

KANDUNGAN VINKRISTIN PADA KULTUR KALUS
***Catharanthus roseus* (L) G. DON YANG DIBERI PERLAKUAN**
TRIPTOFAN DAN VINDOLIN

Ellen Lombonbitung¹⁾, W. Tilaar¹⁾, Dingse Pandiangan²⁾

¹⁾Program Studi Agronomi, Pasca Sarjana Universitas Sam Ratulangi Manado

²⁾Jurusan Biologi Fak. MIPA Universitas Samratulangi Manado.

ABSTRACT

Catharanthus roseus (L) G. Don also called Tapak dara plant is cultivated plant, besides its function as ornamental plant but also can be functioned as medicinal plant. Alkaloid compounds from this plant has been isolated and used as an anti cancer drug, are vinblastine and vincristine. Vinblastin and vincristine were poor alkaloid compounds produced in plants. Vincristine made from joined catharantine and vindolin, cause it is expected that vindolin be able to increase the content of vincristine. The research was carried out to knew the vincristine content of callus culture were given tryptophan treatment and vindolin. The research plan used was completely random design, by tryptophan combination (0, 75 and 150 mg/L) and Vindolin (0, 0,2, 0,4 and 0,6 mg/L), factorial. The vincristine content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Based on HPLC data, it was made standar curve and regression linear equation that describe the relationship between standar vincristine concentration of area. The obtained result from the research proved the tryptophan and vindoline treatment affecting the vincristine content. The highest vincristine content was showed to T1V0 treatment (Tryptophan 150 mg/L and Vindolin 0 mg/L), is 2,352 µg/g dw.

Keywords : Vincristine, Tryptophan, Vindolin

ABSTRAK

Catharanthus roseus (L) G. Don yang disebut juga tanaman tapak dara merupakan tanaman yang banyak dibudidayakan selain sebagai tanaman hias juga berkhasiat obat. Senyawa kelompok alkaloid dari tanaman ini telah diisolasi dan dijadikan obat anti kanker, yaitu vinblastin dan vinkristin. Vinblastin dan vinkristin adalah senyawa alkaloid yang sangat kecil dihasilkan dalam tanaman. Produksi alkaloid dari *Catharanthus roseus* (L) G. Don Vinkristin terbentuk dari gabungan katarantin dengan vindolin, karena itu diharapkan dengan vindolin dapat meningkatkan kandungan vinkristin. Penelitian dilakukan untuk mengetahui Kandungan Vinkristin pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don yang diberi Perlakuan Triptofan dan Vindolin. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial dengan perlakuan kombinasi triptofan (0, 0,75 dan 150 mg/L) dan vindolin (0, 0,2, 0,4 dan 0,6 mg/L). Kandungan Vinkristin ditentukan dengan menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Berdasarkan hasil KCKT dibuat kurva standar dan persamaan regresi yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi vinkristin standar terhadap luas area. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini membuktikan perlakuan triptofan dan vindolin mempengaruhi kandungan vinkristin.

Kandungan vinkristin tertinggi berada pada perlakuan T1V0 (Triptofan 75 mg/L dan Vindolin 0 mg/L), yaitu sebesar 2,352 µg/g bk.

Kata Kunci : Vinkristin, Triptofan, Vindolin

PENDAHULUAN

Catharanthus roseus (L) G. Don yang disebut juga tanaman tapak dara merupakan tanaman perdu tahunan yang banyak dibudidayakan selain sebagai tanaman hias juga berkhasiat obat. Tanaman tapak dara ini kaya akan kandungan alkaloid. Beberapa senyawa kelompok alkaloid dari tanaman ini telah diisolasi dan dijadikan obat anti kanker yaitu vinblastin dan vinkristin (Anonim, 2014, Dewick, 2009, Crozier, *et al* 2006). Mariska (2013) menyatakan vinblastin dan vinkristin adalah senyawa metabolit sekunder yang diproduksi dari bunga tapak dara dan merupakan alkaloid untuk obat leukemia.

Penyakit kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel yang tidak normal bermultifikasi tanpa kontrol yang kemudian tumbuh dan berkembang menjadi tumor/kanker (Suiraoaka, 2012).

Pandiangan (2012) mengemukakan sel mengalami spesialisasi ada hubungannya dengan kandungan IAA dan katarantin yang meningkat setelah diberi perlakuan triptofan. Menurut Oksman, *et al*, (2007) vinblastin dan vinkristin terbentuk dari gabungan katarantin dan vindolin, sehingga diharapkan dengan penambahan vindolin dapat meningkatkan juga vinkristin.

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis kandungan vinkristin pada kultur kalus *C. roseus* yang diberi perlakuan triptofan dan vindolin. Diduga dengan pemberian triptofan dan vindolin akan memberikan pengaruh terhadap kandungan vinkristin pada kultur kalus *C. roseus*.

METODE PENELITIAN

BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan adalah tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*, (L) G. Don) berbunga putih sebagai sumber eksplan. Bahan Kimia yang digunakan adalah medium MS (Lampiran.1), desinfektan, etanol, 2,4-D, NAA, Kinetin, HCl, NaOH, aquades steril, methanol HPLC, methanol Pa, asetonitril, diamonium hidrogen fosfat, vinkristin standar, triptofan dan vindolin.

Alat-alat yang digunakan timbangan analitik, autoclave, laminar air flow cabinet, alat-alat gelas standar (labu takar, beker gelas, pipet volume, erlenmeyer, gelas piala, labu pisah, pengaduk dan wadah kultur), pH meter, scalpel, pinset, cawan petridish, rak kultur, aluminium foil, oven, mortar, centrifuse, HPLC.

RANCANGAN PERCOBAAN

Penelitian akan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial, dengan perlakuan kombinasi Triptofan dan Vindolin. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Triptofan, terdiri atas control 0 mg/L (T0), 75 mg/L (T1) dan 150 mg/L (T2). Vindolin, terdiri atas control 0 mg/L (V0), 0,2 mg/L (V1), 0,4 mg/L (V2), 0,6 mg/L (V3)

ANALISIS DATA

Data yang diperoleh pada tahapan produksi kalus dianalisis secara Analisis Varians dan bila berbeda nyata akan dilanjutkan dengan uji BNT. Pada tahapan analisis kandungan vinkristin data kuantitatif dianalisis melalui persamaan regresi yang diperoleh dari kalibrasi kurva larutan standar.

PROSEDUR KERJA

1. Persiapan dan Pembuatan media

Media awal untuk induksi kalus adalah medium dasar MS dengan penambahan 2 mg/L 2,4 D dan Kinetin 0,2 mg/L. Media dibuat sebanyak 1 Liter untuk sekitar 40 botol kultur.

2. Persiapan dan sterilisasi eksplan

Daun ke 3 atau 4 diambil dari pucuk tapak dara, kotoran daun dibersihkan dengan membersihkannya dalam air mengalir, kemudian masukkan dalam erlenmeyer 250 ml dan beri akuades. Eksplan direndam dalam etanol 70% selama 1 menit dan dibilas dengan akuades steril. Pemutih atau desinfektan 70% dimasukkan ke dalam botol berisi eksplan sekitar 25 ml digoyang-goyang dan ditunggu 15 menit kemudian dituangkan dan bilas dengan akuades steril dan dilakukan beberapa kali (minimal 3 kali) hingga bersih.

3 Inokulasi eksplan pada media.

Eksplan yang sudah steril di ambil 1 helai daun (dengan pinset steril). Daun dipotong-potong sekitar 0,5 mm x 0,5 mm, dan diusahakan tulang daunnya yang besar dikeluarkan. Satu daun dapat menghasilkan 5 atau 6 potongan daun

Potongan daun tapak dara diinokulasikan dalam media yang sudah di sediakan.

Variabel pengamatan keberhasilan adalah adanya kalus yang tumbuh dengan warna kuning keputihan.

Setelah berumur 4 minggu, kalus dipisahkan dari eksplan daun dan dipindahkan ke medium baru dengan komposisi yang sama dengan medium sebelumnya. Ketika kalus berusia 8 minggu, kalus dipindahkan ke dalam medium produksi, yaitu MS padat yang ditambahkan zpt 2 mg/L NAA dan 0,2

mg/L kinetin. Setelah berumur 12 minggu, kalus disubkultur ke dalam medium yang mengandung triptofan dan vindolin yaitu medium MS padat ditambah dengan komposisi ZPT dengan NAA 2 mg/L dan kinetin 0,2 mg/L yang sama dengan medium produksi sebelumnya. Parameter yang diamati adalah penampakan morfologi dan berat basah kalus.

4. Identifikasi Vinkristin

Identifikasi kandungan vinkristin dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi sampel dengan vinkristin standar dalam kondisi yang sama. Bila terdapat senyawa yang memiliki waktu retensi yang sama dengan vinkristin standar, maka senyawa tersebut merupakan vinkristin. Analisis kuantitatif dilakukan dengan cara mengkonversi luas area sampel dengan luas area standar yang telah diketahui konsentrasinya (Pandiangan, 2010).

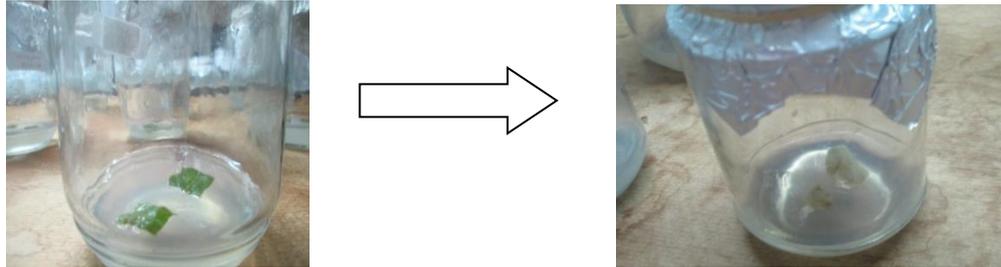
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. INDUKSI KALUS

Pada tahap induksi kalus, media yang digunakan adalah Media MS (Murashige dan Skoog) dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4 D mg/L dan Kinetin 0,2 mg/L. Kalus mulai terbentuk pada hari ke-8 setelah kultur. Kemunculan awal kalus pada daerah tepi atau bekas sayatan dimungkinkan sebagai salah satu bentuk respon tumbuhan terhadap terjadinya pelukaan pada jaringan ataupun selnya (Pitoyo, dkk, 2002). Hasil penelitian Pandiangan dan Nainggolan (2006a) menyatakan pembentukan kalus pada hari ke-8 setelah penanaman umumnya diikuti

oleh pertumbuhan kalus yang makin membesar. Hasil pengamatan secara visual, kalus yang terbentuk berwarna

putih kekuningan dengan struktur kalus meremah, seperti pada Gambar berikut:



Gambar 1. Tahap Induksi Kalus

Sub Kultur Kalus

Kalus yang terbentuk pada tahap induksi, setelah berumur 4 (empat) minggu dipindahkan ke media yang baru yang sama dengan media sebelumnya yaitu Media MS yang ditambahkan dengan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4 D 2 mg/L dan Kinetin 2 mg/L. Pada tahap ini sel kalus dalam proses pertumbuhan dengan pembelahan selnya yang ditandai dengan bertambahnya ukuran kalus. Hal

ini diduga adanya aktivitas zat pengatur tumbuh 2,4 D dan Kinetin yang bersinergi dalam proses pertumbuhan kalus. Gardner, *et al* (1991) menyatakan bahwa auksin merupakan substansi pertumbuhan khususnya merangsang perpanjangan sel sedangkan sitokinin merupakan substansi pertumbuhan yang khususnya merangsang pembelahan sel. Hasil Pengamatan secara visual pada tahap ini kalus berwarna putih kekuningan dengan struktur kalus meremah.



Gambar 2. Gambar. Kalus subkultur pada Media MS yang diberi 2,4 D + Kinetin

Produksi Kalus

Kalus berumur 8 (delapan) minggu disubkultur pada media produksi yaitu media dasar MS yang ditambahkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) NAA 2 mg/L dan Kinetin 0,2 mg/L. Pada tahap ini kalus masih melakukan pembelahan dan

pembesaran sel diikuti struktur sel yang makin padat sehingga tampak menjadi kompak. Hasil Pengamatan secara visual pada tahap ini struktur kalus yang awalnya meremah menjadi kompak, inipun sesuai dengan hasil penelitian Pandiangan, dkk (2006a) induksi kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA 2 mg/L dan Kinetin 0,2

mg/L dihasilkan kalus tipe kompak. Menurut Hirata, dkk (1995) kalus yang embrionik mempunyai sifat kalus kompak, bernodul dan terlihat berwarna putih kehijauan . Hasil akhir Kalus di tahap ini pada umur 12 (dua belas) minggu dihasilkan kalus dengan warna kalus putih agak keruh.

Kalus pada Media Perlakuan

Kalus dari hasil produksi pada umur 12 minggu kalus disubkulturkan pada media perlakuan yaitu media dasar MS (Murashige & Skoog) yang ditambahkan 2 mg/L NAA dan 0,2 mg/L Kinetin dan diberi perlakuan kombinasi triptofan dengan vindolin sebagai berikut , Triptofan : T0 = 0 mg/L, T1=75 mg/L, T2=150 mg/L dan Vindolin : V0 = 0 mg/L, V1 =0,2 mg/L, V2 =0,4 mg/L dan 0,6 mg/L. Dari

perlakuan diatas maka terdapat 12 kombinasi perlakuan. Hasil pengamatan diperoleh kalus berwarna putih kuning agak kecoklatan sampai putih kecoklatan agak kemerahan dengan struktur kalus kompak. Adanya kalus yang berwarna kecoklatan diduga pada fase ini mulai terbentuk metabolit sekunder. Pitoyo, dkk (2002) menyatakan bahwa kalus diusia diatas 21 hari mulai mengalami perlambatan pertumbuhan sampai akhirnya konstan dan diikuti pencoklatan. Pencoklatan yang terjadi pada kalus dalam kondisi ini dimungkinkan karena terakumulasinya senyawa fenol dalam kalus. Pencoklatan umumnya berasosiasi dengan kenaikan masukan percabangan jalur sikimat, yang akan meningkatkan sintesis asam fenolik dan fenilpropanoid yang akan berkompetisi dengan percabangan Indol.

Tabel 1. Data rata-rata berat basah kalus (g) yang diberi perlakuan triptofan dan vindolin

Triptofan \ Vindolin	Vindolin			
	V0 (0 mg/L)	V1 (0,2 mg/L)	V2 (0,4 mg/L)	V3 (0,6 mg/L)
T0 (0 Mg/L)	1,33 ^b	1,27 ^b	1,27 ^b	1,46 ^d
T1 (75 mg/L)	1,27 ^b	1,37 ^c	1,13 ^a	1,30 ^b
T2 (150 mg/L)	1,70 ^e	1,83 ^f	1,50 ^d	1,80 ^f

Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata pada α 0,05 (0,06282)

Dari hasil analisis statistik maka pengaruh perlakuan kombinasi triptofan dan vindolin memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap rata-rata berat basah kalus. Rata-rata semua jenis perlakuan mengalami kenaikan berat basah kalus dari berat awal ± 1 g . Perlakuan T2V1 (Triptofan 175 mg/L dan Vindolin 0,2 mg/L) memiliki rata-rata berat basah tertinggi yaitu 1, 83 g dengan kenaikan 83 %.

Kontrol (T0V0) juga mengalami kenaikan sebesar 33 % atau 1,33 g.

Peningkatan berat basah kalus disebabkan kondisi kultur yang sesuai dapat mendorong pertumbuhan kalus. Pandiangan dan Nainggolan, (2006a) menyatakan bahwa optimasi kondisi kultur diarahkan pada penambahan biomassa dan produksi metabolit sekunder.

Tabel 2 . Data rata-rata berat kering kalus (g) yang diberi perlakuan triptofan dan vindolin

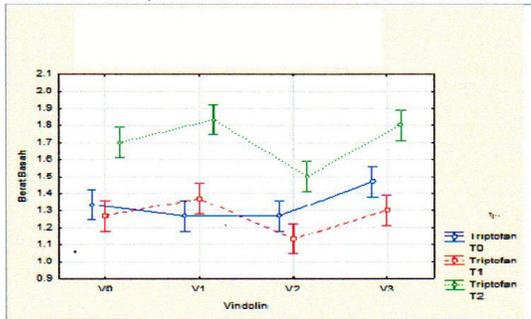
Triptofan \ Vindolin	Vindolin			
	V0 (0 mg/L)	V1 (0,2 mg/L)	V2 (0,4 mg/L)	V3 (0,6 mg/L)
T0 (0 mg/L)	0,15 ^f	0,12 ^c	0,12 ^c	0,13 ^d
T1 (75 mg/L)	0,12 ^c	0,09 ^a	0,11 ^b	0,11 ^b
T2 (150 mg/L)	0,14 ^e	0,15 ^f	0,14 ^e	0,16 ^g

Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata pada α 0,05 (0,00920)

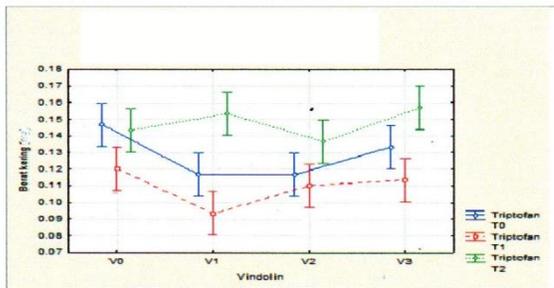
Seperti halnya berat basah kalus, berat kering kalus dari analisis statistik dari berbagai perlakuan kombinasi triptofan dan vindolin juga menunjukkan perbedaaan nyata sedangkan perlakuan dengan hanya triptofan maupun vindolin menunjukkan perbedaan sangat nyata, Dari Tabel 1 dan Tabel 2, hubungan antara triptofan dan vindolin terhadap

walaupun dari hasil pengukuran berat kering kalus mengalami penurunan. Adanya kadar air di dalam kalus yang mempengaruhi berat basah kalus dan pada saat proses pengeringan terjadi penguapan.

berat basah kalus dan berat kering kalus dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 3. Berat basah kalus(g) dengan perlakuan triptofan (0;75;150 mg/L) dan vindolin (0;02;0,4;0,6 mg/L)



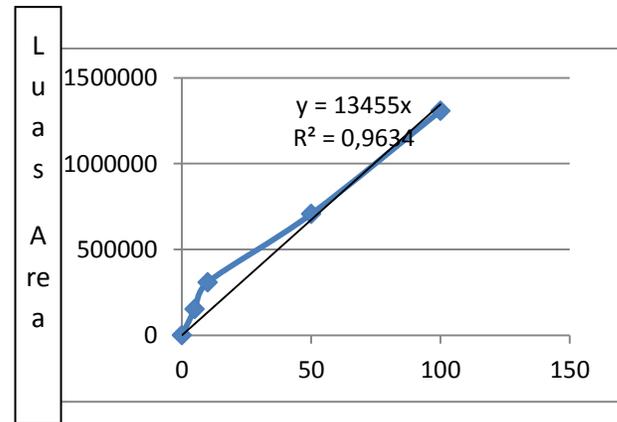
Gambar 4. Berat kering kalus (g) dengan perlakuan triptofan (0;75;150 mg/L) dan vindolin (0;02;0,4;0,6 mg/L)

Kandungan vinkristin yang diberi triptofan dan vindolin

Data hasil kromatogram dapat dilihat pada Tabel.4 di bawah ini.

Tabel 4. Data hasil KCKT standar vinkristin

Konsentrasi Standar vinkristin	Luas Area	Waktu Retensi
0 ppm	0	0
5 ppm	152742	8,363
10 ppm	308831	8,371
50 ppm	706269	8,364
100 ppm	1306976	8,789



Gambar 5. Kurva standar vinkristin

Analisis kandungan vinkristin dilakukan dengan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagaimana prosedur kerja dengan membandingkan retensi time larutan standar dengan sampel. Hasil kromatogram capaian retensi time larutan standar berada

disekitar menit 8, dapat dilihat pada tabel.4 di atas. Berdasarkan kurva baku standar vinkristin maka diperoleh nilai $R^2 = 0,963$ atau berada pada tingkat ketepatan 96,3 % dengan persamaan regresinya, $Y = 13455x$.

Tabel 5. Data Kandungan Vinkristin ($\mu\text{g/bk g}$) pada Kultur Kalus *C.roseus* yang diberi perlakuan Kombinasi Tiptofan dan Vindolin

Tryptofan \ Vindolin	V0	V1	V2	V3
	(0 mg/L)	(0,2 mg/L)	(0,4 mg/L)	(0,6 mg/L)
T0 (0 mg/L)	0,005	0,013	0,035	0,104
T1 (75 mg/L)	2,352	0,203	0,116	0,110
T2 (150 mg/L)	0,136	0,343	0,105	0,078

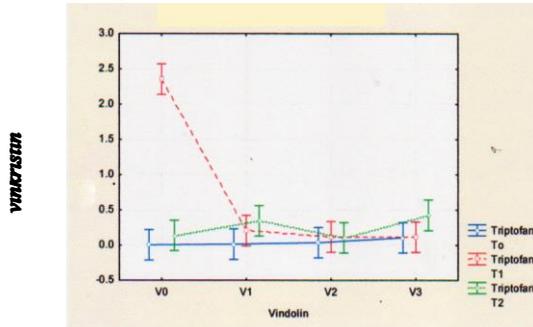
Berdasarkan data di atas, kandungan vinkristin tertinggi ada pada perlakuan T1V0 (triptofan 75 mg/L dan vindolin 0 mg/L) yaitu 2,352 $\mu\text{g/g bk}$. Kalus pada perlakuan ini berasal dari kalus yang pertumbuhannya lebih rendah dari kontrol. Ini berarti nutrisi pada media banyak digunakan untuk sintesis alkaloid. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan triptofan dengan konsentrasi 75 mg/L berpengaruh terhadap peningkatan produksi vinkristin.

Perlakuan dengan triptofan dan vindolin (T1V1, T1V2, T1V3, T2V1, T2V2 dan T2V3) diperoleh kandungan vinkristin paling tinggi pada T2V1 (triptofan 150 mg/L dan vindolin 0,2 mg/L) yaitu 0,343 $\mu\text{g/g bk}$. Kalus pada

perlakuan ini memiliki pertumbuhan yang sama dengan kontrol. Pandiangan, dkk (2006) menyatakan bahwa Produksi katarantin akan maksimal apabila pertumbuhan sel (biomassa) dan kandungan katarantin berada pada kondisi optimal. Kandungan vinkristin pada T2V3 diperoleh paling rendah akan tetapi memiliki pertumbuhan kalus paling tinggi. Hal ini disebabkan nutrisi pada media banyak digunakan untuk pertumbuhan kalus bukan untuk sintesis vinkristin.

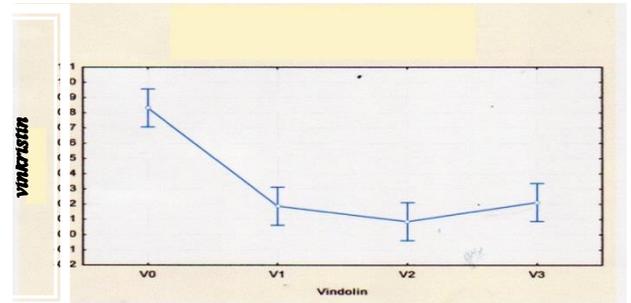
Kontrol sebagai perbandingan, kandungan vinkristin sangat kecil yaitu 0,005 $\mu\text{g/g bk}$. Dari hasil penelitian ini sangat jelas bahwa triptofan dan vindolin sangat mempengaruhi kandungan vinkristin pada sel *C. roseus*

akan tetapi ada konsentrasi yang optimum untuk pencapaian produksi maksimum vinkristin.

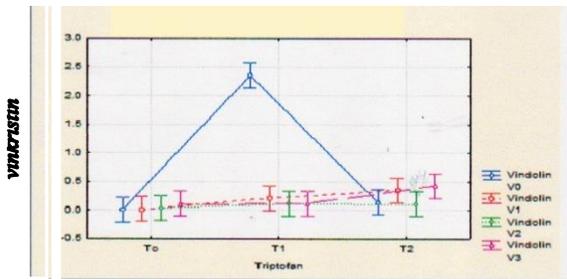


Gambar 6. Pengaruh triptofan (0;75;150 mg/L) pada taraf vindolin (0;02;0,4;0,6 mg/L) terhadap kandungan vinkristin (µg/g bk)

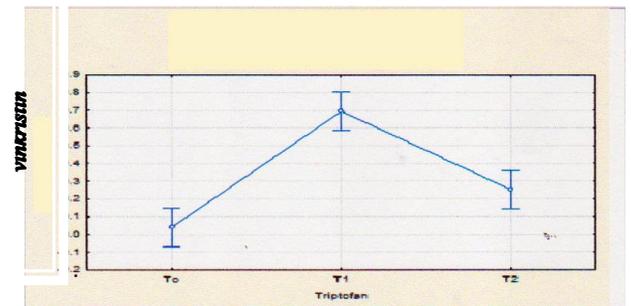
Pengaruh perlakuan triptofan dan vindolin terhadap kandungan vinkristin, dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 8. Pengaruh vindolin (0;02;0,4;0,6 mg/L) terhadap kandungan vinkristin (µg/g bk)



Gambar 7. Pengaruh vindolin (0;02;0,4;0,6 mg/L) pada taraf triptofan (0;75;150 mg/L) terhadap kandungan vinkristin (µg/g bk)



Gambar 9. Pengaruh triptofan (0;75;150 mg/L) terhadap kandungan vinkristin (µg/g bk)

KESIMPULAN

Perlakuan Triptofan dan Vindolin mempengaruhi kandungan vinkristin pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L) G.Don. Hasil penelitian diperoleh kandungan vinkristin tertinggi pada perlakuan T1V0 (Triptofan 75 mg/L dan Vindolin 0 mg/L), yaitu 2,352 µg/g

bk. Ini berarti peningkatan kandungan vinkristin disebabkan hanya oleh perlakuan triptofan. Dengan demikian perlakuan triptofan 75 mg/L adalah yang optimal untuk peningkatan kandungan vinkristin.

SARAN

Dapat dilakukan penelitian sejenis dengan cara pemberian perlakuan triptofan dan vindolin dalam waktu yang berbeda. Triptofan dapat diberikan pada awal perlakuan dan vindolin selang

beberapa waktu setelah pemberian triptofan. Untuk mengukur kandungan vinkristin pada kalus perlu optimasi faktor-faktor yang mempengaruhi mulai dari persiapan ekstrak sampel sampai pengaturan kondisi HPLC.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2014, Sehat alami dengan herbal, 250 Tanaman herbal berkhasiat obat + 60 Resep menu kesehatan. Pusat studi Biofarmaka LPPM IPB dan Gagas Ulung. PT. Gramedia Pusat, Jakarta.
- Crozier, A, M.N, Chifford , H, Ashihara. *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* 2006. Blackwell Publishing,Ltd. P.102-133.
- Dewick, M.P. *Medicinal Natural Product A Biosynthetic Approach.* 3rd Edition. 2009. A John Wiley and Son, Ltd, Publication. P. 366 – 385.
- Gardner,P.F, R.B, Pearce and R.L, Mitcel, 1985. *Physiologi of Crop Plants.*The Low State University Press. Penerjemah Susilo, H, 1991. UI-PRESS.Jakarta.
- Hirata,Y, Hirata, K, N, Kurano, K, Mijamoto dan K, Uchida. 1995. Formation of vinblastine in multiple shoot culture *Catharantus roseus*. In Press.
- Mariska,I, 2013, Metabolit Sekunder : Jalur Pembentukan dan kegunaannya, <http://biogen.litbang.pertanian.go.id/index.php/2013.08>, diakses tanggal 24 Juli 2015.
- Oksman-Caldentey,K.M.S.T, Hakkinen and H.Rischer, 2007. *Metabolic engineering of the alkaloid biosynthesisbin plants : functional genomic approaches,* in R.Verpoorte, A.W, Alfermann, T,S, Johnson (Eds). *Application of Plant Metabolic Engineering.* pp. 109-127. Published by Springer, P.O, BOX 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands.
- Pitoyo, A, Solichatun,E,Anggarwulan, 2002. Optimalisasi Produksi Alkaloid Indol Terpenoid pada Kultur Kalus dan Suspensi Sel *Catharantus roseus* (L), G,Don. dengan Pemberian HCL dan Variasi Triptofan dalam Media Kultur. Journal Bio Smart Vol. 5 No. 1.ISSN.1411-321X, April 2003. Hal :25 – 32.
- Pandiangan, D, 2010, Kandungan IAA dengan Pertumbuhan dan Kandungan Katarantin Kultur Agregat Sel *Catharantus roseus* yang diberi perlakuan Triptofan dalam Labu Erlenmeyer. Jurnal Ilmiah Sains Vol.10 No.2, Oktober 2010. ISSN 1412 – 3770.
- Pandiangan, D & N, Nainggolan, 2006a, Produksi Alkaloid dari Kalus Tapak Darah. Jurnal Ilmiah Sains,6, 48 -54.

Pandiangan, D & N, Nainggolan, 2012, Peningkatan Produksi Katarantin pada Kultur Kalus *C.roseus* yang diberi NAA. Jurnal Hayati 13; 3, p. 90 – 94.

Suiroka,IP, 2012. Penyakit Degeneratif Mengenal, mencegah dan mengurangi faktor resiko 9 penyakit degenerative, Nuha Medica, Yogyakarta

Lampiran 1. Tabel Komposisi Medium MS (1962) untuk Induksi kalus *Catharanthus roseus* (L) Don G. (Pandiangan, D , 2011)

No	Kode stok	Komponen MS	Konsentrasi Mg/L	Stok 10 L Dalam 100 ML
I.	Unsur makro			
1	A	NH ₄ NO ₃	1650	16500
2	B	KNO ₃	1900	19000
3	C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4400
4	D	MgSO ₄ ·7H ₂ O	170	1700
5	E	KH ₂ PO ₄	370	3700
II.	Unsur Mikro			
6	F	FeSO ₄ ·7H ₂ O	37,3	373
7		NaEDTA	27,8	278
8	G	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	223
9		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	86
10		H ₃ BO ₃	6,2	62
11		KI	0,83	8,3
12		NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	2,5
13		CuSO ₄ ·7H ₂ O	0,025	0,25
14		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,25
III.	Vitamin-Vitamin			
15	H	Glisin	2	20
16	I	Inositol	100	1000
17	J	Asam nikotin (Nicotin Acid)	0,5	5
18		Pirydoxin-HCl	0,5	5
19		Thiamin-HCl	0,1	1
20		NAA	2	20
		Kinetin	0,2	2
21		Sukrosa(Gula)	30.000	
22		Agar	8.000	