

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PEMBIKILAN DAN PENGKULTURAN PROTOPLAS
Centella asiatica

Ijazah: Sarjana muda

SESI PENGAJIAN: 2004/05

Saya TAI THAU CHUNG
 (HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

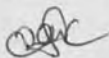
(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh



(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: P.O. Box 21846

Dr. Zaleha Abd. Aziz

Nama Penyelia

88716 LUYANG, SABAH

Tarikh: 29/04/05

Tarikh: _____

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PEMENCILAN DAN PENGKULTURAN PROTOPLAS

Centella asiatica

TAI THAU CHUNG

**DISERTASI YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS & TEKNOLOGI
UNIVERSITY MALAYSIA SABAH**

FEBRUARI 2005



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

21 Februari 2005



TAI THAU CHUNG

HS 2002-3128

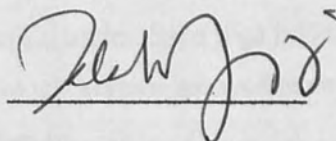


DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

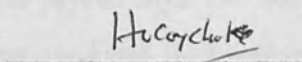
1. PENYELIA

(Dr. Zaleha Abd. Aziz)



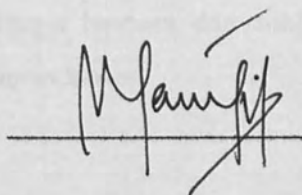
2. PEMERIKSA 1

(Prof. Dr. Ho Coy Choke)



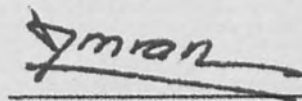
3. PEMERIKSA 2

(Prof. Madya Dr. Hjh. Mariam Abd. Latip)



4. DEKAN

(Prof. Madya Dr. Amran Ahmed)



PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada pihak Univeriti Malaysia Sabah memberi peluang kepada saya untuk memlaksanakan kajian ini. Saya juga ingin berterima kasih kepada pihak Sekolah Sains & Teknologi kerana menyediakan makmal, bahan dan peralatan yang lengkap bagi tujuan kajian ini.

Selain itu, saya ingin memberi penghargaan kepada peyelia saya, Dr. Zaleha Abdul Aziz atas sokongan dan tunjuk ajar sepanjang kajian ini. Tidak lupa juga saya ingin berterima kasih kepada kakak Roseline Baun Ajang, kakak Radiza Darun, kakak Rokiah Ibrahim dan rakan-rakan seperjuangan saya. Tanpa bantuan dan sokong mereka, sudah pasti kajian ini tidak dapat dilaksanakan dengan lancar.

ABSTRAK

Kalus diaruh daripada petiol dan daun *Centella asiatica* dalam medium pepejal MS+ 0.22 mg l⁻¹ 2, 4-D + 0.23 mg l⁻¹ BAP + 500 mg l⁻¹ Casein hidrolisat + 30 g l⁻¹ sukrosa, kemudian kultur sel ampaiian dimulakan dalam medium MS cecair yang sama. Selepas mendapat jisim sel ampaiian yang mencukupi, pemencilan protoplas dilakukan dengan merawat kalus sel ampaiian dengan larutan enzim (1% w/v Maserozim R10, 1.5% w/v selulase R10, dan 0.5% w/v driselase dicairkan dengan larutan media MSO + 0.6 M Manitol + 5 mM CaCl + 3% sukrosa) dengan nilai pH 5.8. Akhirnya protoplas dikulturkan dengan cara pengulturan manik agaros dengan media B5 + 2 mg l⁻¹ zeatin + manitol 9% dan sukrosa 2%. Kalus yang diaruh dari daun adalah lebih sihat dan mudah dijaga daripada kalus yang diaruh dari petiol *C. asiatica*. Kalus petiol mudah mati selepas proses subkultur. Dalam sel ampaiian, kalus petiol turut mangalami masalah subkultur. Maka, pemencilan protoplas dari kalus petiol tidak berjaya. Bagi pemencilan dan pengkulturan protoplas dari kalus daun *C. asiatica*, 5 hari subkultur sel ampaiian dan 1.5 X 10⁵ protoplas ml⁻¹ plating density memberi keputusan pembahagian sel protoplas yang paling memuaskan antara pembolehkan yang dikaji iaitu jangkamasa subkultur sel ampaiian (3, 5 dan 12 hari) dan *plating density* protoplas (0.5 x 10⁵, 1.5 x 10⁵, 2.5 x 10⁵ protoplas ml⁻¹).



ABSTRACT

The callus initiated from the laminar (leaves) and petiole of *Centella asiatica* in the solid media of MS+ 0.22 mg l⁻¹ 2, 4-D + 0.23 mg l⁻¹ BAP + 500 mg l⁻¹ Casein hydrolisate + 30 g l⁻¹ sucrose, then cell suspension culture was initiated with the same media but in liquid form. After the yield of the cell suspension increased, the callus was treated with enzyme mixture (1% w/v Macerozym R10, 1.5% w/v cellulase R10, dan 0.5% w/v driselase) that dissolved with MSO + 0.6 M Manitol + 5 mM CaCl + 3% sucrose for protoplast isolation. After protoplast isolation, protoplast was cultured in B5 media + 2 mg l⁻¹ zeatin + manitol 9% and sucrose 2% by using agarose bead culture. Kalus initialled from laminar was healthier and easier to handle than the callus from the petiole of *Centella asiatica*. Petiole's callus was very easy to die after the process of subculture. So, protoplast isolation from petiole of *Centella asiatica* in this research was not successful. For protoplast isolation and pure culture from laminar's callus of *Centella asiatica*, the cell suspension subculture period of 5 days and protoplast plating density of 1.5 X 10⁵ protoplast ml⁻¹ give an high yield of protoplast isolation and high cell division of protoplast culture. This result was tested among the parameter of subculture period of cell suspension (3, 5 and 12 days) and protoplast plating density in protoplast culture (0.5 x 10⁵, 1.5 x 10⁵, 2.5 x 10⁵ protoplast ml⁻¹).

SENARAI KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI UNIT	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	3
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	4
2.1 <i>Centella asiatica</i>	4
2.1.1 Huraian Rupa Bentuk <i>Centella asiatica</i>	5
2.1.2 Habitat	5
2.2 Kegunaan <i>C. asiatica</i>	5
2.2.1 Kegunaan Tradisional	5
2.2.2 Kegunaan Moden	6
2.3 Kultur Ampaian Sel	6
2.4 Protoplast	8
2.4.1 Pengenalan	8
2.4.2 Pemencilan Protoplas	8
2.4.3 Aplikasi Protoplas	9
2.5 Faktor-faktor yang mempengaruhi pemencilan protoplas dan pembahagian protoplas	10

BAB 3	KAEDAH	11
3.1	Penyediaan Larutan Stok Media MS	11
3.1.1	Penyediaan Larutan Garam Major MS (X10)	11
3.1.2	Penyediaan Larutan Garam Minor MS (X100)	12
3.1.3	Penyediaan Larutan Vitamin MS (X10)	12
3.2	Penyediaan Larutan Stok Media B5	12
3.3	Penyediaan Larutan Stok CPW 13	13
3.4	Penyediaan Larutan Stok Hormon Pertumbuhan	13
3.4.1	Penyediaan Larutan Stok 6-benzilaminopurin (1 mg mL ⁻¹)	13
3.4.2	Penyediaan Larutan Stok Asid 2,4-diklorofenoksiacetik (1 mg ml ⁻¹)	14
3.4.3	Penyediaan Zeatin (1mg ml ⁻¹)	14
3.5	Penyediaan Media MSO Pepejal	15
3.6	Penyediaan Media MS Pepejal Dengan Hormon Pertumbuhan Bagi Mengaruh Pertumbuhan Kalus	16
3.7	Pensterilan Eksplan (Petiol dan daun <i>Centella asiatica</i>)	16
3.8	Pengkulturan Eksplan Untuk Mengaruh Pertumbuhan Kalus	16
3.9	Kultur Sel Ampaian	17
3.10	Penyediaan Campuran Enzim Bagi Melarutkan Dinding Sel Kalus	18
3.11	Pemencilan Protoplas Dan Penulinan Protoplas	19
3.12	Penyediaan Media Cecair B5 Untuk Pengkulturan Protoplas	19
3.13	Penyediaan Media Cecair B5 (X2) Untuk Pengkulturan Protoplas	20
3.14	Pengiraan Protoplas	21
3.15	Pengkulturan protoplas	21
BAB 4	KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA	23
4.1	Protoplas Daripada Bahagian Petiol <i>Centella asiatica</i>	23
4.2	Protoplas Daripada Bahagian Daun <i>Centella asiatica</i>	26
4.2.1	Hasil Pemencilan Protoplas Dan Penulinan Protoplas	26
4.2.2	Hasil Pengkulturan Protoplas	28
4.3	Analisis Data (Dari Bahagian 4.2)	35
BAB 5	PERBINCANGAN	38
5.1	Berbandingan Antara Kalus Petiol Dan Kalus Daun	38



5.2 Pemencilan Protoplas Dan Penulinan Protoplas.	40
5.3 Pengkulturan Protoplas	42
5.3.1 Faktor Jangkamasa Subkultur Sel Ampaian.	42
5.3.2 Faktor <i>Plating Density</i>	43
BAB 6 KESIMPULAN (DAN CADANGAN)	45
RUJUKAN	46
LAMPIRAN	48



SENARAI JADUAL

	Muka Surat
3.1 Isipadu nutrien-nutrien yang diperlukan dalam penyediaan media kultur MS dalam 1 l	15
3.2 Isipadu nutrien-nutrien yang diperlukan dalam penyediaan media kultur B5 dalam 1 l.	20
4.1 Kuantiti pemencilan protoplas daripada jangkamasa subkultur sel ampaian yang berlainan	28
4.2 Hasil data kultur protoplas daripada pemencilan protoplas (Jangkamasa subkultur sel ampaian = 3 hari)	32
4.3 Hasil data kultur protoplas daripada pemencilan protoplas (Jangkamasa subkultur sel ampaian = 5 hari)	33
4.4 Hasil data kultur protoplas daripada pemencilan protoplas (Jangkamasa subkultur sel ampaian = 12 hari)	34



SENARAI RAJAH

	Muka Surat
4.1 Bilangan protoplas ml ⁻¹ lawan jangkamasa subkultur sel ampaian	35
4.2 Bilangan pembahagian sel protoplas lawan hari kultur (Jangkamasa subkultur = 3 hari)	36
4.3 Bilangan pembahagian sel protoplas lawan hari kultur (Jangkamasa subkultur = 5 hari)	36
4.4 Graf kadar pertumbuhan sel ampaian lawan masa	37



SENARAI FOTO

	Muka surat
4.1 Kalus yang diaruhkan dari bahagian petiol <i>Centella asiatica</i>	25
4.1 Kalus yang diaruhkan dari bahagian daun <i>Centella asiatica</i>	27
4.3 Protoplas	31



SENARAI UNIT

mm	Milimeter
cm	Sentimeter
m	Meter
M	Kemolaran
mg	miligram
g	Gram
l	Liter
ml	Mililiter
°C	Darjah selsius
%	Peratusan
w	berat
v	isipadu
rpm	putaran minit ⁻¹



SENARAI SINGKATAN

DNA	asid deoksiriboneuklik
MS	Murashige & Skoog
M5O	Media MS kosong
B5	Gamborg B5
BAP	6-benzilaminopurin
2,4-D	2,4-diklorofenoksiacetik
FDA	Fluoresen Diacetate Acetone
CPW	Cell-Protoplast Washing



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan

Malaysia merupakan sebuah negara Asia Tenggara yang terletak di tengah garisan khatulistiwa di mana sebahagian besar dataran Malaysia telah diliputi oleh hutan hujan tropika yang menghijau. Kepelbagaian flora dan fauna yang terdapat di dalam hutan Malaysia menyebabkan ia mempunyai kepelbagaian biologi yang tinggi. Iklim Malaysia yang mengalami hujan dan panas sepanjang tahun telah menjadi faktor pengekalan kesuburan hutannya. Hutan sebenarnya adalah sangat penting bagi mewujudkan kestabilan alam sekitar.

Hutan juga memainkan peranan penting dalam industri perubatan. Hutan merupakan gedung bagi kelangsungan industri perubatan bagi manusia sejagat. Aktiviti-aktiviti penggunaan sumber hutan sebagai ubat-ubatan telah lama dipraktikkan oleh masyarakat dunia. Kepelbagaian flora dalam hutan menyajikan beraneka jenis bahan ramuan yang boleh digunakan sebagai ubat. Justeru itu, hutan hujan tropika Malaysia turut menyediakan beribu-ribu jenis spesies tumbuhan yang berpotensi sebagai penawar kepada pelbagai penyakit.

Centella asiatica (atau lebih dikenali dengan nama tempatan – Pegaga) merupakan salah satu spesies tumbuhan herba yang terdapat di hutan Malaysia dimana ia berpotensi sebagai ubat untuk melega dan merawat pelbagai jenis penyakit. Dengan nilai perubatan yang istimewa ini, permintaan kepada *C. asiatica* adalah agak tinggi dalam bidang industri perubatan. Maka dengan secara langsungnya, *C. asiatica* mempunyai nilai kajian yang tinggi dalam bidang penyelidikan, terutamanya dalam bidang bioteknologi tumbuhan, untuk mempertingkatkan kuantiti dan kualiti penggunaannya dalam bidang perubatan. Pada tahun 1990, permintaan *C. asiatica* adalah di antara 12700 ton jisim kering yang bernilai Rs.1.5 bilion (Ahmad, 1993).

Pelbagai jenis teknologi dari bidang bioteknologi tumbuhan telah diaplikasikan bagi tujuan untuk menghasilkan *C. asiatica* yang mempunyai ciri-ciri istimewa yang dikehendaki secara besar-besaran. Pengkajian tentang pengubahsuaian dan perkembangan ciri-ciri *C. asiatica* dengan tujuan untuk meningkatkan kualiti dan kuantiti *C. asiatica* dapat dilakukan dengan menggunakan teknik-teknik seperti mikropropagasi, organogenesis, embriogenesis, DNA rekombinan dan sebagainya. Terdapat satu lagi teknik yang boleh digunakan untuk pengubahsuaian dan perkembangan ciri-ciri *C. asiatica*. Teknik yang dimaksudkan adalah melibatkan penghasilan sel protoplas. Protoplas merupakan sel tumbuhan yang tidak mempunyai dinding sel akibat pemusnahan dinding sel secara fizikal atau dicernakan dengan penggunaan enzim. Ia juga bersifat ketotipotenan dimana ia mempunyai kebolehan untuk berkembang menjadi tumbuhan yang matang. Dua sel protoplas dari spesies yang sama ataupun tidak sama dapat dicantumkan antara satu sama lain bagi menghasilkan hibrid atau sibirid yang mempunyai ciri-ciri gabungan kedua-dua

protoplas tersebut. Selain itu, proses transformasi gen asing ke dalam sel protoplas adalah lebih mudah tanpa dinding sel.

Oleh kerana teknik-teknik yang melibatkan protoplas sangat berpotensi untuk pengubahsuaian dan perkembangan ciri-ciri *C. asiatica*, maka teknik-teknik pemencilan protoplas dan pengkulturan protoplas adalah penting untuk mengoptimumkan penghasilan atau pertumbuhan protoplas bagi memudahkan proses kajian protoplas tersebut.

1.2 Objektif Kajian

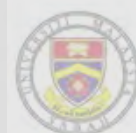
Objektif kajian ini adalah untuk menilai kesan jangka masa penuaian kultur ampaiian sel daripada bahagian daun dan petiol *C. asiatica* kepada penghasilan protoplas; dan menentukan “*plating density*” protoplas yang optimum bagi pengkulturan protoplas demi mendapatkan nilai pembahagian protoplas yang optimum.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Centella asiatica*

Centella asiatica merupakan ahli famili Umbelliferae. Menurut World Health Organization (1999), *C. asiatica* terdapat banyak nama yang berlainan di seluruh dunia; antaranya ialah artaniyae-hindi, asiatic pennywort, barmanimuni, barmi, bham buti, boabok, bodila-ba-dinku, bokkudu, brahma manduki, brahmi ghi, brahmi-buti, brahmi, bua bok, bua-bok, centella, chhota mani-muni, chi-hsueh-ts'ao, ghi brahmi, ghod tapre, ghodtapre, ghortapre, gotu kola, gotukola, herba pegagan, herba kakikuda, hydrocotyle, hydrocotyle asiatique, idrocotile, imsen korokla, Indian pennywort, Indian water navelwort, indischer wassernabel, karinga, karivana, kudangal, luei gong gen, lièn tièn tháo, mandooka parni, mandukaparni, mandukparni, manimuni, marsh pepperwort, matoyahuho, matoyahuhu, mrang-khua, mtwigahuwu, pa-na-e-khaa-doh, phác chèn, phaknok, phalwaen, rau má, saraswathiaaku, takip-kohol, thalkuri, thankuni, thol-kuri, tilkushi, titjari, tono'itahi, tsubo-kusa, tungchian, vallari, vallarei, vitovitolenge, water pennywort, waternavel, yahon-yahon dan yerba de chavos. Di Malaysia, ia lebih dikenali sebagai pegaga.



2.1.1 Huraian Rupa Bentuk *C. asiatica*

C. asiatica merupakan sejenis tumbuhan herba yang menjalar. Ia bertangkai panjang yang prostrat di mana bercambah dari aksil tangkai yang dekat dengan bahagian nod dan akarnya bercambah dari bahagian nod juga. Daunnya yang bersifat licin/glabrus adalah berbentuk ginjal, tunggal, hijau, tersusun dalam keadaan roset dan berdiameter di antara 1.3-6.3 cm. Petiol panjang (7.5-15 cm) yang berkulit licin menyambungkan daun lembut dan akarnya. Bunganya kecil, kurang dari 3 mm dan berwarna putih atau merah jambu.

2.1.2 Habitat

C. asiatica biasanya tumbuh di tanah pasir lembab di negara-negara seperti: Africa, Australia, Kamboja, Amerika tengah, Indonesia, Laos, Madagaskar, Kepulauan Pasifik, Amerika Selatan, Thailand, Vietnam, Malaysia dan terutamanya di dataran beraltitud 600 m atas paras laut India, Iran, Pakistan dan Sri Lanka. Ia selalunya membentuk seakan-akan karpet hijau menutupi permukaan tanah (Anonymous, 1992).

2.2 Kegunaan *C. asiatica*

2.2.1 Kegunaan Tradisional

Dalam perubatan tradisional India, *C. asiatica* merupakan sejenis ubat tonik yang memberi tenaga dan kekuatan, mengubati asma, bronkitis, dropsi, elephantiasis (untut), gastrik "*catarrh*", masalah ginjal, penyakit kusta, leukorea, penyakit kulit uretritis dan

dapat membersihkan darah (Kakkar, 1988). Amalan meminum jus pegaga amat mujarab untuk membantu mereka yang bermasalah untuk tidur, merawat kerengsaan kulit dan tekanan darah tinggi. Walaupun pegaga amat baik dimakan mentah tetapi daun yang diramas dengan sedikit air juga amat baik jika disapukan pada kudis dan luka. Di samping itu, pegaga juga memberi kesan kepada beberapa peringkat pembentukan tisu seperti menghilangkan parut, membina kolagen, merangsang pembentukan rambut dan kuku.

2.2.2 Kegunaan Moden

C. asiatica dilaporkan mempunyai glikosid seperti indocentellosid, brahmosid, brahminosid, asiaticosid, theankunisid dan iso-theankunisid. Asiaticosid sangat berguna untuk mengubati penyakit kusta dan tibi (*tuberculosis*). Asiaticosid merupakan salah satu komponen ubat “*geriforte*” yang diguna untuk “*senile pruritus*” (Anonymous, 1992). Ia juga mengandungi aktiviti antibakteria, “*antifeedant*”, anti-stres, anti-tibi dan penyembuhan luka (Chakraborty *et al.*, 1996; Srivastava *et al.*, 1997).

2.3 Kultur Ampaian Sel

Tisu-tisu eksplan biasanya mempunyai kadar pembahagian sel yang berbeza, pengkhususan sel, dan organisasi kepada struktur yang khusus seperti sistem vaskular. Pembentukan kalus daripada tisu eksplan melibatkan pembangunan tisu yang mempunyai kadar pembahagian secara rawak, tiada pengkhususan sel dan hilang

struktur organisasi (Thorpe 1980; Wagley *et al.* 1987). Pertumbuhan kalus dalam kultur ampaian sel mempunyai lima fasa, iaitu:-

- Fasa rehat – sel bersedia untuk membahagi
- Fasa eksponen– kadar pembahagian sel adalah tertinggi
- Fasa linear – pembahagian sel mula perlahan tetapi pertumbuhan saiz sel masih meningkat.
- Fasa nyahpecutan – pembahagian sel, pertumbuhan saiz sel menurun.
- Fasa pegun – bilangan dan saiz sel sentiasa malar.

Ampaian sel dimulakan dengan memindah sedikit kalus ke dalam satu kelalang yang mempunyai medium cecair, dimana diletak dalam pengacau putaran demi mendedahkan setiap sel kepada persekitaran medium (Rashid, 1988). Apabila sel baru terbentuk, ia akan terdedah kepada medium lalu membentuk bebola dan berkumpul. Ampaian sel memberi kadar pembahagian sel yang lebih tinggi berbanding dengan kultur kalus di atas media pepejal. Ini memberi kelebihan untuk mendapat banyak generasi kalus. Ampaian sel dapat dikekalkan dengan subkultur dalam kelalang baru yang dikenali sebagai kultur batch (Gamborg *et al.*, 1995). Menurut Bouhouche *et al.*, (1998), jika 3.5 ml ampaian sel disubkultur ke dalam 70 ml media MS cecair (dengan penambahan 2,4-D (10^{-6} M), 6-benzilaminopurin (10^{-6} M), sukrosa (30 g l^{-1}) dan Casein hidrolisat (500 mg l^{-1})) dalam kelalang kon berisipadu 250 ml lalu diinkubasi di atas pengacau giratori (89 rpm) pada suhu $26 \pm 2^\circ\text{C}$ dan 16 jam jangkamasa pendedahan cahaya, fasa rehat adalah pada hari yang ke-0 hingga hari yang ke-3; fasa eksponen adalah di antara hari ke-3 hingga hari ke-12; manakala fasa pegun adalah di antara hari ke-12 hingga hari ke-14.

2.4 Protoplas

2.4.1 Pengenalan

Protoplas merupakan sejenis sel tumbuhan yang tanpa dinding sel dimana dinding sel telah dibuang dengan kaedah fizikal ataupun telah dicernakan oleh enzim pencernaan. Kaedah pencernaan melalui enzim lebih kerap digunakan. Enzim selulase digunakan untuk mencernakan selulosa dalam dinding sel, manakala enzim pektinase memusnahkan pektin di antara sel tumbuhan yang berfungsi untuk mengekalkan sel-sel melekat bersama. Protoplas yang tanpa dinding sel itu adalah berbentuk sfera. Protoplas juga merupakan sel yang mempunyai sifat *totipotency* dimana ia dapat berkembang menjadi tumbuhan matang (Theurer, 1994).

2.4.2 Pemencilan Protoplas

Pemencilan protoplas daripada tisu tumbuhan dapat dilakukan dengan bantuan enzim yang mencernakan dinding selnya. Kejayaan pemencilan protoplas bergantung kepada keadaan tisu dan kombinasi enzim yang digunakan. Maka, tiada satu kaedah standard pemencilan protoplas. Tisu tumbuhan yang berbeza memerlukan keadaan yang berbeza untuk pemencilan protoplas dengan berjaya (Gamborg *et al.*, 1995).

Bagi ahli famili *Umbelliferae* seperti karot, kombinasi enzim yang digunakan untuk pencernaan dinding sel adalah seluloase 1% + pektoliase 0.125% (Roest, 1987).

2.4.3 Aplikasi Protoplas

Kaedah pemencilan protoplas daripada tisu tumbuhan telah dilakukan sejak lama lagi. Protoplas adalah sangat sensitif terhadap osmotik dan kejutan mekanikal. Ketika protoplas tiada dinding sel, ia memberi peluang untuk mengkaji membran plasma sel dan pertaupan sel (fusion) antara dua sel protoplas untuk membentuk sel hibrid dan sel sibirid (Keller *et al.*, 1982). Hibrid merupakan pertaupan sitoplasma tanpa pencatuman nucleus antara dua protoplas, manakala sibirid pula merupakan pertaupan protoplas sehingga pencantuman nucleus. Teknik pertaupan ini boleh mencantumkan protoplas daripada dua spesies yang berbeza untuk mendapat sifat-sifat baik yang diinginkan. “*Electrofusion*” merupakan teknik pertaupan sel protoplas yang biasa digunakan. Pertautan sel protoplas dapat digunakan untuk pemindahan sifat-sifat baru daripada satu protoplas kepada satu lagi. Sifat-sifat yang dimaksudkan termasuklah ketahanan kepada patogen, ketahanan kepada herbisid, ketahanan kepada penyakit dan sebagainya (Cocking, 1986)

Selain itu, protoplas juga boleh digunakan untuk transformasi DNA dengan mudah secara “*microinjection*”, elektroporasi ataupun *Agrobacterium* (Brett *et al.*, 1996). Dengan itu, gen yang mengkodkan protein yang dikehendak dapat dimasukkan ke dalam sel protoplas lalu menjadi sebahagian daripada gen protoplas dan mengekspresasikan sifat barunya.

RUJUKAN

- Ahmad, R.U., 1993. *Medical plants used in ISM – Medical Plants : New Vistas of Research*, Today and Tomorrow Printers and Publishers, New Delhi.
- Anonymous, 1992. *Wealth of India*. Raw Materials, CSIR, New Delhi 2:48
- Bouhouche, N., Solet, J.M., Simon, A., Bonaly, J., & Cosson, L., 1998. Conversion of 3-dimethylthiocolchicine into Thiocolchicoside By *Centella asiatica* Suspension Culture. *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 5, pp. 743-747.
- Brett, C.T. dan Waldron, K.W., 1996. Protoplast formation and use. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Wall*. Chapman & Hall. UK. Pp 9:218-219
- Chakraborty, T., Sinha Babu, S.P. dan Sukul, N.C., 1996. Preliminary evidence of antifilarial effect of *Centella asiatica* on canine dirofilariasis. *Fitoterapia* 67: pp 110-112
- Cocking, E.C., 1986. *Plant Cell Biology in the 21st Century: The Needs of Plant Cell and Tissue Culture*. Ingreen, New York.
- Gamborg, O.L. dan Phillips, G.C., 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer, Berlin. Pp21-40, 67-87, 167-177.
- Kakkar, K.K., 1988. Mandukaparti – medical uses and Therapeutic efficacy. *India Drugs*, India. 26: 92-97
- Keller, W.A., Setterfield, G., Douglas, G., Gleddie dan S., Nakamura, C., 1982. *Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry*. Unuversity of Guelph, Guelph.

- Puite, K.J., Dons, J.J.M., Huizing H.J. dan Kool, A.J., 1987. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture: Progress in Plant Protoplast Reasearch*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Rashid, A., 1988. Cell physiology and genetics of higher plants, vol I. *CRC Press*, Boca Raton, FL. pp 1-38, 67-103.
- Srivastava, R., Shukla, Y.N. dan Kumar, S., 1997. Chemistry and pharmacology of *Centella asiatica*: a review. *J. Medi. Arom. Plant Science*. Vol 19:1049-1056
- Theurer, C., Treumann, H. J., Faust, T., May, U. dan Kreis, W., 1994. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*.
- Thorpe, T.A., 1980., Organogenesis in vitro: structural, physiological and biochemical aspects. *Int Rev Cytol Suppl* 11A:71-112
- Wagley, L.M., Gladfelter, H.J. dan Philips, G.C., 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. Invitro. II. Macro- and Micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant cell Rep* 6:167-171
- World Health Organization, 1999. *Tradisional Medicine: The Medicinal Plants – Herba Centella*. Geneva, Switzerland.

