

PERANAN BIOTEKNOLOGI DAN MIKROBA ENDOFIT DALAM PENGEMBANGAN OBAT HERBAL

Maksum Radji

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi

Departemen Farmasi, FMIPA-UI, Kampus UI Depok 16424

ABSTRACT

Plants have been the chief source of compounds of medicine for thousand of years. Plants are also the source of many medicines for the majority of the world's population. The role of biotechnology is very important for multiplying, conserving the spesies, and enhancing the production of secondary metabolites. Endophytes are microbes that inhabit plants are currently considered to be a wellspring of novel secondary metabolites offering the potensial for medical and industrial exploitation. Natural products from various endophytic microbes have been investigated. Some examples of natural products observed from endophytic microbes are antibiotics, anti-viral compounds, anticancers, antimalarial compounds, antioxidants, antidiabetics, and immunosuppressive compounds.

Key words : secondary metabolites, endophytes, genetic engineering, tissue cultures.

Pendahuluan

Tanaman, telah lama kita ketahui merupakan salah satu sumber daya yang sangat penting dalam upaya pengobatan dan upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Bahkan sampai saat inipun menurut perkiraan badan kesehatan dunia (WHO), 80% penduduk dunia masih menggantungkan dirinya pada pengobatan tradisional termasuk penggunaan obat yang berasal dari tanaman. Sampai saat ini seperempat dari obat-obat modern yang beredar

di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan dari tanaman. Sebagai contoh misalnya aspirin adalah analgesik yang paling populer yang diisolasi dari tanaman *Salix* dan *Spiraea*, demikian pula paclitaxel dan vinblastine merupakan obat antikanker yang sangat potensial yang berasal dari tanaman (Pezzuto J, 1996).

Indonesia yang dikenal sebagai salah satu dari 7 negara yang keanekaragaman hayatinya terbesar ke dua setelah Brazil, tentu sangat potensial dalam mengembangkan

obat herbal yang berbasis pada tanaman obat kita sendiri. Lebih dari 1000 spesies tumbuhan dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat. Tumbuhan tersebut menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur molekul dan aktivitas biologik yang beraneka ragam, memiliki potensi yang sangat baik untuk dikembangkan menjadi obat berbagai penyakit.

Permasalahannya adalah bagaimana menjaga tingkat produksi obat herbal tersebut dengan bahan baku obat herbal yang terbatas karena sebagian besar bahan baku obat herbal diambil dari tanaman induknya. Sehingga di khawatirkan bahwa sumberdaya hayati ini akan musnah disebabkan karena adanya kendala dalam budidayanya. Bahkan disinyalir bahwa bahan obat herbal yang diproduksi dan diedarkan di Indonesia saat ini sebagian besar bahan bakunya sudah mulai diimpor dari beberapa negara lain.

Peranan bioteknologi dalam budidaya, multiplikasi, rekayasa genetika, dan skrining mikroba endofit yang dapat menghasilkan metabolit sekunder sangat penting dalam rangka pengembangan bahan obat yang berasal dari tanaman obat ini. Bahkan dengan kemajuan yang pesat dalam bidang bioteknologi ini telah dapat dihasilkan beberapa jenis tanaman transgenik yang dapat memproduksi vaksin rekombinan (Maksum R. 2004).

Dalam tinjauan pustaka ini akan dibahas tentang perkembangan dan

pemanfaatan teknik-teknik bioteknologi antara lain seperti teknik kultur jaringan, *in-vitro* propagasi, rekayasa genetika, dan peran mikroba endofit dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder dari berbagai tanaman obat tersebut.

Kultur Jaringan

Tumbuhan memiliki sifat *totipotency*, artinya perkembangbiakannya tidak hanya dari sel telur atau sperma saja akan tetapi juga bisa berasal dari sel-sel akar, daun, batang, dan sel tumbuhan lainnya.

Bila kita menggunakan sebuah sel yang berasal dari tumbuhan maka badan tumbuhan keseluruhannya dapat ditumbuhkan kembali. Karena adanya sifat inilah, dengan teknik-teknik yang telah lama dikenal seperti setek, okulasi, cangkok, serta dengan metode kultur jaringan, perbanyakan klon tumbuhan dapat dilakukan tanpa batas.

Propagasi secara *in vitro* dari tanaman obat telah dilakukan untuk menghasilkan obat ataupun bahan obat yang berkualitas tinggi (Murch SJ., et.al.2000). Disamping itu teknik mikropropagasi juga telah dikembangkan dan digunakan untuk beberapa tanaman obat, karena terbukti multiplikasinya lebih cepat, dan aman. Regenerasi tanaman dengan tehnik kultur jaringan ini terbukti menghasilkan bahan kimia yang sama dengan tanaman induknya. Beberapa diantaranya yang telah berhasil dilakukan terhadap tanaman obat

seperti *Cinchona ledgeriana*, *Digitalis spp*, *Rehmania glutinosa*, *Rauwolfia serpentina*, *Isoplexis canariensis*, dll. (Paek, KY. et. al. 1995, Roy SK., et. al. 1994., Perez BP., et. al. 2002).

Penambahan senyawa auxin dan cytokinin dalam media perbenihan kultur jaringan ternyata mampu mempercepat multiplikasi sel jaringan beberapa tumbuhan obat (Rout Gr, et. al. 1999, Tsay HS, et. al. 1989). Demikian pula penambahan 6-benzylaminopurine (BA) dengan konsentrasi tinggi (1-5 ppm), dapat mempercepat pertumbuhan jaringan meristem dan meningkatkan produksi alkaloid dari *Atropa belladonna* (Benyamin BD., et. al. 1987). Penambahan 1-5 mg/l kinetin mampu meningkatkan proliferasi sel *Picorrhiza kurroa* (Lai N., et. al. 1996), dan *Plantago ovata* (Barna KS. et. al. 1988), sedangkan penambahan 2,2 uM thidiazuron dapat mempercepat proliferasi sel *Nothapodytes foetida* (Rai VR et. al. 2002). Demikian pula dengan penambahan 5 uM indole-3-acetic acid (IAA), dapat meningkatkan kecepatan tumbuh dari sel jaringan *Zingiber spp*. (Faria RT. 1995).

Induksi pertumbuhan *callus* dengan berbagai jenis zat yang bersifat sebagai regulator pertumbuhan yang dimasukkan ke dalam medium pertumbuhannya juga telah banyak dilakukan. Penambahan auxin dan cytokinin dalam jumlah yang tepat terbukti dapat meningkatkan regenerasi kultur dari *callus Plumbago rosea* (Satheesh KK., et. al. 1988), dan regenerasi *callus* ini telah berhasil

dilakukan dari berbagai tambahan obat yang berasal dari berbagai eksplan tumbuhan misalnya *callus* yang berasal dari daun, cabang, akar, umbi, bunga, dan bagian lainnya dari tumbuhan. Beberapa diantaranya adalah regenerasi *callus Hyoscyamus mutius* (Basu P. et. el. 1996), *Solanum melongena* (Sharma P., et. al. 1995), *Chephaelis ipecacuanha* (Rout GR. et. al. 1992), *Psoralea corylifolia* (Saxena C. et. al. 1997), *Zingiber officinale* (Rout GR, et. al. 1997), *Mentha arvensis* (Shasany AK., et. al. 1998), *Centella asiatica* (Patra A., et. al. 1998), *Plumbago Zeylanica* (Rout GR., et. al. 1999), *Solanum laciniatum* (Okslar V., et. al. 2002), *Echinacea pallida* (Koroach AR., et. al. 2003), dan *Lepidium sativum* (Pande D., et. al. 2002).

Disamping regenerasi melalui sel *callus*, regenerasi tumbuhan obat melalui *somatic embryogenesis* juga telah banyak dilakukan. Teknik ini merupakan suatu proses dimana sel somatik yang diambil dari jaringan tumbuhan dapat diinduksi menjadi embrio dan dapat tumbuh menjadi tanaman utuh di dalam media perbenihan yang sesuai. Dalam berbagai percobaan yang telah dilakukan pengaturan zat tumbuh atau zat suplemen lainnya dapat mengatur percepatan dari *embryogenesis* tersebut untuk tujuan pembudidayaan tanaman obat (Arumugam N. et. al. 1990, Ghosh BE., et. al. 1991., Zhou J., et. al. 1994., Rout GR., et. al. 1995., Das P., et. al. 1999., Kumar A., 1992).

Kultur sel atau jaringan tanaman

obat yang telah didapat melalui regenerasi secara *in vitro* ini dapat disimpan dalam waktu yang lama pada temperatur rendah dalam nitrogen cair (-196° C). Beberapa tanaman obat telah dilakukan preservasinya dengan cara pembekuan sel kultur-nya antara lain tanaman obat yang menghasilkan alkaloid yang sangat penting seperti *Rauwolfia serpentina*, *Digitalis lanata*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus spp*, dll. Sistem preservasi beku (*cryopreservation*) ini dapat digunakan untuk tujuan penyimpanan berbagai jenis sel/jaringan, meristem, pollen, embrio, callus, ataupun protoplas, sehingga sangat bermanfaat untuk konservasi tanaman obat (Tripathi L., et.al. 2003).

Metabolit sekunder

Tanaman obat merupakan salah satu sumber bahan baku obat. Sebagian besar komponen kimia yang berasal dari tanaman yang digunakan sebagai obat atau bahan obat adalah merupakan metabolit sekunder. Secara *in vitro* produksi metabolit sekunder ini dapat dilakukan dengan teknik kultur jaringan (Deus B., et.al. 1982., Stafford A, 1986).

Produksi metabolit sekunder beberapa tanaman obat melalui kultur jaringan telah banyak dilakukan. Beberapa diantaranya adalah produksi solasodine yang diisolasi dari kultur *callus Solanum eleagnifolium* (Nigra HM., et.al.1987) dan alkaloid pyrrolidine dari kultur akar tanaman *Senecio spp*. (Toppel G., et.al. 1987).

Alkaloid *cephaelin* dan *emetine* dapat diisolasi dari kultur *callus* tanaman *Cephaelis ipecacuanha* (Jha S., et.al. 1988). Demikian juga dengan alkaloid-alkoloid penting lainnya seperti *quinoline* diisolasi dari kultur jaringan *Cinchona ledgeriana*, diosgenin dari kultur jaringan *Dioscorea deltoidea* (Ravishankar GA., et.al. 1991), beberapa enzim proteolitik dari kultur jaringan *Allium sativum* (Parisi M., et.al.2002), alkaloid cardenolide dari kultur *Digitalis lanata* (Pradel H., et.al.1997), alkaloid azadirachtin dari kultur jaringan *Azadirachta indica* (Srividya N., et.al 1998) dan lepidine dari kultur jaringan tanaman *Lepidium sativum* (Pande D., et.al.2002).

Untuk tujuan komersial telah dilakukan pengembangan produksi metabolit sekunder tanaman obat tersebut dengan sistem bioreaktor. Sistem bioreaktor ini dapat digunakan untuk kultur *embryogenic* ataupun *organogenic* dari berbagai spesies tanaman (Levin R., et.al. 1988, Preil W., et.al. 1988). Dari salah satu hasil percobaan yang menggunakan sistem bioreaktor ini dapat dihasilkan saponin sebesar 500 mg/L/hari dari bioreactor kultur jaringan akar pohon ginseng (Park JM., et.al.1992), dan produksi alkaloid ginsenoside dari kultur akar *Panax ginseng* dengan system bioreaktor berskala besar 1-10 ton (Hahn EJ., et.al. 2003). Teknik kultivasi bioreaktor ini juga telah berhasil dilakukan untuk memproduksi zat anti kanker dari beberapa spesies tanaman *Taxus*. Cara ini jauh lebih efisien jika dibandingkan

dengan cara-cara konvensional dimana untuk mendapatkan 1 kg komponen aktif taxol harus menebang 1 pohon *Taxus* yang kira-kira telah berumur 100 tahun (Muhlbah H.,1998).

Rekayasa Genetika

Kemajuan yang telah dicapai dalam bidang bioteknologi dan teknik DNA rekombinan telah membantu mempercepat dan meningkatkan berbagai penelitian menuju ke arah pemahaman tentang biosintesis dari metabolit sekunder. Berbagai penelitian telah berhasil mengidentifikasi beberapa enzim yang berperan penting dalam jalan metabolisme, dan telah berhasil dilakukan rekayasa dan manipulasi terhadap enzim-enzim tersebut. Teknik rekayasa genetika dengan melakukan transformasi genetik telah dilakukan untuk memanipulasi lebih dari 120 jenis spesies dari sekitar 35 famili tanaman menggunakan perantara bakteri *Agrobacterium* ataupun transformasi langsung (Birch RG., 1997).

Agrobacterium tumefaciens, dan *Agrobacterium rhizogenes*, merupakan bakteri gram-negatif yang terdapat di dalam tanah yang menyebabkan tumor *crown gall* dan *hairy root* pada tanaman. Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* mengandung megaplasmid yang berperan penting dalam induksi tumor tanaman yang diberi nama *Ti plasmid*. Selama proses infeksi, T-DNA yang merupakan

segmen penting dari *Ti plasmid* ditransfer ke dalam nukleus sel yang terinfeksi dan terintegrasi ke dalam kromosom hospesnya. Sedangkan bakteri *A. rhizogenes* dapat menginduksi proliferasi *multibranched* di tempat akar yang terinfeksi sehingga disebut dengan "hairy root". Melalui infeksi ini dapat ditransfer T-DNA yang dikenal dengan *root inducing plasmid (Ri plasmid)*, dan kemudian dapat terintegrasi ke dalam kromosom sel tanaman (Nester EW., et.al., 1984).

Kemampuan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, dan *A. rhizogenes* yang mampu masuk ke dalam nukleus dan berintegrasi ke dalam kromosom tanaman inilah yang dimanfaatkan oleh para peneliti bioteknologi untuk melakukan modifikasi secara genetik guna meningkatkan produksi metabolit sekunder tanaman obat, baik tanaman dikotil ataupun monokotil.

Transformasi genetik terhadap tumbuhan obat telah banyak yang berhasil dilakukan. Beberapa diantaranya adalah transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* terhadap tanaman transgenik *Azadirachta indica* yang mengandung rekombinan plasmid pTiA6 (Naina NS.,et.al 1989), *Atropa belladonna* (Cucu N.,et.al.2002), dan *Echinea purpurea* dan terbukti dapat meningkatkan komposisi alkaloid secara signifikan (Koroch AR.,et.al.2002). Demikian pula transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium rhizogenes* telah berhasil meningkatkan

produksi artemisin sebesar 4.8 mg/L, dari kultur sel *Artemisia annua* L. (Cai G., et.al. 1995), dan dapat meningkatkan produksi alkaloid puerarin dari kultur sel *Pueraria phaseoloides* (Shi HP., et.al. 2003). Berbagai jenis tanaman lain juga telah diteliti peningkatan kadar metabolit sekunder yang dihasilkannya melalui transformasi genetik dengan *Agrobacterium rhizogenes* antara lain adalah terhadap kultur sel/jaringan yang berasal dari tanaman *Aconitum heterophyllum* (Giri A., et.al. 1997), *Digitalis lanata* (Pradel H., et.al. 1997), *Papaver somniferum* L. (Park SU., et.al. 2000), dan *Solanum aviculare* (Argolo., et.al. 2000).

Mikroba Endofit

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan RX., et.al. 2001).

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang

sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Strobel GA., et.al. 2003). Sehingga apabila endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan alkaloid atau metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen. Berbagai jenis endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman inangnya, dan telah berhasil dibiakkan dalam media perbenihan yang sesuai. Demikian pula metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroba endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi struktur molekulnya. Beberapa diantaranya adalah :

1. Mikroba endofit yang menghasilkan antibiotika

Cryptocandin adalah anti-fungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang berhasil diisolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berhasiat sebagai antijamur yang patogen terhadap manusia yaitu *Candida albicans*

dan *Trichopyton spp.* (Strobel GA., et.al. 1999).

Beberapa zat aktif lain yang diisolasi dari mikroba endofit misalnya *ecomycin* diproduksi oleh *Pseudomonas viridiflava* juga aktif terhadap *Cryptococcus neoformans* dan *C.albicans*. *Ecomycin* merupakan lipopeptida yang disamping terdiri dari molekul asam amino yang umum juga mengandung homoserin dan beta-hidroksi asam arpartat (Miller RV., et.al. 1998), sedangkan senyawa kimia yang diproduksi oleh mikroba endofit *Pseudomonas Syringae* yang berhasiat sebagai anti jamur adalah *pseudomycin*, yang dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Cryptococcus neoformans* (Harrison LD., et.al. 1991).

Pestalotiopsis micrispora, merupakan mikroba endofit yang paling sering ditemukan di tanaman hutan lindung di seluruh dunia. Endofit ini menghasilkan metabolit sekunder *ambuic acid* yang berhasiat sebagai antifungi (Li, JY., et al. 2001). *Phomopsichalasin*, merupakan metabolit yang diisolasi dari mikroba endofit *Phomopsis spp.* berhasiat sebagai anti bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, dan juga dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida tropicalis* (Horn WS., et.al. 1995).

Antibiotika berspektrum

luas yang disebut *munumbicin*, dihasilkan oleh endofit *Streptomyces spp.* strain NRRL 30562 yang merupakan endofit yang diisolasi dari tanaman *Kennedia nigricans*, dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus anthracis*, dan *Mycobacterium tuberculosis* yang multiresisten terhadap berbagai obat anti tbc. (Castillo UF. et.al. 2002). Jenis endofit lainnya yang juga menghasilkan antibiotika berspektrum luas adalah mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman *Grevillea pteridifolia*. Endofit ini menghasilkan metabolit *kakadumycin*. Aktifitas antibakterinya sama seperti *munumbicin D*, dan *kakadumycin* ini juga berkhasiat sebagai anti malaria (Castillo UJ., et.al. 2003).

2. Mikroba endofit yang memproduksi antivirus

Jamur endofit *Cytonaema sp.* Dapat menghasilkan metabolit *cytonic acid A* dan *B*, yang struktur molekulnya merupakan isomer p-tridepside, berhasiat sebagai anti virus. *Cytonic acid A* dan *B* ini merupakan protease inhibitor dan dapat menghambat pertumbuhan cytomegalovirus manusia. (Guo B. et.al. 2000).

3. Mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sebagai antikanker

Paclitaxel dan derivatnya merupakan zat yang berkhasiat

sebagai antikanker yang pertama kali ditemukan yang diproduksi oleh mikroba endofit. Paclitaxel merupakan senyawa diterpenoid yang didapatkan dalam tanaman *Taxus*. Senyawa yang dapat mempengaruhi molekul tubulin dalam proses pembelahan sel-sel kanker ini, umumnya diproduksi oleh endofit *Pestalotiopsis microspora*, yang diisolasi dari tanaman *Taxus andreanae*, *T. brevifolia*, dan *T. wallichiana*. Saat ini beberapa jenis endofit lainnya telah dapat diisolasi dari berbagai jenis *Taxus* dan didapatkan berbagai senyawa yang berhasiat sebagai anti tumor. Demikian pula upaya untuk sintesisnya telah berhasil dilakukan (Strobel GA. Et.al. 2002).

4. Mikroba endofit penghasil zat anti malaria

Colletotrichum sp. merupakan endofit yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua*, menghasilkan metabolit artemisinin yang sangat potensial sebagai anti malaria (Lu H., et.al. 2000). Disamping itu beberapa mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman *Cinchona spp.*, juga mampu menghasilkan alkaloid cinchona yang dapat dikembangkan sebagai sumber bahan baku obat anti malaria (Simanjuntak P., et.al. 2002).

5. Endofit yang memproduksi antioksidan

Pestacin dan isopestacin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit *P. microspora*. Endofit ini berhasil diisolasi dari tanaman *Terminalia morobensis*, yang tumbuh di Papua New Guinea. Baik pestacin ataupun isopestacin berhasiat sebagai antioksidan, dimana aktivitas ini diduga karena struktur molekulnya mirip dengan flavonoid (Strobel GA., et.al. 2002).

6. Endofit yang menghasilkan metabolit yang berkhasiat sebagai antidiabetes

Endofit *Pseudomassaria* sp yang diisolasi dari hutan lindung, menghasilkan metabolit sekunder yang bekerja seperti insulin. Senyawa ini sangat menjanjikan karena tidak sebagaimana insulin, senyawa ini tidak rusak jika diberikan peroral. Dalam uji praklinik terhadap binatang coba membuktikan bahwa aktivitasnya sangat baik dalam menurunkan glukosa darah tikus yang diabetes. Hasil tersebut diperkirakan dapat menjadi awal dari era terapi baru untuk mengatasi diabetes dimasa mendatang (Zhang B. et.al.1999).

7. Endofit yang memproduksi senyawa immunosupresif

Obat-obat immunosupresif merupakan obat yang digunakan untuk pasien yang akan dilakukan tindakan transplantasi

organ. Selain itu immunosupresif juga dapat digunakan untuk mengatasi penyakit autoimun seperti rematoid arthritis dan *insulin dependent diabetes*. Senyawa subglutininol A dan B yang dihasilkan oleh endofit *Fusarium subglutinans* yang diisolasi dari tanaman *T. wilfordii*, merupakan senyawa immunosupresif yang sangat poten (Lee,J., et.al. 1995).

Penutup

Tanaman merupakan sumber bahan baku obat yang tak ternilai harganya, perlu terus menerus mendapat perhatian kita semua. Eksploitasi tanaman obat yang berlebihan tanpa memperhatikan upaya konservasinya tentu sangat mengkhawatirkan. Peran para ahli budi daya tanaman dan para ahli bioteknologi khususnya teknologi kultur jaringan sangat penting untuk menghindari kelangkaan bahan baku obat herbal yang sampai saat ini masih diambil dari tanaman aslinya secara konvensional. Kultur jaringan sangat bermanfaat dalam upaya perbanyakan dan multiplikasi serta konversi dari beberapa spesies tanaman obat. Produksi metabolit sekunder dapat dilakukan secara *in vitro* dalam skala besar. Demikian pula rekayasa genetika dan transformasi genetik dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Peran mikroba endofit yang dapat memproduksi metabolit sekunder

yang sama kualitasnya dengan tanaman aslinya sangat potensial untuk terus dikembangkan guna memperoleh metabolit sekunder yang dapat digunakan untuk mengobati berbagai jenis penyakit.

Daftar Acuan

- Arumugam N., SS. Bhojwani. (1990). Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Podohyllum kexandrum*. *Can J. Botany*. 68: 487-491.
- Argolo AC., BV. Charlwood, M. Plesch. (2000). The regulation of solasodine production by *Argobacterium rhizogenes* transformed roots of *Solanum aviculare*. *Planta Medica*. 66: 448-451.
- Barna KS., AK. Wakhlu. (1988). Axillary shoot induction and plant regeneration in *Plantago ovata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 15 : 169-173.
- Basu P., S. Chand. (1996). Regeneration of plantlets from root-derived callus of *Egyptian henbane*. *Cell Chromosome Res*. 19: 31-34.
- Benyamin BD., P. Roja, MR. Heble, MS. (1987). Chandra. Multiple shoot cultures of *Atropa belladonna* : Effect of physicochemical factors on growth and alkaloid formation. *J. Plant Nutr*. 129: 129-135
- Birch RG.,(1997). Plant transformation : Problem and strategies for practical application. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 297-326.

- Cai G., G. Li, H. Ye, (1995). Hairy roots culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. *Chin J Biotechnol.* 11: 227-235.
- Castillo UF., GA. Strobel, EJ. Ford, WM Hess, H. Potter, JB. Jensen, H. Albert, R. Robinson, MA. Condrón, DB. Teplow, D. Stevens and D. Yaver. (2002). Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* 148:2675-2685.
- Castillo UJ., K. Harper, GA. Strobel., J. Sears, K. Alesi, E. Ford, J. Lin, M. Hunter, M. Maranta, H. Ge. D. Yaver, JB. Jensen, H. Porter, R. Robinson, D. Millar, WM. Hess, M. Condrón, and D. Teplow. (2003). Kakandumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Lett.* 24: 183-190.
- Cucu N., Gabriela, L. Gavrila. (2002). Genetically modified medicines plants. Transfer and expression of a marker kanamycine resistance gene in *Atropa belladonna* plants. *Rom Biotechnol Lett.* 7: 869-874.
- Das P., SK. Palai, A. Patra, YS Samantaray, GR. Rout. (1999). In vitro somatic embryogenesis in *Typhonium trilobatum* Schoot. *Plant Growth Reg.* 27: 95-99.
- Deus B., MH Zenk. (1982). Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnol Bioeng.* 24: 1965-1974.
- Faria RT., RD. Illg. (1995). Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. *Sci. Horticult.* 62: 135-137.
- Gastaldo P., AM. Cafiglia. (1996). Somatic embryogenesis and esculin formation in calli and embryoids from bark explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Plant Sci. Shannon.* 119: 157-162.
- Ghosh BE, S. Sen. (1991). Plant regeneration through somatic embryogenesis from spear callus culture of *Asparagus cooperi* Baker. *Plant Cell Rep.* 9: 667-670.
- Giri A., S. Banerjee, PS Ahuja, CC Giri. (1997). Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* Wall. Using *Argobacterium rhizogenes*. *In vitro Cell Dev Biol Plant* .33: 293-306.
- Guo B., J. Dai, S. Ng, Y. Huang, C. Leong, W. Ong, and BK. Carte. (2000). Cytonic acid A and B, novel tridepside inhibitor of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaena* sp. *J. Nat. Prod.* 63: 602-604.
- Hahn EJ., YS Kim, KW. Yu, CS Jeong, KY Paek. (2003). Adventitious root cultures of *Panax ginseng* and ginsenoside production through large scale bioreactor system. *J Plant Biotechnol.* 5: 1-6.
- Harrison L., C. Teplow., M. Rinaldi., and GA Strobel., (1991) Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas Syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 2857-2865.

- Horn WS., MSJ.Simmonds, RE. Scharztz, and WM. Blaney. (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis Spp. Tetrahedron* 14: 3969-3978.
- Jha S., NP. Sahu, SB. Mahato. (1988). Production of the alkaloids emetine and cephaelin in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. *Planta Medica* 54: 504-506.
- Koroch AR., J. Kapteyn, HR. Juliani, JE. Simon. (2003). In vitro regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 39: 415-418.
- Koroch AR., J. Kapteyn, HR. Juliani, JE. Simon. (2002). Invitro-regeneration and Agrobacterium transformation of Echinecea purpuria leaf explant. Trends New Crop New News.
- Kumar A., (1992). Somatic embryogenesis ang high frequency plantlet regeneration in callus cultures of *Thevetia peruviana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 31: 47-50.
- Lai N., PS. Ahuja. (1996). Plantlet regeneration from callus in *Piccorhiza kurroa* Royle, An endangered medicinal plants. *Plant Tissue Cult*. 6: 127-134
- Li JY., JK. Harper, DM. Grant, BO. Tombe, B. Basyal, WM. Hess, and GA.Srobel. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis spp*. And *Monochaetia spp*. *Pytochemistry*56: 463-468.
- Lee,J. E. Lobkovsky, NB. Pliam, GA. Strobel, and J. Clardy (1995). Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J.Org.Chem*. 60: 7076-7077.
- Levin R., V. Gaba, B. Tal, S. Hirsch, D. De Nola, K. Vasil. (1988). Automatic planttissue culture for mass propagation. *Biotchnology*. 6: 1035-1040.
- Lu H., WX. Zou, JC. Meng, J. Hu, and RX Tan. (2000). New Bioactive metabolites produced by *Colleto-trichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci*. 151: 76-73.
- Maksum R. (2004) Pemberian Vakasin melalui Tanaman Trangenik. *Maj. Il.Kefarmasian Indon*. 1(1): 1-9.
- Miller,RV.,CM.Miller, D. Garton-Kinney, B.Redgrave, J. Sears, M. Condron, D. Teplow, and GA. Strobel. (1998). Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridflava*. *J. Appl. Microbiol*. 84:937-944.
- Muhlbach H., (1998). Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotech Ann Rev*. 4: 113-171.
- Murch SJ., K. Ray, PK Saksena. (2000). Tryptophan is a precursor for malatonin and serotonin biosynthesis in vitrogenerated St.John's wort. *Plant Cell Rep*. 19: 698-704.
- Naina NS., PK Gupta, AF. Mascarenhas. (1989). Genetic transformation and regeneration of

- transgenic neem (*Azadirachta indica*) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Curr Sci*. 58: 184-187
- Nester EW., MP Gordon, RM Amasino, MF. Yanofsky. (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Ann Rev Plant Physiol*. 35: 387-413.
- Nigra, HM. OH Caso, AM. Guilietti, (1987). Production of Solasodine by calli from different parts of *Solanum eleagnifolium*. *Plant Cell Rep*. 6: 135-137.
- Okslar V., B. Strukeij, S. Kreft, B. Bohanec, J. Zel. (2002). Micropropagation and hairy root culture of *Solanum laciniatum*. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 38: 352-357.
- Pande P., S. Malik, M. Bora. PS. Srivastava.(2002) Rapid protocol for in vitro propagation of *Lepidium sativum* Linn and enhancement in the yield of lepidine. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 38: 451-455.
- Parisi M., S. Moreno, G. Fernandez, (2002). Characterization of a novel cysteine peptidase from tissue cultures of garlic (*Allium sativum* L). *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 38: 608-612.
- Park JM., SY. Yoon. (1992). Production of sanguinarine by suspension culture of *Papaver somniferum* in bioreactors. *J.Ferm Bioeng*. 74: 292-296.
- Patra A., B. Rai, (1998). Successful plan regeneration from callus cultures of *Centella asiatica* Linn. *Urban. Plant Growth Reg*. 24: 13-16.
- Paek KY., KJ. Yu, SI.Park, NS. Sung, CH. Park. (1995). Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* as medicinal plant by shoot tip and root segment culture. *Acta Horticult*. 390:113-120.
- Pessuto J. (1996)Taxol Production in plant cell culture comes of age. *Nature Biotechnol*. 14: 1083.
- Perez-Bermudez P., HU. Seitz, I. Gavidia, (2002) A protocol for rapid micropropagation of endergered *Isoplexes* In vitro. *Cell Dev Biol Plant*. 38: 178-182.
- Pradel H., U. Dumkelehmman, B. Diettrich, M. Luckner. (1997). Hairy root cultures of *Digitalis lanata*. Secondary metabolism and plant regeneration. *J. Plant Physiol*. 151: 209-215.
- Preil W., P. Florek, U. Wix, A. Beck. (1988). Toward mass propagation by use of bioreactors. *Acta Horticult*. 226: 99-105.
- Rai VR. (2002). Rapid clonal propagation of *Nothapodytes foetida* – a threatened medicinal tree. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*. 38: 183-185.
- Ravishankar GA., S. Grewal. (1991). Development of media for growth of *Dioscorea deltoidea* cells and in vitro diosgenin production : Influence of media constituents and nutrient stress. *Bio-technol. Lett*. 13: 125-130.
- Roy SK., MZ. Hossain, MS. Islam, (1994). Mass propagation of *Rauvolfia serpentina* by in vitro shoot tip culture. *Plant Tissue Cult*. 4: 69-75.

- Rout GR., P.Das. (1997). In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale*). *J.Herbs. Spices and Med.Plants*. 4: 41-51.
- Rout GR. C. Saxena, S. Samantaray, P. Das. (1999). Rapid clonal propagation of *Plumbago zeylanica* Linn. *Plant Growth Reg.* 28: 1-4.
- Rout GR., UC. Mallick, P. Das. (1992). In vitro plant regeneration from leaf callus of *Cephaelis ipecacuanha*. *Adv.Plant. Sci.* 5: 608-613.
- Rout GR., S Samantaray. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* a multipurpose leguminous tree. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42: 283-285.
- Satheesh Kumar K., KV Bavanandan. (1988). Micropropagation of *Plumbago rosea* Linn. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 15: 275-278.
- Saxena C., SK. Palai, S. Samantaray, GR Rout, P. Das. (1997). Plant regeneration from callus cultures of *Psoralea corylifolia* Linn. *Plant Growth Reg.* 22: 13-17
- Sharma P., MV. Rajam (1995). Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in *Solanum melongena* L. *J. Exp. Botany.* 46 : 135-141.
- Shasany AK., SPS. Khanuja, S. Dhawan, U. Yadav, S. Sharma, S. Kumar, (1998). High regenerative nature of *Mentha arvensis* internodes. *J.Biosci.* 23: 641-646.
- Shi HP., S. Kintzios. (2003). Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Argobacterium rhizogenes*. And puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Rep.* 21: 1103-1107.
- Simanjuntak P., T. Parwati, Bustanussalam, TK. Prana, S. Wibowo, H. Shibuya. (2002). Isolasi dan kultivasi mikroba endofit penghasil senyawa alkaloid kinkona dari *Chinchona* spp. *J. Mikrobiol. Indon.* 7(2): 27-30.
- Srividya N., BPS Devi. (1998). Azadirachtin and nimbin content in in vitro cultured shoots and roots of *Azadirachta indica* A. *Juss Indian J Plant Physiol.* 3: 129-34.
- Stafford A., P. Morris, MW. Fowler. (1986). Plant cell Biotechnology: A perspective. *Enzyme Microbial Tech.* 8: 578-597.
- Strobel GA., and B. Daisy (2003), Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. and Mol. Biology Rev.* 67(4):491-502.
- Strobel,GA. (2002). Microbial gifts from rain forests. *Can.J.Plant Pathol.* 24: 14-20.
- Strobel, GA., E. Ford. J. Woapong, JK. Harper, AM. Arif, DM. Grant, PCW. Fung, and K. Chan. (2002). Isopestacin, an isobenzopuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Pytochemistry* 60: 179-183.
- Strobel GA., RV. Miller, C. Miller, M. Condron, DB. Teplow, and WM. Hess. (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from endo-

- phytic fungus *Cryptosporiopsis quercina*. *Microbiology* 145: 1919-1926.
- Tan, RX and WX Zou., (2001) Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod.Rep.* 18 : 448-459.
- Tripathi L., JN Tripathi. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop J. Pharm. Res.* 2(2): 243-253.
- Toppel G., L. White, B. Riebesehl, K. Von Borstel, T. Hartman. (1987). Alkaloid pattern and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* spp. *Plant Cell Rep.* 6: 466-469.
- Tsay HS., TG. Gau. CC. Chen. (1989). Rapid clonal propagation of *Pinella ternate* by tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8: 450-454.
- Zhang, B., G. Salituro, D. Szalkowski, Z. Li, Y. Zhang, I. Royo, D. Vilella, M. Dez, F. Pelaez, C. Ruby, RL. Kendall, X. Mao, P. Griffin, J. Calaycay, JR. Zierath, JV. Heck, RG. Smith, and DE. Moller. (1999). Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* 284: 974-981.
- Zhou J., H. Ma, F. Guo, X. Luo. (1994). Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 36: 73-79.