

ANATOMI KALUS YANG BERASAL DARI EKSPLAN DAUN
***Catharanthus roseous* (L). G. Don**
(TAPAK DARA)

Dra. Widi Purwianingsih, M.Si, Dra. R. Kusdianti, M.Si, Linda Yuniarti, S.Si

ABSTRAK

Catharanthus roseous (L).G.Don merupakan tanaman yang dapat dijadikan tanaman hias dan tanaman obat. Saat ini *C. roseous* mulai diperbanyak melalui teknik kultur jaringan secara langsung maupun tak langsung, melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengamati anatomi kalus *C. roseous* yang sedang bermorfogenesis. Daun *C. roseous* dengan urutan daun pertama sampai ketiga digunakan sebagai eksplan dan ditanam pada medium Murashige dan Skoog dengan penambahan zat pengatur tumbuh berupa 2,4-D dengan konsentrasi 10^{-5} M dan kinetin 10^{-6} M untuk menginduksi terbentuknya kalus. Setelah berusia 2 bulan, kalus hasil induksi disubkultur pada medium MS dengan penambahan NAA dan kinetin masing-masing $2 \cdot 10^{-5}$ M dan $5 \cdot 10^{-5}$ M. Selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dan anatomi terhadap kalus hasil subkultur yang berumur 0,24, 28, 32 dan 36 hari. Pengamatan anatomi dilakukan dengan metode paraffin. Pada pengamatan morfologi diketahui bahwa tunas terbentuk pada hari ke 28 subkultur, diawali dengan pembentukan nodul berwarna hijau. Nodul berwarna putih yang kemungkinan merupakan sel embriogenik juga ditemukan pada kalus dengan usia subkultur 36 hari. Pada pengamatan anatomi diketahui bahwa jaringan kalus tidak homogen, terdiri dari sel meristematis, sel parenkim dan ditemukan pula elemen trakheal. Pembentukan tunas diawali oleh pembelahan sel pada area meristematis yang membentuk meristemoid dan kemudian berkembang menjadi kubah meristem yang dapat membentuk primordial daun. Hasil penelitian menunjukkan pembentukan embriogenesis somatik yang ditunjukkan dengan ditemukannya massa sel yang menyerupai fase globular, massa sel fase jantung, dan tahap kotiledon.

Kata kunci : *Catharanthus roseous*, anatomi kalus, organogenesis, embrio somatik

I. Pendahuluan

Catharanthus roseous (L). G. Don adalah anggota suku Apocynaceae (Lingga, 2005), di Indonesia lebih akrab dengan nama tapak dara (Sutomo, 2006). *C. roseous* merupakan tanaman semak dengan bunganya yang beraneka warna dan indah. *C. roseous* biasanya dimanfaatkan sebagai tanaman hias namun *C. roseous* ternyata memiliki khasiat obat untuk beberapa penyakit (Peraman, 1999). Hampir seluruh bagian tanaman *C. roseous* bermanfaat untuk kesehatan (Sutomo, 2006). *C. roseous* mengandung sedikitnya 70 macam alkaloid (Lingga, 2005), diantaranya adalah *vincristin*, *vinblastin*, *catharanthine*, *lochnerine*, *vindolin*, *vindolinin*, *tetrahidroalastoinin*, *leurisine*, flavonoida, ajmalisin, dll. Senyawa yang terkandung pada *C. roseous* ini ampuh melawan kanker, menurunkan kadar gula bagi penderita diabetes mellitus (Lingga, 2005), meningkatkan

ovulasi bagi wanita (Peraman, 1999), menurunkan tekanan darah (Fitriani, 2003), dan menyembuhkan beberapa penyakit lainnya. Dengan manfaat yang cukup besar, banyak orang yang melakukan pembudidayaan dan perbanyakan tanaman *C. roseous*.

Perbanyakan tanaman dapat dilakukan dengan pembenihan, stek, atau dengan kultur jaringan tumbuhan yang mulai marak akhir-akhir ini. Untuk mendapatkan tanaman utuh dengan kultur jaringan tumbuhan dapat melalui dua cara yaitu organogenesis dan embriogenesis somatik (Karim, 2006), secara langsung atau tak langsung melalui pembentukan kalus terlebih dahulu (George & Sherington, 1984). Tidak begitu banyak penelitian atau literatur mengenai perbanyakan tanaman *C. roseous* dengan kultur jaringan tumbuhan terutama mengenai perbanyakan *C. roseous* secara tak langsung khususnya mengenai anatominya. Perbanyakan melalui pembentukan kalus terlebih dahulu cukup menguntungkan. Kalus tersusun oleh jaringan meristematis yang dapat diarahkan untuk pembentukan organ, embrio atau kalus yang menghasilkan metabolit sekunder jika didukung oleh nutrisi, kombinasi zat pengatur tumbuh dan faktor lingkungan yang sesuai (George & Sherington, 1984).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana anatomi kalus dari eksplan daun yang sedang mengalami morfogenesis. Hasil penelitian ini pun dapat mengidentifikasi medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan akan mengarahkan kalus pada organogenesis atau embriogenesis somatik. Hasil penelitian ini dapat dijadikan landasan untuk pemilihan metode perbanyakan *C. roseous* dan memberikan informasi dasar yang mendukung keilmuan pada bidang kultur jaringan khususnya mengenai anatomi kalus *C. roseous* secara *in vitro*.

II. Metode Penelitian

1. Induksi Kalus dan Subkultur Kalus yang Berpotensi untuk Organogenesis

Eksplan yang digunakan adalah daun *C. roseous* muda, daun pertama sampai daun ketiga dari apeks pucuk. Medium yang digunakan untuk menginduksi kalus dan medium subkultur kalus yang berpotensi untuk organogenesis yang digunakan adalah medium padat MS (Murashige-Skoog) dengan penambahan sukrosa 3% dan agar 0,8%. Zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus adalah 10^{-5} M 2,4-D (2,4-Diclorophenoksiacetic acid) dan 10^{-6} M kinetin, sedangkan untuk subkultur kalus yang berpotensi untuk organogenesis ditambahkan $2 \cdot 10^{-5}$ M NAA (Naphtalena acetic acid) dan $5 \cdot 10^{-5}$ M kinetin. pH medium diatur sampai 5,8. Medium MS tersebut kemudian disterilisasi dengan autoclave (Fitriani, *et al.*, 1998)

Daun *C. roseous* yang akan dijadikan eksplan, disterilisasi dengan klorox 10%, kemudian ditanam pada medium MS induksi kalus. Setelah penanaman, dilakukan inkubasi selama 8 minggu pada ruangan inkubasi dengan penyinaran berupa cahaya putih. Kalus yang telah terbentuk selama 8 minggu disubkultur pada media MS kalus yang berpotensi untuk organogenesis, kemudian dilakukan inkubasi.

2. Pengamatan Morfologi dan Anatomi

Pengamatan dilakukan pada usia subkultur kalus 0, 24, 28, 32 dan 36 hari. Maksud dipilihnya kalus dengan usia 0 hari subkultur bertujuan untuk melihat anatomi kalus yang belum diinduksi membentuk organ tertentu, sedangkan alasan dipilihnya kalus dengan usia subkultur 24 hari sampai 36 hari dengan interval waktu 4 hari dikarenakan pada usia subkultur tersebut ditemukan adanya perubahan warna dan tekstur kalus serta terbentuk tunas pucuk.

Setelah pengamatan morfologi dilakukan, kalus yang akan diamati anatominya dibuat preparat awetan. Kalus tersebut difiksasi dengan FAA 50, diaspirasi kemudian didehidrasi dengan serial Johansen. Selanjutnya, embedding dilakukan menggunakan paraffin, dan mikrotom digunakan untuk penyayatan blok paraffin. Blok paraffin disayat setebal 12 μm . Pewarna yang digunakan adalah pewarna Hemalum dengan menggunakan metode pewarnaan Hemalum-Meyer (Sass, 1958). Setelah preperat awetan dibuat, anatomi kalus diamati dengan mikroskop cahaya elektrik dan didokumentasikan dengan kamera digital.

III. Hasil dan Pembahasan

1. Morfologi Kalus *Catharanthus roseous* (L). G. Don

Kalus yang terbentuk setelah 8 minggu bertekstur sangat meremah dan berwarna putih-krem, eksplan sudah hampir tidak terlihat lagi (Gambar 1.A). Hal tersebut terjadi kemungkinan karena kesesuaian antara medium, zat pengatur tumbuh yang digunakan dengan faktor lingkungan. Penggunaan medium MS dengan penambahan 2,4-D dengan konsentrasi lebih tinggi daripada konsentrasi kinetin dapat menginduksi proliferasi kalus. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Murashige & Skoog (1962 dalam Soh & Bhojwani. 1999), penggunaan medium MS dapat menginduksi proliferasi kalus, dan pernyataan George & Sherington (1984), pada konsentrasi auksin yang lebih tinggi atau sebanding dengan konsentrasi sitokinin, dapat menginduksi jaringan untuk membentuk kalus.

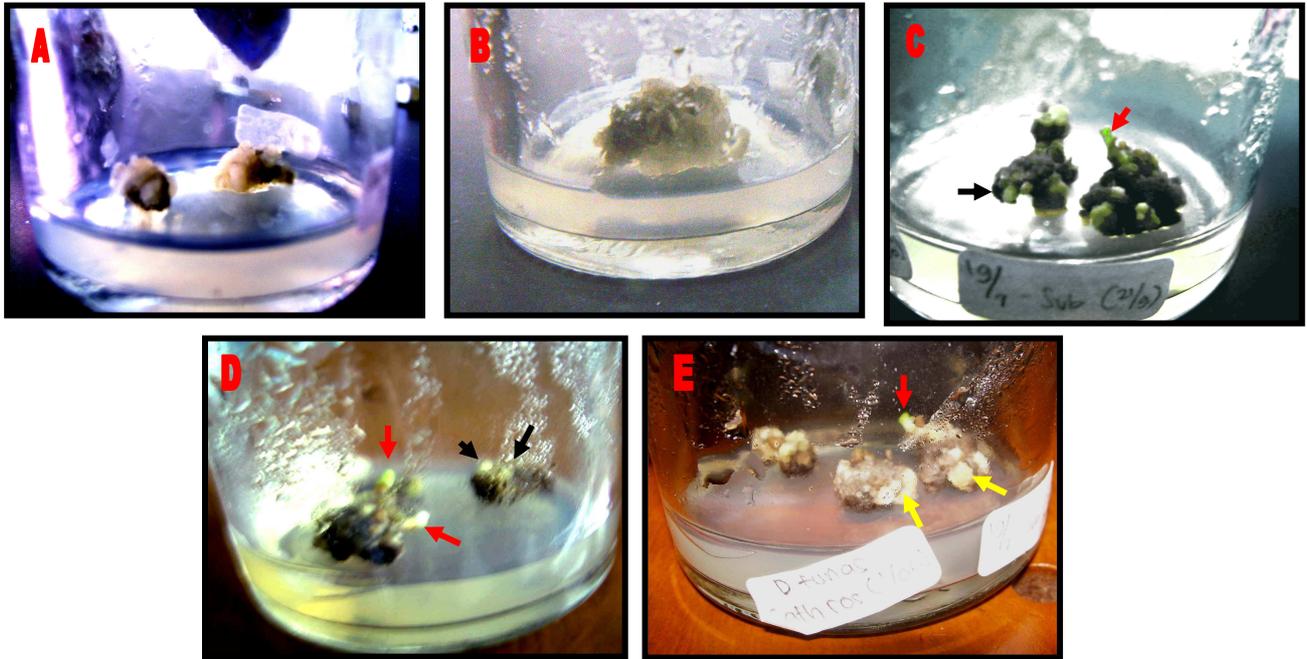
Perubahan morfologi kalus yang disubkultur pada medium MS yang berpotensi untuk organogenesis, mulai tampak pada kalus dengan usia subkultur 24 hari. Pada kalus

dengan usia subkultur 24 hari yang diamati, terlihat perubahan warna kalus yang semula berwarna putih-krem menjadi berwarna putih kehijauan (Gambar 1.B). Perubahan warna kalus menjadi putih kehijauan, kemungkinan pada sel kalus sudah mulai terbentuk klorofil. Pembentukan klorofil kemungkinan terjadi akibat adanya interaksi NAA dan kinetin yang ditambahkan pada medium serta pemberian cahaya putih yang terus menerus. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan George & Sherrington (1984), bahwa cahaya putih dapat merangsang pembentukan kalus dan organogenesis dalam kultur jaringan tumbuhan. Pada pengamatan kalus dengan usia subkultur 28 hari dan 32 hari, kalus tidak lagi bertekstur meremah, namun lebih kompak ditandai dengan terbentuknya nodul berwarna hijau, selain itu tunas pucuk pun sudah terbentuk (Gambar 1.C & 1.D). Pada pengamatan kalus dengan usia subkultur 36 hari, tunas pucuk terbentuk dan ditemukan pula kalus yang kompak membentuk nodul berwarna putih (Gambar 1.E). Ditemukannya nodul berwarna putih dan bergranul, diduga merupakan sel-sel embriogenik. Menurut Fambrini, *et al.* (2003) tekstur kalus berwarna putih dan bergranul merupakan masa sel embriogenik. Terjadi embriogenesis somatik pada medium subkultur kalus yang berpotensi untuk organogenesis ini kemungkinan terjadi karena kebutuhan nutrisi yang hampir sama dan dapat terpenuhi dengan penggunaan medium MS. Zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan untuk terjadinya organogenesis dan embriogenesis somatik juga kemungkinan hampir sama yaitu 2,4-D, NAA dan kinetin.

2. Anatomi dan proliferasi kalus

Dari pengamatan kalus secara anatomi diketahui bahwa proliferasi jaringan kalus diawali dengan pembelahan sel yang terletak pada bagian perifer jaringan kalus, bentuknya isodiametris, sitoplasmanya pekat dan inti selnya besar, hal tersebut ditandai dengan penyerapan warna yang cukup banyak oleh sitoplasma dan inti. Sel-sel tersebut melakukan pembelahan secara terus menerus ke arah luar dan menonjol ke permukaan jaringan kalus (Gambar 2.A). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Thorpe & Murashige (1970 dalam Bhojwani & Soh, 1999) bahwa sel yang isodiametrik, dengan sitoplasma yang pekat serta perbandingan antara sitoplasma dan inti yang tinggi dan hampir sama, memperlihatkan bahwa sel memiliki aktivitas mitosis dan bersifat meristematis. Aktivitas pembelahan sel yang terjadi secara terus menerus pada sel di daerah perifer (Gambar 2.A) akan menghasilkan penambahan sel baru pada jaringan kalus (Gambar 2.B), namun pada waktu dan kondisi tertentu sel yang berada di daerah sebelah dalam jaringan kalus akan mengalami diferensiasi membentuk sel parenkim (Gambar 2.C). Pada kelompok sel parenkim yang ditemukan, dapat dilihat

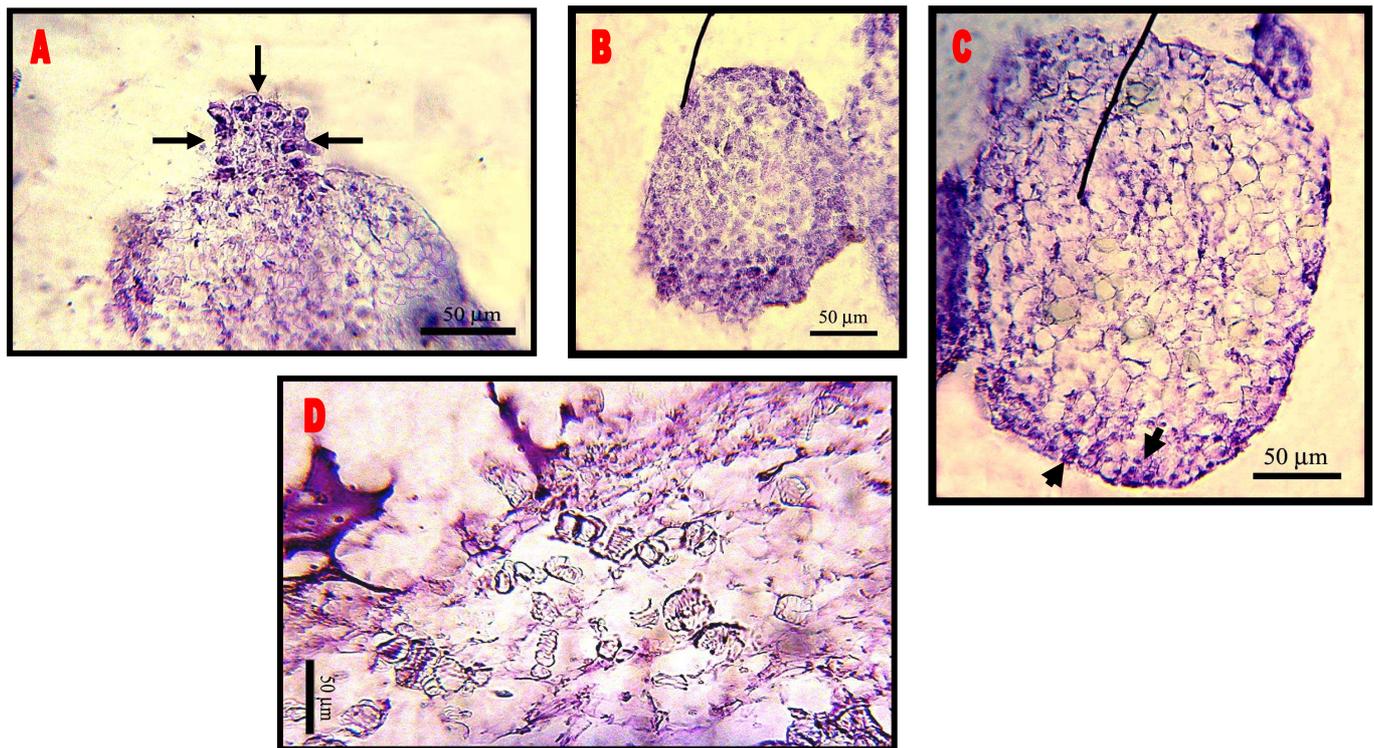
adanya sel-sel kalus dengan sitoplasma yang lebih pekat dan inti yang besar ditandai dengan penyerapan warna yang cukup banyak di daerah perifer (Gambar 2.C (panah)). Dari hal tersebut dapat diketahui bahwa sel pada bagian perifer kelompok sel parenkim yang terbentuk, bersifat lebih meristematik dan masih dapat terus melakukan pembelahan



Gambar 1. A. Kalus pada medium MS induksi kalus dengan usia 8 minggu B. Kalus dengan usia subkultur 24 hari C. Kalus dengan usia subkultur 28 hari D. Kalus dengan usia subkultur 32 hari E. Kalus dengan usia subkultur 36 hari (ket: panah merah: tunas pucuk, panah hitam: nodul hijau, panah kuning: nodul putih)

sel dan proliferasi sel kalus dapat terus terjadi selama lingkungan dan medium masih sesuai, hal tersebut sesuai dengan laporan Lablin, *et al.* (1991 dalam Mello, 2001)

Pada jaringan kalus ditemukan pula kelompok sel yang tidak menyerap zat warna, sehingga terlihat mengkilat. Dinding sel tersebut mengalami penebalan sekunder dan jelas terlihat bahwa dinding sekunder ini menebal dengan tidak merata, membentuk struktur yang menyerupai spiral dan sepertinya sel tersebut tidak memiliki protoplasma (Gambar 2.D). Menurut Hidayat (1995) sel dengan karakteristik tersebut merupakan sel penyusun sistem pembuluh xilem yang disebut unsur trakheal atau elemen trakheal. Menurut penjelasan Camus (1949 dalam Bhojwani & Razdan, 1983) diferensiasi fasikuler terjadi akibat pengaruh hormon auksin dan terbentuknya elemen fasikuler berasal dari sel-sel parenkim yang terinduksi auksin.



Gambar 2. A. Sel kalus pada daerah perifer yang aktif membelah dan membentuk tonjolan B. Perluasan daerah jaringan kalus akibat aktivitas mitosis sel yang tinggi C. Kelompok sel parenkim pada jaringan kalus dan pada bagian perifer terdapat sel-sel yang lebih meristematik (tanda panah) D. Kelompok elemen tracheal

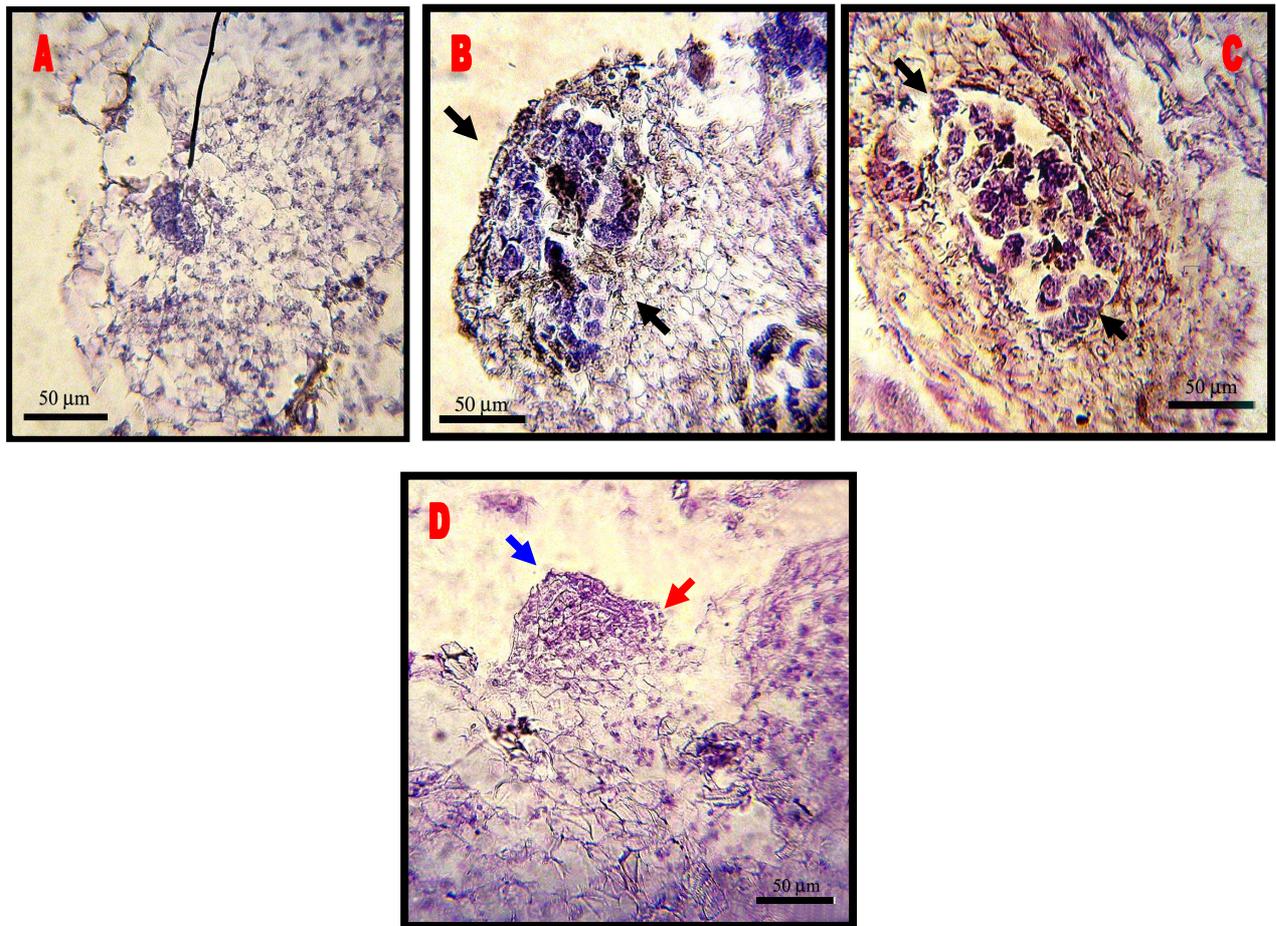
3. Anatomi dan Pembentukan Tunas Pucuk

Pada jaringan kalus yang diamati, ditemukan kelompok sel yang berada didekat daerah perifer dengan karakteristik yang berbeda dengan sel-sel disekelilingnya. Sel tersebut berukuran lebih kecil, bentuknya isodiametrik, sitoplasmanya pekat dan inti sel terlihat jelas serta cukup besar. Dari karakteristik sel yang demikian dapat diketahui bahwa sel aktif melakukan pembelahan (Gambar 3.A). Menurut Mello, *et al.* (2001) daerah yang ditempati oleh sel-sel kalus dengan aktivitas pembelahan yang tinggi disebut area meristematik. Menurut Thorpe & Murashige (1970 dalam Soh & Bhojwani, 1999) pada area meristematik, sel membelah ke segala arah dan area meristematik tersebut dapat terletak secara acak pada jaringan kalus.

Selain area meristematik, ditemukan pula sel yang berkumpul dan membentuk masa sel yang berbentuk elips di daerah perifer dan membentuk tonjolan ke arah luar. Sel penyusunnya mengandung sitoplasma yang pekat, selnya berbentuk isodiametrik dan vakuola tidak terlihat. Karakteristik sel tersebut memperlihatkan pula bahwa sel aktif melakukan pembelahan (Gambar 3.B). Menurut Ross, *et al.* (1973 dalam Soh & Bhojwani 1999) sel –sel yang terkumpul menjadi masa sel yang berbentuk bulat, sel penyusunnya memiliki vakuola yang berukuran sangat kecil, dan intinya pun cukup besar

jika dibandingkan dengan sitoplasma, massa sel tersebut disebut meristemoid. Menurut pernyataan Thorpe & Murashige (1970 dalam Soh & Bhojwani, 1999) area meristematik dapat membentuk pusat meristematik (*meristematic centre*) atau dapat pula disebut meristemoid. Menurut Thorpe (1980 dalam Bhojwani & Soh, 1999) meskipun meristemoid bersifat apolar, dan selnya seragam, namun dapat dilihat bahwa aktivitas pembelahan mengarah pada pembentukan primordial yang bersifat unipolar.

Pada jaringan kalus yang diamati ternyata ditemukan pula meristemoid yang dibentuk di sebelah dalam daerah kalus (Gambar 3.C). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Bhojwani & Razdan (1983), meristemoid dapat terletak secara acak pada jaringan kalus, dapat dibentuk di daerah perifer maupun di daerah sebelah dalam. Pada jaringan kalus yang diamati, ditemukan pula kelompok sel di daerah perifer yang menyerupai struktur meristem apeks pucuk. Kelompok sel tersebut memiliki bagian puncak yang berbentuk seperti kubah. Sel penyusunnya memiliki sitoplasma yang pekat dan menyerap warna cukup banyak (Gambar 3.D). Adanya struktur masa sel yang menyerupai meristem apeks pucuk tersebut kemungkinan merupakan perkembangan lebih lanjut dari meristemoid. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Mello, *et al.* (2001) tentang organogenesis kalus *Curcuma zeodaria* yang menyatakan bahwa meristemoid akan mengalami pemanjangan secara vertikal dan membentuk kelompok sel yang mirip primordial tunas pucuk. Menurut Fambrini, *et al.* (2003) kelompok sel bagian puncak yang berbentuk kubah disebut sebagai kubah meristematik atau *meristematic dome*. pada daerah bagian bawah kubah meristematik ditemukan banyak elemen trakheal, yang diduga berhubungan dengan pembentukan tunas pucuk seperti yang dipaparkan oleh Bhojwani & Razdan (1983), yang menyatakan bahwa diferensiasi organogenesis dari endosperm terjadi jika terdapat diferensiasi trakeid pada kultur kalus. Pada bagian bahu kanan kubah meristematik (Gambar 4.12 (panah merah)) yang ditemukan, terbentuk kumpulan sel yang membuat tonjolan yang kemungkinan akan mengarah pada pembentukan primordial daun. Hal tersebut juga ditemukan oleh Fambrini, *et al.* (2003) pada kultur kalus Kihada yang mengalami organogenesis membentuk tunas pucuk.



Gambar 3. A. Area meristematik (ujung batang penunjuk) B. Meristemoid pada daerah perifer jaringan kalus (panah) C. Meristemoid pada daerah sebelah dalam jaringan kalus (panah) D. Kubah meristematik (panah biru); Inisial daun (panah merah)

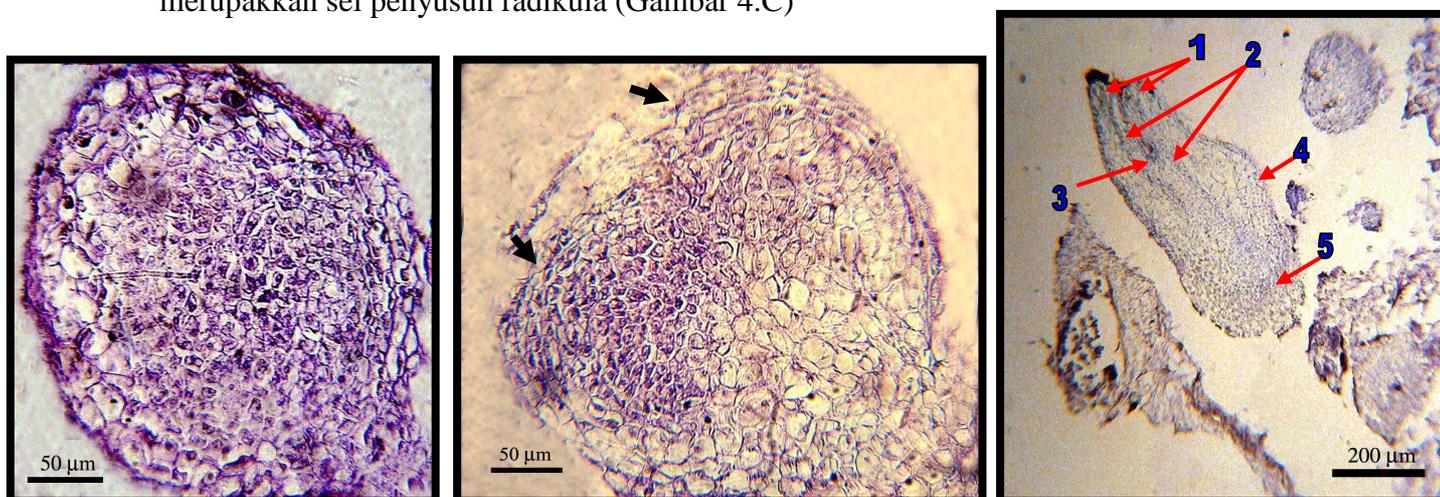
4. Anatomi dan Pembentukan Embrio Somatik

Tahapan yang dilalui dalam pembentukan embrio somatik adalah fase globular, fase jantung, fase torpedo dan fase kotiledon (Bhojwani & Bhatnagar, 1974). Pada penelitian ini teridentifikasi tiga fase yang mengarah pada pembentukan embrio somatik. Pada pengamatan anatomi kalus ditemukan masa kalus yang menyerupai fase globular atau *globular like structure*. Pada fase tersebut, sel-sel berkumpul dan membentuk massa sel dengan struktur bulat (Gambar 4.A).

Selain massa sel yang menyerupai fase globular, ditemukan pula masa sel yang menyerupai struktur fase jantung. Pada fase ini terlihat adanya pendataran dan penonjolan pada kedua sisi daerah terminal, sehingga massa sel membentuk struktur seperti jantung. Penonjolan pada sisi kanan dan kiri terjadi akibat pembelahan sel yang lebih cepat pada daerah tersebut. Daerah penonjolan disusun oleh sel yang memiliki sifat meristematik, ditandai dengan sel bersitoplasma pekat dan inti yang jelas dengan penyerapan warna

yang cukup banyak (Gambar 4.B). Sel meristematik tersebut kemudian akan berkembang membentuk kotiledon.

Tahapan embrio selanjutnya adalah tahapan kotiledon. Pada tahap embrio ini, dua buah kotiledon sudah terbentuk. Pada daerah diantara kotiledon, terlihat kelompok sel yang ukurannya lebih kecil dibandingkan dengan ukuran sel parenkim disekitarnya, intinya cukup besar, selain itu sitoplasmanya pun cukup pekat dengan penyerapan warna yang cukup banyak, kelompok sel tersebut adalah sel meristem apeks pucuk. Pada embrio ditemukan juga untaian sel-sel prokambium yang menghubungkan kotiledon dengan bagian basal embrio. Terdapat pula sel-sel meristematik pada bagian basal embrio yang merupakan sel penyusun radikula (Gambar 4.C)



Gambar 4. A. Massa sel menyerupai struktur fase globular (*Globular-like structure*) B. Massa sel yang menyerupai fase jantung dengan adanya penonjolan pada kedua sisi (panah) C. Embrio fase kotiledon (Keterangan : 1. Kotiledon; 2. Prokambium; 3. Meristem apeks pucuk; 4. Hipokotil; 5. Radikula)

IV. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diperoleh beberapa kesimpulan yaitu : Eksplan daun *C. Roseus* (L) G. Don yang ditanam pada medium MS dengan penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin masing-masing $10^{-5}M$ dan $10^{-6}M$, dapat menginduksi pembentukan dan proliferasi kalus. Medium subkultur kalus berupa medium MS dengan penambahan NAA dan kinetin masing-masing $2.10^{-5}M$ dan $5.10^{-5}M$ dapat menginduksi terjadinya organogenesis tunas pucuk dan embriogenesis somatik.

Pengamatan secara morfologi menunjukkan, usia subkultur kalus 24 hari dapat menghasilkan kalus berwarna hijau. Nodul berwarna hijau yang diduga akan membentuk tunas pucuk dan tunas pucuk terbentuk pada usia subkultur 28,32 dan 36 hari. Pada kalus

dengan usia subkultur 36 hari terlihat nodul berwarna putih yang diduga merupakan bagian dari kalus embriogenik.

Pengamatan anatomi menunjukkan, sel penyusun jaringan tidak homogen yaitu daerah sebelah luar dibangun oleh sel isodiametrik dengan sitoplasma padat dan susunan sangat rapat. Sel meristematis tersebut terus membelah dan membentuk daerah kalus baru. Daerah sebelah dalam kalus dibangun oleh sel parenkim dengan ukuran sel yang besar, bervakuola dan susunannya tidak terlalu rapat. Sel parenkim tersebut merupakan hasil diferensiasi sel meristematis. Pada jaringan kalus ditemukan pula elemen trakeal yang dibentuk oleh sel parenkim.

Tunas pucuk terbentuk dari sel kalus dengan aktivitas pembelahan yang tinggi dan membentuk daerah meristematis. Daerah meristematis akan membentuk meristemoid yang membentuk massa sel yang membulat yang kemudian berkembang menjadi kubah meristemoid. Kubah meristemoid tersebut kemudian dapat membentuk inisial daun yang dapat berkembang menjadi primordial daun. Kubah meristematis dan primordial daun akan berkembang menjadi tunas pucuk.

Dalam pembentukan embrio somatik, ditemukan massa sel yang mirip fase globular (*globular like structure*), massa sel yang mirip fase jantung (*heart shape like structure*) dan tahap kotiledon. Pada penelitian ini, tunas pucuk kemungkinan dapat dibentuk dari embriogenesis somatik dan organogenesis tunas pucuk.

DAFTAR PUSTAKA

- Admin. (2006). "Empat Bersaudara Warisan Pengacara". *Trubus* (Edisi 20 Pebruari 2006).
- Bhojwani, S. S. & Bhatnagar, S.P. (1974). *The Embryologi of Angiospermae*. New Delhi. Vikas Publishing House PVT .LTD.
- Bhojwani, S. & S. Soh, W. Y. (1999). *Morphogenesis in Plant Tissue Culture*. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher.
- Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. (1983). *Plant Tissue Culture*. Netherland. Elsevier Science Publisher B.V.
- Bhojwani, S. S. & Soh, W. Y. (2001). *Current Trends in the Embryology of Angiospermae*. Dordrecht . Kluwer Academic Publisher.
- Burritt, D. J. & Leung, W.M. (1996). *Organogenesis in cultured petiole explants of Begonia × erythrophylla: the timing and specificity of the inductive stimuli*.

(Online). Tersedia: <http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/47/4/557>. (diakses 15 Januari 2007).

Esau, K. (1977). *Anatomy of Seed Plant 2nd Edition*. Canada. John Wiley & Sons, inc.

Fambrini, M., Ciolini, G., Conti, A., Michelotti, V., Pugliesi, C. (2003). *Origin and Development In Vitro of Shoot Buds and Somatic Embryos from Intact Roots of Helianthus annuus x H. tuberosus*. (Online). Tersedia: ' <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/92/1/.org/145.pdf>.(diakses 15 Januari 2007).

Fitriani, A., Anggraeni, S., Diana, S., Purwianingsih, W. (1998). *Studi Awal Pengadaan Kalus Catharanthus roseus (L.) G. Don yang Berpotensi untuk organogenesis dan Produksi Metabolit Sekunder dalam Menunjang Praktikum Kultur Jaringan di Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Bandung*. Laporan dana rutin UPI Bandung. Tidak diterbitkan.

Fitriani, A. (2003). *Kandungan Ajmalisin pada Kultur Kalus Catharanthus roseus (L.) G. Don setelah Dielisisasi Homogenat Jamur Pythium aphanidermatum Edson Fitzp.* (Online). Tersedia : http://tumoutou.net/6_sem2_023/any_fitriani.htm (diakses 15 Desember 2006)

George, E.F & Sherrington, G. (1984). *Plant Propagation and Tissue Culture Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetic Ltd. England.

Hendaryono, D. P. S. & Wijayani, A. (1994). *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta. Kanisius

Hidayat, E. (1995). *Anatomi Tumbuhan berbiji*. Bandung. ITB

Karim, Z. M., Yokota, S., Azad, M., Eizawa, J., Ishiguri, F., Lizuka, K. (2006). *Relationship between starch accumulation and organ development at the different growth stages of callus in Kihada (Phellodendron amurense Rupr.)*. (Online). Tersedia : http://www.jspcmb.jp/pbcontents/pdf/pb23_2/23_239.pdf. (diakses 27 Januari 2007).

Lingga, L. (2005). *Si Tapak dara yang Menawan*. Tangerang. AgroMedia Pustaka.

Meesawat, U. & Kanchanapoom, K. (2002). *In Vitro Plant Regeneration through Embryogenesis and Organogenesis from Callus Culture of Pigeon Orchid (Dendrobium crumenatum Sw)*. (Online). Tersedia: http://www.tijsat.tu.ac.th/issues/2002/no2/2002_V7_No2_2.PDF. (diakses 30 Januari 2007).

Mello, M. O., Mello, M., Appezato-da-Gloria, B. (2001). *Histological Analysis of the Callogenesis and Organogenesis from Root Segments of Curcuma zedoaria Roscoe*. (Online). Tersedia: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v44n2/a14v44n2.pdf>. (diakses 30 Januari).

- Padua, L. S., Bunyapraphatsara, N., Lemmens, R.H.M.J. (1999). *Plant Resources of South – East Asia 12 (1) Medicinal and Poisonous Plants 1*. Leiden. Backhuys Publisher.
- Peraman, Z. A. (1999). *Tumbuhan dan khasiat obatnya.*, (Online). Tersedia : <http://budiboga.blogspot.com/2006/05/tapak-dara-bunga-cantik-pencegah.html> (diakses 27 Januari 2007)
- Pierik, R. L. M (1987). *In vitro Culture of Higher Plants*. Doedrecht. Martinus Nijhoff Publisher.
- Purnamaningsih, R. (2002). *Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya.* (Online). Tersedia : http://www.indobiogen.or.id/terbitan/pdf/agrobio_5_2_51-58.pdf. (diakses 15 Januari 2007).
- Sass, J. E. (1958). *Botanical Microtechnic*. USA. The Iowa State College Press.
- Sudarsono, Ratnawati, Budiwati. (2003). *Common Text Book Taksonomi Tumbuhan Tinggi*. Yogyakarta. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Sutomo, B. (2006). Tapak dara Si Pencegah Kanker. (Online). Tersedia : <http://budiboga.blogspot.com/2006/05/tapak-dara-bunga-cantik-pencegah.html>. (Diakses 27 Januari 2007).