREKUSOR

Produksi metabolit sekunder dapat digunakan dengan menggunakan kultur kalus, kultur suspensi sel, kultur aggregat maupun kultur organ. Hingga saat ini salah satu kendala yang dihadapi untuk memproduksi metabolit sekunder melalui kultur in vitro kadar yang dihasilkan masih rendah. Beberapa penelitian juga memperlihatkan kultur in vitro kehilangan kemampuannya untuk menghasilkan metabolit yang diinginkan setelah mengalami beberapa kali pemindahan media. Endress (1994) mengemukakan bahwa dalam kultur in vitro aktivitas biosintesis metabolit sekunder bervariasi berhubungan dengan pertumbuhan sel. Berbagai metode telah diterapkan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada kultur in vitro diantaranya melalui elisitasi dan penambahan prekusor (Kiong dkk., 2005). Elisitasi adalah penambahan elisitor ke dalam kultur in vitro. Konsep elisitasi berkembang dari adanya fenomena alam bahwa

infeksi patogen pada tumbuhan akan menginduksi pembentukan metabolit sekunder karena danya cekaman (Hanstein 1985). Penambahan elisitor pada mediu tumbuh kultur in vitro tumbuhan ternyata cukup efektif untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder (Yuyun dkk 2001; Silalahi 2010 & Pandiangan 2011), namun elisitasi tersebut mengakibatkan penurunan pertumbuhan dan mengakibatkan kematian sel.

Kandungan metabolit sekunder melalui teknik in vitro dapat ditingkatkan dengan cara optimasi media baik internal maupun eksternal (Zhao dkk., 2001), dengan menggunakan prekursor (Sulistiyanti 1997; Kim dkk., 2004; Kiong dkk. 2005; Kim dkk., 2007). Keberhasilan penambahan prekusor terhadap media kultur ditentukan pengetahuan jalur metabolisme senyawa metabolit yang diinginkan (Karuppusamy, 2009).

Reaksi kimia yang terjadi pada yang metabolisme sekunder ditentukan oleh ketersediaan prekusor (Karuppusamy, 2009). Fowler & Warren (1992) melaporkan bahwa enzim-enzim yang terlibat dalam proses metabolisme sekunder menjadi tidak maksimum aktivitasnya dikarenakan konsentrasi prekusor sangat sedikit. Prekusor adalah senyawa yang berada pada posisi awal atau ditengah-tengah jalur biosintesis produk sekunder sehingga dapat mempengaruhi produk akhir (Endress, 1994).

Penelitian penggunaan prekusor untuk meningkatkan metabolit sekunder mulai berkembang pada tahun 1970-an. Berbagai jenis prekusor yang digunakan triftopan dan triptamin (Doller dkk., 1978); asam amino (Miwawa 1994); metionin (Rumondor dkk, 2013), triftofan (Aryati 2005 & Pandiangan 2010); triptopan, tryptamin, loganin dan secologinan (Whitmer dkk., 2002). Penambahan berbagai prekusor ke dalam kultur media terbukti mampu meingkatkan kandungan metabolit sekunder.

Jenis prekusor yang digunakan akan mempengaruhi kadar metabolit sekunder. Metabolisme sekunder dalam tanaman juga sangat dipengaruhi oleh perubahan ekspresi dari gen-gen pengatur (Edwards dan Gatehouse, 1999). Whitmer dkk. (2002) menyatakan bahwa akumulasi terpenoid indol alkaloid (TIA) pada kultur sel *C. roseus* lebih tinggi pada saat pemberian loganin dibandingkan dengan secologinan,

sedangkan pemberian triptamin dan triptofan tidak mempengaruhi kandungan TIA.

Penambahan prekusor pada kultur invitro akan menginduksi enzim-enzim yang terlibat dalam proses metabolisme sekunder. Sebagai contoh peningkatan kandungan TIA pada kulur suspensi sel *C. roseus* berhubungan dengan peningkatan kadar enzim triptofan dekarboksi-lase (Whitmer dkk, 2002). Distribusi dari transkripsi mRNA , enzim dan prekusor biosintesis merupakan komponen yang sangat penting dalam regulasi proses metabolit sekunder tumbuhan. Penambahan prekursor pada media kultur meskipun dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder, tapi dapat pula mengakibatkan pertumbuhan selnya rendah (Pandangan, 2010). Penambahan asam amino pada kultur suspensi sel *C. asiatica* akan meningkatkan kandungan asitikosida (Kiong dkk, 2005).

KESIMPULAN

1. Metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan digunakan manusia sebagai pewarna, kosmetik, insektisida, penyedap rasa dan obat.
2. Berdasarkan struktur kimia metabolit sekunder dikelompokkan menjadi (1) senyawa fenol yang di dalamnya termasuk fenilpropaniol dan flavonoid; (2) senyawa yang mengandung nitrogen yang didalamnya termasuk alkaloid; (3) terpen dan terpenoid.
3. Kultur in vitro meliputi kultur kalus, suspensi sel, aggregat sel, kultur akar, meristem, akar adventif dan kultur organ.
4. Prekusor adalah senyawa yang berada pada posisi awal atau ditengah-tengah jalur biosintesis produk sekunder sehingga dapat mempengaruhi produk akhir. Berbagai jenis prekusor yang digunakan triptopan dan triptamin, asam amino, metionin, triptofan, triptopan, tryptamin, loganin dan secologanin.

ACUAN PUSTAKA

- Achmad, S. A., dkk. (2009). Ilmu kimia dan kegunaan tumbuh-tumbuhan obat Indonesia Jilid I. Institut Teknologi Bandung, bandung viii + 353 hlm.
Aryati, H., Anggarwulan, E. & Solichatun.

- (2005). Pengaruh penambahan DL-triptofan terhadap pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid-reserpin pule pandak [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz.] secara In Vitro. Biofarmasi 3 (2): 52-56.
Aziz, Z.A., Davey, M.R., Lowe, K.C & Power, J.B. (2006). Isolation and culture of protoplasts from the medicinal plant *Centella asiatica*. Revista Brasileira Plant Medicina 8: 2006.
Bermawie, N. & Kristina, N.N. (2003). Penyimpanan in vitro tanaman obat potensial perkembangan. Teknologi tropika. 15(1): 1-10.
Das, A . & Mallick, R. (1991). Correlation between genomic diversity and asiaticoside content in *Centella asiatica* (L.) Urban. Botanical Bulletin Academia Sinica 32: 1-8.
Doller, G., Alfermann, A.W., & Reinhard, E. (1976). Produktion von Indolalkaloiden in callus-kulturen von *Catharanthus roseus*. Plant Cell Rep. 12: 702-705.
Dodds, J.H. & L.W. Roberts. 1982. Experiment in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge:xiii + 178 hlm.
Edwards, R. & Gatehouse, J.A. (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.
Endress, R. (1994). Plant cell biotechnology. Springer-Verlag. Berlin p: 173-225
Ersam, T. (2004). Keunggulan biodiversitas tanaman tropika Indonesia dalam merekayasa model molekul alami. Seminar Nasional Kimia VI:1-16.
Fabricant, D.S. & Farnsworth, N.R. (2001). The value of plant used medicine for drug discovery. Environmental Health Perspective. 109(1): 69-75.
Fiehn, O. 2002. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48: 151-171.
Fowler, M.W. & Warren. G.S. (1992). Plant biotechnology: Comprehensive biotechnology, second supplement. Pergamon Press plc. England.
Heinstein, P.F. (1985). Future approach to the formation of secondary natural products in cell suspension cultures. Journal Natural product 48:1-8
Hopkins, W.G. 1999. Introduction to plant

- physiology. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xv + 512 hlm
- Jedinák A., J. Faragó, I. Pšenáková & Tibor Maliar. 2004. Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures Biologia. Bratislava.59(6): 697-710
- Karppinen, K., et al. (2007). Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. Phytochem. 68: 1038-1045.
- Karuppusamy. S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures Journal of Medicinal Plants Research. 3(13) : 1222-1239.
- Kiong, A.L., et al. (2005). Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. Pak. J. Biol. Sci. 8 : 1160-1169.
- Kittipongpatana, N., Hock, R.S. & Porter, J.R. (1998). Production solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 133-143.
- Joy, P. P., Thomas, J., Mathew, S. & Skaria, B.P. (1998). Medicinal plants. Kerala: Kerala Agricultural University. 210 hlm.
- Isda, M.N. & Sulianyah, I. (2009). Induksi kalus *Centella asiatica* melalui aplikasi auksin dan sitokinin. Jerami 2(3) :162-165.
- Manitto, P. (1992). Biosintesis produk alami. Terj. dari Biosynthesis of natural product oleh Koensoemardiyyah. IKIP Semarang Press, Semarang: vi + 597 hlm.
- Misawa, M. (1994). Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites of useful metabolices. Bio International Inc. Canada.
- Mulabagal, V. and Tsay, H.S. (2004). Plant cell cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering. 2(1): 29-48
- Pandiangan. D. Pengaruh pemberian prekursor triptofan terhadap pertumbuhan dan kandungan katarantin kultur aggregat sel tapak dara (*Catharanthus L. G. Don.* dalam erlemeyar dan bioreaktor airlift. [Disertasi] Program Pasca Sarjana Universitas Padjajaran. Bandung, xviii + 220 hlm.
- Pandiangan, D. (2011). Peningkatan produksi katarantin melalui teknik elisitasi pada kultur agregat sel *Catharanthus roseus*. Jurnal Ilmiah Sains. 11 (2)
- Patil, D.A. (2011). Ethnomedicine to modern medicine: genesis through ages. Journal Of Experimental Science: 2(3): 25-29.
- Syahid, S.F. & Hernani (2004). Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sennsetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*, Jurnal Litteri 7 (4): 99-103.
- Raghu, A.V., Martin, G., Priya, V., Geetha, S.P. & Balachandran, I. (2007). Low cost alternatives for micropropagation of *Centella asiatica*. Journal of Plant Sciences 2(6): 592-599.
- Rumondor M.J. , J. Mandang & W. Rotinsulu. (2013). Peningkatan sulforafan brokoli (*Brassica oleraceae L. var italicica*) dengan modifikasi media pada kultur jaringan. Jurnal Mipa Unsrat Online 2 (1) 60-65
- Sakya, A.T. 1995. Produksi metabolit sekunder melalui pengembangan sel tanaman. Caraka Tani 11: 7-17.
- Silalahi. M. (2010). Elisitasi peningkatan ajmalisin pada kultus kalus *Catharanthus roseus L. (G.) Don.* Berita Biologi
- Staba, E.J. (1980). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemistry. London: CRC Press, Inc.
- Subroto, M.A., et al. (1998). Produksi solasodin dari kulturakar hasil regenerasi daun tanaman transgenik *Solanum nigrum* secara in vitro. Jurnal Biosains 3(2): 46-50.
- Taiz, L. & Zeiger, E .(2002). Plant Physiology, 3 rd. Publisher, Sinauer Assosiates : 423-460.
- Tiwari, K.N., Sharma, N.C., Tiwari, V. & Singh, B.D. (2000). Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. Plant cell, tissue and organ culture 63: 179-185.
- Tripathi, L. & Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plant. Tropical Journal of Pharmaceutica Research. 2(2): 243-253.
- Verpoorte, R & Van der Heiden, R. (1991). Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospect. The Alkaloid 40 : 87-142. Leiden University.
- Wardani, D.P., Solichatun, & Setyawan, A.D.

- (2004). Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada variasi penambahan asam 2,4- diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan kinetin. *Biofarmasi* 2 (1): 35-43.
- Whitmer, S., van der 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*. *Journal of Biotechnology* 96 : 193-203.
- Wielanek, M. & Urbanek, H. (1999). Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57(1): 39-45.
- Williams, L.A.D. (2006). Ethnomedicine. *Journal West Indian Med* 55(4): 215.
- Wink, M. et al. (2005). Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resour.* 3: 90-100.
- Yuyun, R. Iregar, A.H., Rizkita, R.E. 2001. Pengaruh pemberian elisitor esktrak khamir *Saccharomyces cerevisiae* Hansen terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur aggregat sel *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi*. 5(4); 349-355.
- Zhao, J., Zhu, W., Hu, Q., & Guo. Y., (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.
- Zulhilmi, Suwirman & Netty, W. (2002) Surya Pertumbuhan dan uji Kualitatif kandungan metabolit sekunder kalus katang (*Spilanthes acmella* Murr.) dengan Penambahan PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Jurnal Biologi*. Universitas Andalas. 1(1): 1-8.