

## PERKEMBANGAN LATISIFER PADA KULTUR KALUS *Catharanthus roseus* (L) G. Don YANG DIINDUKSI DENGAN KOMBINASI ZAT PENGATUR TUMBUH KINETIN + NAA

### THE DEVELOPMENT OF LATICIFER ON CALLUS CULTURE *Catharanthus roseus* (L) G Don WHICH WERE INDUCED BY PLANT GROWTH REGULATOR COMBINATION KINETIN + NAA

**NI NYOMAN DARSINI**

*Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Udayana  
Kampus Bukit Jimbaran  
Email: darsininyoman@gmail.com*

#### INTISARI

Telah dilakukan penelitian mengenai perkembangan latisifer dalam kultur kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don dengan sumber eksplan daun kedua dari apeks pucuk. Eksplan ditanam pada medium zenk yang diinduksi dengan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin+NAA. Perkembangan latisifer diteliti dengan menggunakan metode analisis deskriptif anatomi kalus *C. roseus* umur 4 – 14 minggu. Persentase jumlah latisifer ditentukan dengan menghitung jumlah latisifer dan rata-rata jumlah sel-sel selain latisifer perlapang pandang di bawah mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan bahwa latisifer mulai dapat diamati pada kalus *C. roseus* yang diinduksi dengan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA dalam tahap pertumbuhan awal yaitu pada kalus berumur 9 minggu dengan ciri-ciri khas dinding sel lebih tebal dan nampak ukuran sel lebih besar bila dibandingkan dengan sel yang berada disekitarnya. Latisifer memanjang dapat dijumpai pada kalus berumur 12 minggu. Persentase latisifer yang maksimum pada kalus yang diinduksi kinetin and NAA adalah sebesar 0,12% dan dijumpai pada kalus *C. roseus* umur 12 minggu. Latisifer pada kalus umur 13 dan 14 minggu, menunjukkan anatomi yang sama dengan kalus umur 12 minggu, tetapi persentasenya lebih rendah.

*Kata kunci : eksplan, kalus, kinetin, latisifer, medium Zenk, NAA*

#### ABSTRACT

The development of laticifer on callus culture of *Catharanthus roseus* (L) G Don in Zenk medium supplemented with combination of plant growth regulator kinetin + NAA was studied. The explants were taken from the second folium from shoot apex. Development of laticifer was observed using descriptive analysis method for callus anatomy and percentage of laticifer was observed during 4 – 14 weeks of callus development. The percentage of laticifer was determined by counting the average number of the laticifer and the average number of surrounding cells in every optical field of few under light microscope. The results showed that early development of laticifer which was induced with plant regulator growth kinetin + NAA was found in the 9 weeks old callus. The laticifer has specific characteristics i.e. thicker cell wall and longer cell than surrounding cell. Elongated laticifer was observed at 12 weeks old callus. The highest percentage of laticifer on callus *C. roseus* induced with combination of kinetin and NAA was found in 12 weeks old callus i.e. 0,12%. At 13 and 14 weeks old callus, the anatomy of laticifer was similar to that at 12 weeks old callus, but the percentage was lower.

*Keywords : callus, explant, kinetin, laticifer, NAA, Zenk medium*

#### PENDAHULUAN

Tumbuhan selain menghasilkan metabolit primer seperti karbohidrat, protein, dan lemak juga mensintesis senyawa-senyawa organik lainnya yang merupakan hasil metabolit sekunder. Di samping berguna bagi tumbuhan, metabolit sekunder juga bermanfaat untuk manusia, antara lain sebagai penyedap makanan, insektisida, pewangi, dan sebagai sumber bahan obat-obatan (Ganapathi dan Kargi. 1990; Verpoorte dan Van der Heidjen, 1991).

Selama berabad-abad tumbuhan merupakan sumber penting untuk tanaman obat-obatan, bahkan sekarang ini kurang lebih setengah dari dari kebutuhan obat dunia masih berasal dari tumbuhan. Salah satu jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai sumber obat alami adalah tapak dara (*Catharanthus roseus* (L) G. Don). Tanaman ini sudah sejak lama digunakan sebagai obat tradisional untuk penyakit-penyakit seperti: diabetes melitus, leukemia, tekanan darah tinggi, kurang darah, desentri, asma, dan anti malaria. Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa pada *C. roseus* terdapat lebih dari

100 alkaloid, diantaranya ajmalisin sebagai senyawa bioaktif bersifat antihipertensif, vinkristin, dan vinblastin suatu alkaloid untuk obat kanker (Windhols, *et al.*, 1976 dan Kulkarni dan Ravinda, 1988).

Penelitian mengenai alkaloid yang dihasilkan oleh tanaman *C. roseus* ini memang sudah banyak dilaksanakan, namun beberapa aspek dari spesies ini belum diteliti. Salah satu aspek yang sangat penting yang belum diteliti antara lain perkembangan sel yang menghasilkan alkaloid tersebut. Sel penghasil alkaloid tersebut salah satunya adalah latisifer di samping sel-sel parenkim yang tidak mengeluarkan hasil sekresinya dari sel, berbeda dengan sel-sel kelenjar. Menurut Esau (1977) peristiwa sekresi adalah fenomena pemisahan zat-zat kompleks dari protoplas atau isolasi bagian-bagian dari protoplas. Zat-zat yang disekresikan bisa berupa senyawa kimia yang merupakan hasil akhir dari metabolisme yang tak berguna secara fisiologis berupa alkaloid dan terpen. Senyawa-senyawa ini biasanya tersimpan dalam latisifer.

Alkaloid berkasiat obat yang tersimpan dalam latisifer telah diproduksi telah diproduksi dalam skala besar dengan cara isolasi langsung dari tumbuhan utuh. Lamanya rentang waktu periode kultivasi antara penanaman dan pemanenan, ketergantungan terhadap iklim dan geografi, serta adanya faktor hama dan penyakit merupakan kendala dalam memproduksi senyawa-senyawa obat (Discomo dan Misawa, 1995). Vepoorte dan Van der Heidjen (1991) melaporkan bahwa untuk mendapatkan 3600kg ajmalisin dibutuhkan 200 – 300 ton akar *C. roseus*. Berat ajmalisin ini sangat sedikit jika dibandingkan bahan mentah yang diperlukan. Oleh karena itu diperlukan suatu metode alternatif untuk memproduksi alkaloid ini. Salah satu metode yang sering dipergunakan adalah dengan kultur jaringan. Teknik kultur jaringan didasarkan pada konsep totipotensi yang mengemukakan bahwa tiap sel tumbuhan membawa informasi genetik untuk semua fungsi-fungsi yang ada pada tumbuhan, termasuk biosintesis alkaloid dan diferensiasi lasifer sebagai sel penghasilnya. Berdasarkan pada konsep ini, maka sel-sel tumbuhan dapat dikultur untuk menghasilkan alkaloid dan terpenoid yang biasanya tersimpan dalam latisifer (Vepoorte dan Van der Heidjen, 1991).

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang perkembangan latisifer secara *in vitro* pada *C. roseus*. Mengingat peran latisifer sangat penting sebagai penghasil alkaloid yang berguna bagi kehidupan manusia. Di samping itu saat ini alkaloid lebih sering diisolasi atau diusahakan secara *in vitro* khususnya untuk *C. roseus* (Eilert *et al.*, 1994). Informasi mengenai perkembangan latisifer secara *in vitro* masih sangat terbatas.

## MATERI DAN METODE

### Bahan Tanaman dan Medium

Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan untuk mengamati perkembangan latisifer secara *in vitro* di dalam penelitian ini adalah *C. roseus* (L) G. Don yang berbunga merah. Tanaman tersebut diperoleh

dari Koperasi Unit Desa Cihideung, Lembang, Bandung, Jawa Barat. Sebagai eksplan digunakan daun kedua dari apeks pucuk *C. roseus*.

Medium yang digunakan adalah medium Zenk yang telah diketahui mampu menginduksi terbentuknya alkaloid dalam kalus *C. roseus* (Zenk *et al.*, 1977) dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA. Dalam penelitian ini kalus yang digunakan adalah kalus yang bertekstur kompak.

### Sterilisasi Bahan dan Alat Untuk Kultur Kalus

Medium dan alat-alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan di dalam otoklaf pada suhu 121° C, dengan tekanan 15 psi selama 20 menit. Kotak pemindah beraliran udara steril (*laminar air flow cabinet*) disinari dengan sinar ultraviolet dan dialiri dengan udara steril selama 1 jam terlebih dahulu, lalu dibersihkan dengan menggunakan kapas yang sudah dibasahi dengan etanol 70 %.

Eksplan berupa daun ke-2 *C. roseus* yang akan ditanam pada medium, terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, lalu direndam dalam larutan detergen cair selama 10 menit, lalu dibilas sampai sisa ditergennya hilang. Setelah itu daun direndam dalam aquades steril, dan kemudian disterilkan permukaannya dengan bayclin yang mengandung bahan aktif natrium hipoklorit 5,25 % dalam 2 tahap. Pada tahap pertama, konsentrasi bayclin yang digunakan adalah 20% ditambah dengan 2 tetes tween, selama 20 menit, lalu dibilas dengan aquades steril. Tahap kedua konsentrasi bayclin yang digunakan sebesar 10 % tanpa tween selama 15 menit, lalu dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali (Asra, 1999).

### Induksi Kalus

Penanaman dilakukan di dalam kotak pemindah beraliran udara steril. Daun yang sudah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran 0,7 x 0,7cm<sup>2</sup> dan selanjutnya ditanam pada medium induksi kalus yaitu medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh 10<sup>-5</sup> M kinetin + 10<sup>-7</sup> M NAA. Setelah penanaman, botol kultur disimpan dalam ruang kultur dengan kondisi gelap pada suhu kamar (Moris, 1986). Sub kultur pertama dilakukan pada kalus yang berumur empat minggu, dengan cara memindahkan seluruh kalus yang terbentuk pada medium penginduksi kalus sebelumnya. Sub kultur berikutnya dilakukan setiap 3 minggu sekali.

### Penyiapan Preparat dengan Metode Paraffin Menurut Sass (1958)

Kalus berumur 4 sampai 14 minggu yang diperoleh melalui kultur kalus difiksasi dalam larutan Craf III, kemudian diaspirasi. Setelah diaspirasi kemudian bahan dicuci dengan air mengalir lalu didehidrasi dengan alkohol seri, dilanjutkan dengan seri johansen I sampai V secara berurutan. Bahan kemudian dimasukkan ke dalam TBA murni I sampai III. Infiltrasi dengan minyak paraffin, paraffin lunak (dalam oven 48° C), paraffin keras (dalam oven 58° C, dan kemudian penanaman dalam paraffin keras. Sayatan kalus setebal 6 sampai 8 mikron,

diwarnai dengan pewarnaan asam tanat 1 % dan FeCl<sub>3</sub> 3%.

**Penyiapan Preparat dengan Metode Resin**

Kalus yang diperoleh melalui kultur kalus dipotong-potong dengan ukuran 1x1x1 mm difiksasi dengan glutaraldehida 2% dalam buffer fosfat 0,1M pH 7,2. Pasca fiksasi dalam osmium tetroksida 1% dan dehidrasi dengan etanol seri. Infiltrasi dan penanaman dalam LR White serta polimerisasi dalam oven selama 12 jam pada temperatur 60°C. Penyayatan dilakukan dengan mikrotom ultra dengan tebal sayatan 1 mikron dengan menggunakan pisau kaca. Pewarnaan dengan 0,5% toluidin blue dalam 0,1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, kemudian pengamatan dengan mikroskop cahaya.

**Teknik Perhitungan Persentase Jumlah Latisifer**

Perhitungan persentase latisifer dilakukan dengan menghitung jumlah latisifer dan sel bukan latisifer perlapang pandang di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Perhitungan dilakukan pada preparat awetan kalus *C. roseus* yang berumur 4 sampai 14 minggu, masing-masing diambil 10 x lapang pandang, kemudian dirata-ratakan. Rumus yang digunakan dalam perhitungan persentase latisifer adalah sebagai berikut (Suri and Ramawat, 1995):

$$\% \text{ latisifer} = \frac{L}{U+L} \times 100\%$$

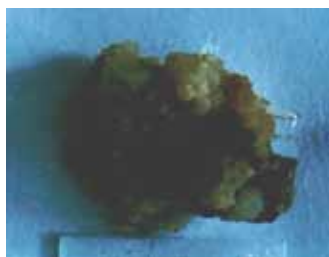
Keterangan:

L= jumlah latisifer

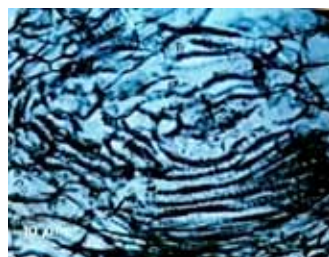
U=sel-sel lain selain latisifer

**HASIL**

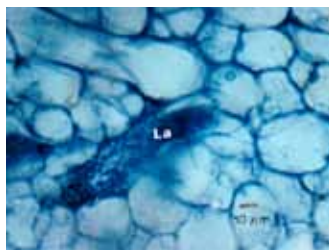
Potongan daun *C. roseus* yang ditanam dengan medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh 10<sup>-5</sup> M kinetin + 10<sup>-7</sup> M NAA dapat dilihat pada Gambar 1. Pada Gambar tersebut terlihat kalus yang sudah berumur 4 minggu, kalus sudah bertekstur kompak



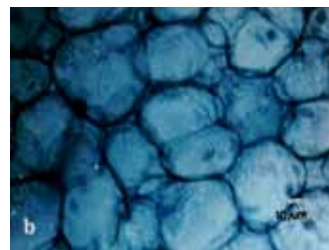
Gambar 1. sel induksi kalus.



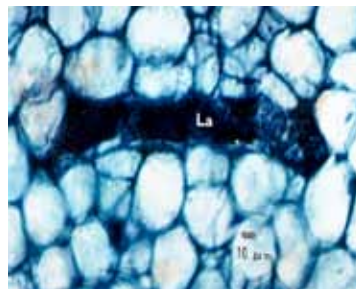
Gambar 3. anatomi kalus yang terdiri dari unsur-unsur pembuluh angkut



Gambar 2. Anatomi kalus yang hanya tersusun atas sel parenkim



Gambar 4. Latisifer mulai terdeteksi. La= latisifer



Gambar 5. Latisifer mulai memanjang

atau padat sehingga mudah diperlakukan dalam pembuatan preparat dengan metode paraffin.

Hasil pengamatan anatomi kalus yang diinduksi medium zenk dengan kombinasi zat pengatur tumbuh umur kinetin + NAA umur 4 sampai 6 minggu diper-

oleh gambar anatomi yang sama, yakni nampak kalus *C. roseus* tersusun atas sel-sel parenkim belum ditemui adanya sel latisifer (Gambar 2). Pada kalus umur 7 dan 8 minggu ditemukan adanya gambar anatomi yang sama (Gambar 3). Pada Gambar 3 tersebut telah dapat diamati unsur-unsur pembuluh angkut seperti trakeida, trakea, dan serat sklerenkim di samping dijumpai sel – sel parenkim sebagai jaringan dasar kalus *C. roseus* yang terbentuk pertamakali. Pada sayatan anatomi kalus *C. roseus* yang berumur 9 minggu telah mulai dijumpai adanya latisifer (Gambar 4) dengan ciri-ciri : ukuran sel lebih besar, dinding sel lebih tebal, warna isi sel lebih gelap bila dibandingkan dengan sel-sel sekitarnya. Pada sayatan anatomi kalus *C. roseus* umur 12 minggu telah dijumpai adanya latisifer yang sudah mulai memanjang (Gambar 5). Persentase latisifer kalus *C. roseus* yang diinduksi medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA dijumpai saat kalus berumur 12 minggu yaitu sebesar 0,12%

**PEMBAHASAN**

**Induksi Kalus**

Potongan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA menunjukkan terjadinya proliferasi sel yang dilanjutkan dengan pembentukan kalus (Gambar 1). Inisiasi kalus dimulai rata-rata seminggu setelah penanaman dan terbentuk pada daerah yang mengalami luka. Hal ini sesuai dengan pendapat George dan Sherington (1984) yang menyatakan bahwa pembedahan atau perlukaan sel-sel tumbuhan merangsang pembelahan sel, selanjutnya pembelahan sel ini berperan dalam pembentukan kalus. George dan Sherington telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi asam 1-deliin-1, 10-dikarboksilat yang dinamai juga asam traumatat. Senyawa ini berperan dalam merangsang pembentukan kalus pada permukaan kentang. Selain itu keberhasilan dalam menginisiasi kalus ditentukan oleh komposisi hormon dan nutrisi pada medium kalus. Kalus yang diinduksi dengan medium zenk pada awalnya berwarna coklat. Warna coklat ini diduga karena adanya kandungan metabolit sekunder yang diproduksi oleh kalus. Menurut Moris (1986) kalus yang diinduksi dalam medium zenk berwarna coklat dan produksi alkaloidnya tinggi.

**Hasil Pengamatan Anatomi Kalus *C. roseus***

Pengamatan anatomi kalus telah dilakukan pada

preparat awetan kalus *C. roseus* yang diinduksi medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA. Pengamatan dilakukan pada kalus berumur 4 sampai 14 minggu yang dibuat dengan metode paraffin dan metode resin.

Berdasarkan pada hasil pengamatan anatomi kalus umur 4,5 dan 6 minggu (Gambar 2) dapat diketahui bahwa anatomi kalus yang diinduksi medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA struktur anatominya masih sama, yakni hanya tersusun atas sel-sel parenkim. Dalam ilmu anatomi jaringan parenkim merupakan salah satu jenis jaringan yang berfungsi sebagai jaringan dasar dan sebagai media jaringan-jaringan lain dalam tubuh tumbuhan secara *in vivo*. Hal ini sesuai dengan pendapat Bruni *et al.* (1981) yang menyatakan bahwa diferensiasi latisifer belum terjadi pada kalus yang masih tergolong muda.

Berbeda dengan hasil pengamatan anatomi kalus *C. roseus* yang berumur 7 dan 8 minggu (Gambar 3), pada pengamatan ini telah mulai ditemukan diferensiasi jaringan lain selain jaringan parenkim yakni adanya diferensiasi unsur-unsur pembuluh angkut xilem seperti trakea, trakeid, serat sklerenkim. Adapun fungsi dari unsur pembuluh angkut tersebut adalah untuk mengangkut air, garam mineral dari dalam medium zenk yang akan diedarkan ke seluruh sel-sel kalus (*in vitro*). Pembuluh angkut xilem merupakan salah satu jaringan yang sangat penting yang ada dalam tubuh tumbuhan *in vivo*. Pembuluh angkut berfungsi untuk mengangkut air dan garam mineral dari dalam tanah pada tumbuhan secara *in vivo* (Fahn, 1995).

Latisifer yang diinduksi medium zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA untuk pertamakali dapat dijumpai pada sayatan anatomi kalus yang berumur 9 minggu (Gambar 4) dengan ciri-ciri dinding sel lebih tebal dan ukuran sel lebih panjang, di samping itu warna isi sel jauh lebih gelap dibandingkan dengan sel-sel sekitarnya. Warna isi sel yang jauh lebih gelap diduga karena kandungan alkaloid berkhasiat obat dalam latisifer.

Pada pengamatan anatomi kalus *C. roseus* yang diinduksi kinetin + NAA pada umur kalus 10 dan 11 minggu belum dijumpai tanda-tanda latisifer mulai berkembang atau mulai memanjang. Latisifer mulai memanjang ternyata ditemukan pada kalus berumur 12 minggu (Gambar 5). Diduga semakin panjang latisifer maka semakin banyak pula alkaloid berkhasiat obat yang terkandung di dalamnya. Oleh karena sebaiknya pemanenan alkaloid dari kalus *C. roseus* yang diinduksi medium zenk dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin + NAA boleh dilakukan pada kalus berumur 12 minggu. Pada sayatan anatomi kalus *C. roseus* umur 13 dan 14 minggu masih tetap dijumpai kondisi latisifer seperti kondisi latisifer yang terdapat pada kalus *C. roseus* yang berumur 12 minggu.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat dibuktikan bahwa latisifer yang terbentuk secara *in vivo* (dalam tubuh tumbuhan) pada tumbuhan *C. roseus* akan terbentuk pula secara *in vitro* (dalam kalus hasil induksi dengan

teknik kultur jaringan. Maka di sini dapat dibuktikan bahwa fungsi-fungsi informasi genetik yang dibawa oleh masing-masing sel tumbuhan baik sel-sel secara *in vitro* maupun sel-sel secara *in vivo* adalah sama. Latisifer yang terbentuk pada kalus *C. roseus* ini berasal dari satu sel yang terdeteksi setelah beberapa minggu umur kalus kemudian berangsur-angsur memanjang sampai mencapai ukuran panjang tertentu.

### **Persentase Jumlah Latisifer Pada Kalus *C. roseus* yang Diinduksi Medium Zenk dengan Kombinasi Zat pengatur Tumbuh Kinetin + NAA**

Persentase latisifer kalus *C. roseus* yang diinduksi medium zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA dihitung mulai kalus berumur 4 sampai 14 minggu. Berdasarkan hasil perhitungan persentase latisifer kalus *C. roseus* umur 4 sampai 14 minggu maka dapat diketahui bahwa, pada kalus *C. roseus* umur 4 sampai 8 minggu persentase latisifer adalah 0%, artinya saat kalus *C. roseus* berumur 4 sampai 9 minggu, latisifer belum terbentuk. Latisifer mulai terbentuk saat kalus berumur 9 minggu yang ditandai dengan persentase latisifer sebesar 0,05%. Persentase latisifer kalus *C. roseus* umur 10 dan 11 minggu meningkat sedikit yakni sebesar 0,07%. Persentase latisifer kalus *C. roseus* tertinggi di jumpai pada kalus berumur 12 minggu yakni sebesar 0,12%. Persentase latisifer mulai menurun pada kalus *C. roseus* berumur 13 dan 14 minggu yakni sebesar 0,10%.

Hopkins (1995) menyatakan faktor lain yang sangat menentukan kerja zat pengatur dalam menghasilkan suatu respon biologis misalnya dalam hal ini respon pembentukan latisifer adalah: (1). Jumlah reseptor zat pengatur tumbuh tersebut dalam sel target, semakin banyak reseptor maka semakin tinggi kemampuan zat pengatur tumbuh tersebut dalam menghasilkan suatu respon biologis. Bagaimanapun juga keberhasilan zat pengatur tumbuh dalam menghasilkan suatu respon biologis pertamakali sangat bergantung pada proses pengenalan zat pengatur tumbuh terhadap reseptor yang terdapat dalam sel target, karena reseptor inilah yang berfungsi dalam meneruskan sinyal sehingga gen-gen tertentu mengalami transkripsi. Di duga dalam hasil penelitian ini kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA memiliki jumlah reseptor yang relatif cukup sehingga mampu menginduksi diferensiasi latisifer dalam kalus *C. roseus*. (2). Sifat spesies spesifik dari suatu jaringan tanaman tertentu terhadap suatu zat pengatur tumbuh. Artinya jaringan tanaman yang berbeda memerlukan zat pengatur tumbuh yang berbeda pula untuk menghasilkan suatu respon biologis yang sama. Diduga kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA memiliki sifat spesies spesifik untuk tanaman *C. roseus* dalam menginduksi respon diferensiasi latisifer. Tanaman yang berbeda memerlukan komposisi zat pengatur tumbuh yang berbeda pula dalam menghasilkan respon yang sama.

### **Simpulan**

Berdasarkan hasil dan pembahasan tersebut di atas maka dapat disimpulkan bahwa perkembangan latisifer

pada kalus *C. roseus* (L) G. Don yang diinduksi medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA mulai dapat diamati pada kalus umur 9 minggu. Latisifer yang mulai memanjang, dijumpai pada anatomi kalus umur 12 minggu. Persentase jumlah latisifer tertinggi pada kalus *C. roseus* yang diinduksi medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin + NAA adalah sebesar 0,12% dan dapat dijumpai pada anatomi kalus umur 12 minggu.

## KEPUSTAKAAN

- Anderson, L.A., J.D. Philipson, M.F. Roberts, 1986. Aspects of Alkaloid Production by Plant Cell Culture. In : Secondary Metabolism in Plant Cell Culture. Moris, P., Scragg, A. H., Staford, Fowler, M. W. (eds). Cambridge University Press. Cambridge. p. 1 – 14.
- Asra, R. 1999. Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Phytium aphanidermatum* (Edson) Fitzs. Terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur Agregat sel *Catharanthus roseus* (L) G. Don. Tesis Magister Jurusan Biologi. ITB.
- Bruni, A., G.L. Vannini, G.D.Olio, 1981. Occurrence of Laticifer in culture derived from *Euphorbia marginata* : A Study by Fluorescence. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 103.S. 373 – 377.
- Cass, D.D. 1985. Origin and Development of the Non-Articulated Laticifer of *Jatropha dioica*. Phytomorphology. 35 : 133 - 140
- Dhir, S.K., N.S. Shekawat, S.D. Phurohit, H.C. Arya, 1984. Development of Laticifer Cell in Callus Cultures of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. Plant Cell Rep. 3 : 206 – 209.
- Discomo, F., M. Misawa. 1995. Plant Cell and Tissue Culture : Alternatives for Metabolite Production. Biotech. Adv. 3 : 425 – 453.
- Eisai. 1995. Medicinal Herb Index in Indonesia. Indek Tumbuhan Obat di Indonesia. Edisi ke 2. p. 196
- Eilert, U., L.R. Nesbitt. F. Constabel. 1984. Laticifers and Latek in Fruits of Periwinkle *Catharanthus roseus*. Can. J. Bot. 63 : 1540- 1546.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. 4th edition. Pergamon Press. Oxford. p. 142 – 149.
- Fineran, B.A. 1982. Distribution and Organization of Non-Articulated Laticifers in Mature Tissue of Poinsettia (*Euphorbia pulcherima* Wild). An. Bot. 50 : 207 – 220.
- Fineran, B.A. 1983. Differentiation of Non – Articulated Laticifer in Poinsettia (*Euphorbia pulcherima* Wild.) An. Bot. 52 : 279 – 294.
- Fitriani, A. 1998. Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Terhadap Kandungan Ajmalisin Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don. Tesis Jurusan Biologi, ITB.
- Ganapathi, B., F. Kargi. 1990. Recent advances Indole Alkaloid Production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *J. Ex. Bot.* 41 : 259 – 267.
- George, E. F., P.D.Sherington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. England. p. 307 – 330
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II. Diterjemahkan oleh Badan Litbang. Kehutanan Jakarta. Yayasan Wanajaya Jakarta. P. 1180
- Hopkins, W.G. (1995). Introduction to Plant Physiology. John Wiley dan Sons, Inc. New York. P. 312 – 313.
- Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. 2nd ed., Tata Mc Graw-Hill Publ. Ltd
- Kulkarni, R.N., N.S.Ravinda, 1988. Resistance *Pythium aphanidermatum* in Diploid and Induced Autotetraploids of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* 176 : 356 – 359.
- Mahlberg, P.G. 1959. Development of non-articulated Laticifers in Ploriferated Embryos of *Euphorbia marginata* Purch. *Phytomorphology* 9 : 156 – 162
- Mahlberg, P.G. 1963. Development of non-articulated Laticifers in Embryos of *Euphorbia marginata*. *Amer.J. Bot.* 55(3) : 375 – 381.
- Morris, P. 1986. Regulation of Product Synthesis in Cell Culture of *Catharanthus roseus*. III, Alkaloid Metabolism in Culture Leaf tissue and Primary Callus. *Planta Med.* 121 – 132.
- Ponglux, D., S. Wongseripipatana, T. Phadungcharoen, N. Ruangrungrong Sri, K. Likhiwitayawuid, 1987. Medicinal Plants International Congress on Natural Products. Bangkok. Thailand. p. 78 – 79.
- Sass, J.E. 1958. Botanical Microtechnique. The Iowa state College Press. Ames. Iowa.
- Suri, S.S., K.G. Ramawat. 1995. In vitro hormonal regulation of laticifer differentiation in *Calotropis procera*. *An. Bot.* 75 : 477-480
- Zenk, M.H., H. El-Shagi, E.W. Stockigt, E.W. Weiler, B. Deus. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Chantaranthus roseus*. In: Plant cell culture and its bio-technological application. Barz, W., E. Reinhard, M.H. Zenk (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. p. 27-43
- Verpoote, R., R. Van der Heidjen. 1991. Plant Biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospect. In The Alkaloids. Academic Press p- 116
- Windholz, M., S. Budavari, L.Y> Stroumstos, M.N. fertig. 1976. Ther Merck Index. An Encyclopedia of Chemical and drug. 9<sup>th</sup>. Ed. Merck & Co. Inc. Rahway, N.J.USA