

KESAN NAA TERHADAP PEMBENTUKAN SOMATIK EMBRIO PADA KALUS

Phyllanthus niruri

MOOI CHOON YEE

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

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

MAC 2005



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: ~~Kesan NAA mengenai TERHADAP PEMBEU~~KESAN NAA TERHADAP PEMBENTUKAN SOMATIK
EMBRIO PADA KALUS *Phyllanthus Niruri*Ijazah: Sajana Muda Sains dengan KepujianSESI PENGAJIAN: 2004/2005Saya MOOI CHOON YEE

(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

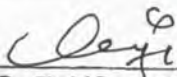
(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

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

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh



(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: BK 5-5-20
Lintang Retau 1, TamanBendera 11900 Bayan Lepas P.Pinang.Dr. Jualang Alan Ganau
Nama PenyeliaTarikh: 30/3/2005

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.

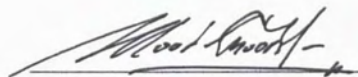
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

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

21 FEBRUARI 2005



(MOOI CHOON YEE)

(HS2002-3078)



DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

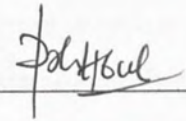
1. PENYELIA

(DR. JUALANG AZLAN GANSAU)



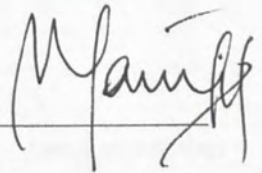
2. PEMERIKSA 1

(DR. ROZIAH HJ. KAMBUL)



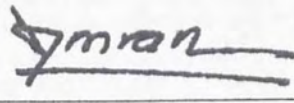
3. PEMERIKSA 2

(PROF. MADYA MARIAM ABD. LATIP)



4. DEKAN

(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)





PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada penyelia saya Dr. Jualang Azlan Gansau kerana telah banyak membantu dan memberi tunjuk ajar dalam saya menjalankan kajian ini.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada pelajar pasca-siswazah di bawah seliaan Dr. Jualang terutamanya Kak Hartinie, Kak Ainul, Kak N, Devina serta semua pelajar pasca yang terlibat secara langsung ataupun tidak langsung dalam membantu saya menjalankan projek ini.

Kepada rakan-rakan yang turut sama membuat projek ini iaitu pelajar program bioteknologi tahun 3. Terima kasih saya ucapkan kepada anda semua. Semoga kita akan mendapat keputusan yang baik dalam projek ini.

Kepada pembantu-pembantu makmal juga saya ucapkan terima kasih kerana turut membantu dalam saya menjayakan projek ini.

Akhir sekali ucapan terima kasih kepada seluruh warga UMS, orang awam dan kedua orang tua saya yang sentiasa memberi dorongan untuk saya terus berusaha melakukan yang terbaik. Sekian.



ABSTRAK

Kajian dijalankan bertujuan untuk mengkaji kesan NAA (0-20 μ M) terhadap pembentukan sel soma daripada kalus *Phyllanthus niruri*. Kalus dikulturkan di atas media MS, pH5.7, dan disimpan pada suhu 25°C, dan cahaya (16jam terang; 8jam gelap) . Daripada kajian pengkulturan sel somatik, didapati kalus *P.niruri* tidak membentuk somatik embrio pada media MS dengan rawatan 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, dan 20 μ M NAA. Kalus *P.niruri* tidak menghasilkan somatik embrio pada kepekatan 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, dan 20 μ M NAA tetapi memberi pertumbuhan kalus. Sepanjang pengkulturan somatik embrio yang berjaya terdapat 3 peringkat perubahan bentuk kalus dapat diperhatikan iaitu bermula dengan peringkat 'globular', peringkat 'heart-shaped', dan peringkat 'torpedo'. Selain itu, perubahan warna sel somatic dapat diperhatikan.



ABSTRACT

The objective of this study is to identify the effect of NAA(0-20 μ M) which induce somatic embryo by using *Phyllanthus niruri* callus. Callus were cultured on MS media, pH5.7 and is been place at growth chamber which has fixed environment of 25°C and 16 hours light : 8 hours dark. Throughout the experiment, callus *P.niruri* did not develop somatic embryo with MS media supplemental with 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, and 20 μ M NAA hormone. Callus which cultured on MS media supplemental with 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, and 20 μ M NAA did not develop somatic embryo but it induce callus. Successful somatic embryogenesis will develop 3 different stages. The first stage is globular stage, follow by heart shape stage and the last is torpedo stage. Throughout the experiment, callus changes colour.



KANDUNGAN

	Muka Surat
HALAMAN JUDUL	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI FOTO	x
SENARAI SINGKATAN	xi
SENARAI RAJAH	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN LITERATUR	3
2.1 Morfologi dan Habitat	4
2.2 Taksonomi	5
2.3 Kegunaan	6
2.4 Komponen Aktif	8
2.5 Teknik Kultur Tisu	9
2.6 Faktor-faktor mempengaruhi pengkulturan tisu	11
2.6.1 Media Kultur	11
2.6.2 Hormon	13
2.6.3 Keadaan Fizikal Pengkulturan	15
2.7 Pengawalan Somatik Embriogenesis	16
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	17
3.1 Sampel Tumbuhan	17
3.2 Radas dan Peralatan	17
3.3 Rawatan	18
3.3.1 Penyediaan Stok	19



3.3.2	Penyediaan Media	20
3.4	Cerapan	21
Bab 4	KEPUTUSAN	22
4.1	Pemkulturan sel somatik	22
4.2	Perkembangan sel somatik	23
Bab 5	PERBINCANGAN	29
5.1	Pengkulturan sel somatik	29
5.2	Cadangan cara mengatasi kegagalan	29
5.3	Masalah dalam proses pengkulturan	30
Bab 6	KESIMPULAN	32
	RUJUKAN	33
	LAMPIRAN	38



SENARAI JADUAL

		Muka Surat
2.1	Komponen yang terkandung dalam pokok <i>Phyllanthus niruri</i> .	8
2.2	Jenis tumbuhan yang telah digunakan menjalani eksperimen somatik embriogenesis.	10
3.1	Kepekatan hormon NAA yang digunakan dalam kajian.	18
3.2	Komposisi stok medium Murashige dan Skoog.	19
4.1	Kesan kepekatan NAA yang berbeza terhadap somatik embriogenesis <i>P. niruri</i> .	22
4.2	Purata berat segar kalus yang direkodkan pada hari pertama.	23
4.3	Purata berat segar kalus yang direkodkan pada hari ke-10.	23
4.4	Purata berat segar kalus yang direkodkan pada hari ke-20.	24
4.5	Purata berat segar kalus yang direkodkan pada hari ke-30.	24
4.6	Purata berat segar kalus yang direkodkan pada hari ke-40.	25
4.7	Purata berat segar kalus yang direkodkan pada hari ke-50.	25
4.8	Perubahan warna kalus pada kepekatan hormon 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M dan 20 μ M NAA selama 50 hari.	28



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka surat
2.1 Pokok <i>Phyllanthus niruri</i> .	5



SENARAI RAJAH

	Muka surat
4.1 Perkembangan kalus <i>P.niruri</i> dikulturkan pada media MS + hormon 5 μ M NAA selama 40 hari.	26
4.2 Perkembangan kalus <i>P.niruri</i> dikulturkan pada media MS + hormon 10 μ M NAA selama 40 hari.	27



SENARAI SINGKATAN

NAA	α – Naphthaleneacetic acid
g	Gram
μ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Darjah selsius
%	Peratus
MS	Media MS(Murashige dan Skoog 1962)
mg	miligram



BAB 1

PENDAHULUAN

Malaysia merupakan sebuah negara hutan tropika yang mempunyai kepelbagaian flora dan fauna. Malaysia digolongkan dalam negara terkaya yang mempunyai nilai ubatan dan estetika yang tinggi dalam masyarakat dalam konteks floranya. Kawasan hutan tropika yang luas dan tertua di dunia menjadikan Malaysia sebagai tumpuan para penyelidik untuk mengkaji sumber flora yang masih belum dijalankan dengan lebih mendalam.

Phyllanthus niruri yang juga dikenali sebagai Dukung Anak di Malaysia merupakan herba ubatan yang penting dari famili *Euphorbiaceae* (De Padua *et al.*, 1999). Sesetengah spesies *Phyllanthus* telah digunakan di India sejak 2000 tahun dahulu dalam sistem perubatan Ayurveda, Unani dan Siddha terutamanya untuk merawat penyakit demam kuning. Secara umumnya, *Phyllanthus* mempunyai ciri-ciri afrodisiak, diuretik dan pencahar (ubat pencuci perut yang kuat) dan digunakan dalam pelbagai rawatan penyakit asma, hepatitis, selsema, dopsi, penyakit urolitik (diabetes, batu karang dan sebagainya) (De Padua *et al.*, 1999).

Teknik kultur tisu dapat membiakkan dan menggandakan spesies *P. niruri*, dan juga kepada tumbuhan yang lain. Teknik kultur tisu dapat menghasilkan bilangan



pokok yang lebih banyak dalam jangka masa yang singkat jika dibandingkan dengan cara penanaman biasa. Selain itu, tumbuhan yang dihasilkan melalui teknik ini juga lebih homogenus (Endress, 1994).

Daripada kajian dahulu, ahli saintis telah berjaya membiakkan spesies *Phyllanthus* melalui dua kaedah iaitu kalus terbentuk daripada kultur tisu meristem (Khimaru *et al.*,1992), manakala bijih benih bercambah di bawah cahaya (De Padua *et al.*,1999).

Somatik embriogenesis mempunyai sumbangan besar kepada bidang biologi dan agrikultur kerana teknik tersebut membolehkan kita mempelajari dan menganalisis tindak balas biokimia dalam tumbuhan (Crouch, 1982). Embrio somatik dapat dihasilkan dengan mengkulturkan komponen daripada eksplan atau kalus.

Selain itu, somatik embriogenesis dapat membantu bidang pertanian untuk menghasilkan 'artificial seed' demi kemudahan penyelarasan pernanaman (Ammirato, 1987). Pada hal itu, dengan menggunakan teknik somatik embriogenesis, tumbuhan ubatan dapat diperbanyakkan dengan cepat dan berkesan.

Oleh sebab itu, objektif kajian ini adalah untuk,

1. Menentukan kesan NAA terhadap pengaruh somatik embriogenesis.



BAB 2

ULASAN LITERATUR

Kultur tisu didefinisikan sebagai pertumbuhan sel, tisu, organ tumbuhan secara *in vitro* di atas media yang dibekalkan dengan nutrien yang bersesuaian (Gamborg dan Phillips, 1995).

Haberlandt (1902) seorang ahli sains Jerman yang pertama mencuba menggalakkan pembahagian sel tisu tanaman dalam medium buatan. Beliau telah membuka jalan bidang kultur tisu. Beliau turut berjaya mengkultur 'artificial embryo' daripada somatik embrio pada tahun 1902 (Yap dan Mohd, 1990).

Somatic embryos dapat dihasilkan dengan menggunakan komponen makro inorganik, komponen micro inorganik, potassium dalam kepekatan 12mM hingga 40 mM dan ion ammonium dengan kepekatan 10mM (Vajrabhaya, 1990).

Tumbuhan ubatan ialah tumbuhan yang mempunyai ciri-ciri yang dapat menyembuhkan penyakit. Sebenarnya, bahan organik atau bahan kimia dalam tumbuhan tersebut yang menghasilkan ciri-ciri tersebut (Payne *et al.*, 1992).



Pada masa kini, kepelbagaian genetik tumbuhan terutamanya tumbuhan ubatan dapat meringankan atau mengubati pelbagai penyakit. Pada tahun 1985, 3500 struktur bahan kimia baru dikenalpasti, sebanyak 2619 adalah daripada tumbuhan. Terdapat sebanyak 121 preskripsi ubat yang digunakan di klinik adalah dihasilkan daripada tumbuhan ubatan (Payne *et al.*, 1992).

2.1 Morfologi dan Habitat

Genus *Phyllanthus* adalah daripada famili Euphorbiaceae yang mempunyai lebih kurang 600 spesies tumbuhan yang terdiri daripada pokok herba, pokok renek dan pokok tinggi (Ishimaru *et al.*, 1992). Ia banyak dijumpai di kawasan tropika. Terdapat 100 spesies *Phyllanthus* di Africa dan kira-kira 200 spesies *Phyllanthus* dijumpai di benua Amerika. 100 spesies *Phyllanthus* dijumpai di Malaysia (De Padua *et al.*, 1999).

P. niruri merupakan pokok herba monokot. Tumbuhan ubatan tersebut mempunyai ketinggian 60cm dengan cabang atau dahan yang dipenuhi daun. Ia mempunyai daun berwarna hijau muda atau kemerahan dan berdiameter 0.1 hingga 0.2cm. Pokok herba tersebut mempunyai akar tunjang berwarna putih, cabangnya berukuran kira-kira 4-12cm dan mempunyai lebih kurang 15-30 helai daun pada setiap cabang. Daunnya berbentuk 'elliptical-oblong' atau bujur telur bersaiz 5-11mm. Buahnya atau bijinya berdiameter antara 1.8-2.5mm, bersifat licin dan berkedudukan di bawah pelepah daun (De Padua *et al.*, 1999).



rumah hijau pada suhu 15°C menunjukkan kurang aktiviti perencatan ke atas DNA polymerase virus hepatitis marmot (WHV- 'Woodchuck hepatitis virus') berbanding dengan tumbuh pada suhu 25°C.



Foto 2.1: Pokok *P. niruri*

2.2 Taksonomi dan Ekologi

Nama *Phyllanthus* berasal dari bahasa Greek. Phylla bermaksud daun dan anthos bermaksud bunga (Evereet, 1981). Terdapat sesetengah spesies pokok *Phyllanthus* dijadikan pokok hiasan untuk taman atau dalam pasu bunga. Contoh spesies ini ialah *Phyllanthus acidus* dan *P. arborescens* yang berasal dari Jawa.

Manakala sesetengah spesies *Phyllanthus* adalah dijadikan tumbuhan ubatan. Contohnya spesies *P. niruri* (juga dikenali *P. amarus*), *P. sellowianus muller* Arg dan sebagainya. Subgenera *Phyllanthus* yang dimiliki oleh subfamili *Phyllanthodendron* dan *Sauropus* yang mana kesemuanya mempunyai cabang atau dahan daripada pokok

sebagainya. Subgenera *Phyllanthus* yang dimiliki oleh subfamili Phyllanthodendron dan Sauropus yang mana kesemuanya menunjukkan pencabangan Phyllanthiod iaitu cabang atau dahan daripada pokok dipenuhi oleh daun yang tersusun bersilih ganti (De Padua et al., 1999). *P.niruri* dipilih sebagai tumbuhan ubatan kajian dan nama botani dikenali sebagai dukung anak (De Padua et al., 1999).

P.niruri sering didapati di kawasan lembah serta kawasan lapang dan padang. Oleh sebab itu, ia senang dijumpai di sekitar rumah, kebun dan padang. *P.niruri* adalah tumbuhan ubatan yang berasal daripada Amerika (De Padua et al., 1999). Ia juga ditemui di selatan India hingga ke Sri Lanka dan seluruh Malaysia.

2.3 Kegunaan

Dalam famili *Euphorbiaceae*, terdapat banyak spesies tumbuhan yang lain yang juga mempunyai sifat-sifat terapeutik. Contohnya *Macaranga tanarus* (Mahang), *Euphorbia trucealli* (tetulang), *Jatropha Tanarius* (jarak) dan sebagainya (De Padua et al., 1999).

Pokok *P.niruri* merupakan herba perubatan yang penting mahupun dahulu atau pada hari ini. Semua bahagian pokok *P.niruri* dapat digunakan dalam penghasilan ubat. Kegunaannya telah direkodkan sejak dahulu dan diwarisi (Lancet, 1988).

Di Indonesia, *P.niruri* amat berkesan bagi mengubati penyakit buah pinggang, hati, sakit perut serta penyakit venereal. Merujuk kepada perubatan Ayurveda, *P.niruri* mempunyai ciri-ciri antidiarhetik, astringen, antiseptik. Oleh demikian, ia



sesuai digunakan untuk merawat penyakit dispepsia, cirit-birit, demam, dropsi dan diabetes (De Padua *et al.*, 1999). Cara pemakanan ubat *P.niruri* adalah merebus tumbuhan tersebut dengan jintan manis dan sedikit gula kemudian air rebusan diminum.

Pokok tersebut bukan sahaja menjadi ubat minuman, bahkan pokok yang dihancurkan juga dapat digunakan secara luaran untuk merawat luka dan kudis.

Air rendaman pokok yang telah disejukkan boleh digunakan untuk menyembuhkan sakit kepala atau migrain. Daun dan buah *P.niruri* digiling dan diadun bersama susu mentega, bawang putih dan lada dapat merawat demam kuning (De Padua *et al.*, 1999).

Di Amerika Selatan, *Phyllanthus niruri* digunakan sebagai ubat penyakit malaria, masalah buah pinggang dan penyakit pundi kencing (Fasihuddin dan Hasmah, 1993). Di Tanga (timur laut Tanzania), penduduk tersebut menggunakan ekstrak akues tumbuhan ini untuk merawat penyakit diabetes melitus. Disebaliknya, penduduk Nigeria menggunakan ekstrak akues bahan pokok yang dikeringkan digunakan untuk merawat cirit-birit.

Bagi ibu-ibu yang lepas bersalin, daun tumbuhan *P.niruri* ditumbuk bersama-sama dengan lada putih dan bawang merah. Air perahan diminum sebagai fonik. Selain itu, tumbuhan ini boleh direbus dengan bersama bonglai kayu yang dicampur dengan sedikit lada sulah dan bawang merah. Air rebusan itu diminum selepas direbus. Daunnya ditumbuk dan ditampal pada bahagian kepala yang sakit atau



sengal-sengal tulang yang dihadapi oleh ibu-ibu yang baru bersalin serta boleh mengubati bisul (Lancet, 1988).

2.4 Komponen Aktif

Phyllanthus niruri merupakan tumbuhan ubatan yang mengandungi unsur-unsur seperti berikut:

Jadual 2.1 Komponen yang terkandung dalam pokok *P.niruri*.

Komponen	Rujukan
Lignan	Schneiders dan Stevenson, 1982; Satyanarayana <i>et al.</i> ,1988; Singh <i>et al.</i> , 1989.
Flavonoid	Hnatyszyn <i>et al.</i> , 1987
Alkoloid	Mulchandani dan Hassarajani, 1984; Joshi <i>et al.</i> ,1986.
Asid Phtalik	Singh <i>et al.</i> ,1986
Tannin	Foo dan Wong,1992; Foo, 1993

Unsur yang paling penting dalam herba ubatan *P.niruri* ialah Tannin (contohnya, polifenol molekul tinggi) sama seperti antivirus (hepatitis) dan aktiviti perencantan oleh enzim 'angiotensin converting' (Bajaj, 1999).

Alkaloid jenis quinolizidine telah dilaporkan dijumpai pada *Phyllanthus niruri* (phyllantine, securinine, norsecurinine, isobubbialine, epibubbialine) dan pada *P. Discoides* (allosecurine, phyllantidine, phyllantine) (De Padua *et al.*, 1999).

2.5 Teknik Kultur Tisu

Golthich Haberlandt merupakan orang Jerman yang pertama menjalankan kultur tisru pada tahun 1902 ke atas sel daun fotosintetik dan sel membeza yang lain. Beliau dikenali sebagai Bapa Kultur Tisu Tumbuhan (Yap dan Mohammad, 1990).

Unander pada tahun 1991 dan 1996 telah berjaya mendapat kalus daripada empat spesies herba iaitu *P.amarus* (*P.niruri*), *P.abnormis*, *P.uriaria* dan *P.caroliniensis* di atas medium MS yang diubahsuai (Murashige dan Skoog, 1962).

Embrio somatik yang didapat pada kultur dinamakan 'embryoid'. Steward dan rakan sekerjanya melaporkan kejadian somatik embriogenesis yang pertama pada tahun 1958 (Vajrabhaya, 1984). Merunut kajian Steward, kalus lobak membentuk 'torpedo-shaped' daripada 'suspension culture'. Selepas itu, banyak spesies telah digunakan untuk menjalani somatik embriogenesis seperti *Ranunculus sceleratus* (Konar *et al.*, 1969 dan *Nicotiana tabacum* (Aruga *et al.*, 1985). Pada masa kini, terdapat lebih daripada 30 famili telah digunakan untuk menjalani eksperimen somatik embriogenesis (Bajaj, 1995).



Jadual 2.2 Jenis Tumbuhan yang telah digunakan menjalani eksperimen somatik embriogenesis.

Jenis Spesies	Rujukan
<i>Anagallis arvensis</i> L.	Vajrabhaya (1984)
<i>Asclepias curassavica</i> L.	Prabhudesai dan Narayanaswamy (1973)
<i>Asparagus officinalis</i> L.	Vajrabhaya (1984)
<i>Atropa belladonna</i> L.	Konar <i>et al.</i> (1972)
<i>Brassica oleracea</i> var. Broytis.	Vajrabhaya (1984)
<i>Carum carvi</i> L.	Ammirato (1974)
<i>Citrus sinensis</i> var. "Shamonti" orange	Vajrabhaya (1984)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Steward <i>et al.</i> (1958)
<i>Coffea arabica</i> L.	Sondahl dan Sharp (1977)
<i>Daucus carota</i> L.	Steward <i>et al.</i> (1958)
<i>Foeniculum vulgare</i> Goert.	Vijrabhaya (1984)
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Vijrabhaya (1984)
<i>Macleaya cordata</i> R.Br.	Kohlenbach (1965)
<i>Nicotianum tabacum</i> var. Samsun	Lorz <i>et al.</i> (1977)
<i>Petunia inflata</i> R. Fries	Handro <i>et al.</i> (1973)
<i>Pinus ponderosa</i> Dougl	Vijrabhaya (1984)
<i>Ranunculus sceleratus</i> L.	Yamada <i>et al.</i> (1967)

Dalam somatik embriogenesis, terdapat 4 peringkat perkembangan somatik embrio;

- 1) 'globular stage'
- 2) 'heart-shaped stage'
- 3) 'torpedo stage'
- 4) 'plantlet'

2.6 Faktor-faktor mempengaruhi pengkulturan tisu

2.6.1 Media Kultur

Media kultur yang sesuai adalah sangat penting bagi mengkultur tisu atau sel secara *in-vitro*. Media disediakan dengan merujuk campuran kompaun bahan kimia tertentu untuk membentuk gel atau cecair yang bernutrien untuk pertumbuhan kultur. Sel, tisu dan organ yang berlainan mempunyai keperluan media yang berbeza. Oleh sebab itu, kombinasi kompaun media yang baru perlu diuji untuk setiap sistem baru.

Dalam kajian ini, hanya satu media digunakan iaitu media MS (Murashige dan Skoog, 1962) dalam keadaan pepejal atau agar. pH media ditetapkan pada pH 5.7.

Komponen asas kebanyakan medium ialah ;



Rujukan

- Ammirato, P.V, 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan R. Liss Inc., New York, USA. 57-81.
- Arditti, J. dan Ernst, R. 1992. *Micropropagation of Orchids*. New York. John Wiley & Sons, Inc.
- Arnold S. Von, Egertsdotter U. and Mo L.H. 1995. *Importance of Extracellular Proteins for Somatic Embryogenesis in Picea abies*. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. 389-392.
- Aruga, K., T.Nakajima and K.Yamamoto. 1985. Embryogenic induction in pollen grains of *Nicotiana Tabacum L.*, *Japan Journal Breeding* **35**: 50-58.
- Ashby, M., 1961. *An Introduction to Plant Ecology*. Ed.Ke-2. The Mac Millian Pres LTD, London.
- Bachmann, T.L., Ghia, F. dan Torrsell, K.B.G., 1993. Lignans dan Lactones from *Phyllanthus anisolobus*. *Phytochemistry* **33**, 198-191.
- Bajaj, Y.P.S (eds), 1999, Genetic Transformation of *Phyllanthus niruri L. (P.amarus)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, German. *Biotechnology in Argriculture and Forestry: Transgenic Medicinal Plants*. Dlm: Ishimaru, K., Yoshimatsu, K., Yamakawa, T., Kamada, H. dan Shiromura, K.
- Brown, S., Wetherell, D.F. dan Dougall, D.K. 1976. The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiologia Plantarum* **37**: 73-79.



- Crouch, M.L. 1982. Non-Zygotic Embryos of *Brassica napus* L. Containing Embryo Specific Storage Proteins. *Planta* **156**: 520-524.
- De Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. dan Lemmens, R.H.M.J. (eds), 1999. *Plant Resources of South-East Asia No 12 (1); Medicinal and Poisonous Plants 1*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Endress, R., 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer, New York.
- Fasihuddin Ahmad dan Hasmah Rajj, 1993. *Kimia Hasil Semulajadi dan Tumbuhan Ubatan*. Dewan bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Foo, L.Y. dan Wang, H., 1992. Phyllanthus D, an unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* **31**, 711-713.
- Gamborg, O.L. dan Phillips, G.C. (eds), 1995. *Plant cell, tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, German.
- Hnatyszyn, O., Ferraro, G. dan Coussio, J.D., 1987. A biflavonoid from *Phyllanthus sellowianus*. *J Nat Prod* **50**, 1156-1157.
- Ishimaru, K., Yoshimatsu, K., Yamakawa, T., Kamada, H. dan Shimomura, K., 1992. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry* **31**, 2015-2018.
- Joshi, B., Gawad, D.H., Pelletier, S.W., Kartha, G. dan Bhandary, K., 1986. Isolation and structure (X-ray Analysis) of ent-norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* **49**, 614-620.



- Kohlenbach, H.W. 1978. *Comparative Somatic Embryogenesis. In Frontiers of Plant Tissue Culture (T.A. Thorpe, ed.)*. International Association of Plant Tissue Culture, Calgary, Canada. 59-66.
- Konar, R.N., Thomas, E. dan Street, H.E., 1972. The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladonna* L. *Annals of Botany* **36**: 249-258.
- Lancet, 1988. Bahupatra, *Phyllanthus niruri*. *Am.Soc. Bull.* **33**, 116-120.
- Lewis, R., Gaffin, D., Hoefnagels, M. dan Parker, B., 1998 *Life*. Ed. Ke-4. Mc-Graw Hill, New York.
- Mulchandani, N.B. dan Hassarajani, S.A., 1984. 4-methoxy-nor-securinine, A new alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *Planta Med* **50**, 104-105.
- Murashige.T., 1979. Principles of rapid propagation through tissue culture. *Physiol Plant* **25**, 135-166.
- Murashige, T. dan Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 431-497.
- Nitsch, JP. dan Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**, 85-87.
- Pareek, A dan Kothari, S.L., 2003. Direct somatik embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae* **98**, 449-459.
- Payne, G.F. Bringi, V., Prince, C.L. dan Shuler, M.L., 1992. *Plant cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. John Wiley and Sons, Inc., Canada.



- Reinert, J. 1973. Aspect of organization organogenesis and embryogenesis. In *Plant Tissue and Cell Culture* (H.E. Street, ed). Blackwell Scientific Publication, London, England. 338-355.
- Satyanarayana, P., Subramniam, P., Vishwanatham, K.N. dan Ward, R.S, 1988. New seco-and hydroxylignans from *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* **51**, 44-49.
- Schenk, R.U. dan Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and technique for induction of growth of monocotyledonous, and dicotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany* **50**, 166-204.
- Schneiders, G.E. dan Stevenson, R., 1982. Structure and synthesis at the aryletralin lignans hypophyllanthin and nirtetralin. *JC Soc Perkin* **1**, 999-1003.
- Steward, F.C., M.O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of culture cells 2. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* **45**, 705-708.
- Singh, B., Agrawal, P.K. dan Thakur, R.S., 1986. Chemical constituents of *Phyllanthus niruri* Linn. *Indian J Chem* **25B**, 600-602.
- Syamasundar, K.V., Singh, B., Thakur, R.S., Husain, A., Kiso, Y. dan Hikino, H., 1985. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. *J Ethanopharmosol* **14**, 41-44.
- Tempesta, M.S., Corley, D.G., Beutler, J.A., Metral, C.J., Yunes, R.A., Giacomozzi, C.A. dan Calixto, J.B., 1988. *Phyllanthimide*, A new alkaloid from *Phyllanthus Sellowiannus*. *J Nat Prod* **51**, 617-618.
- The Encyclopedia of Horticulture, 1981: Volume 8: *Phyllanthus*: The New York Botanical Garden. Everett, T.H., Garland Publishing, New York.



- Thomas, E. dan Davey, M.R., 1975. *From Single Cells to Plant*. Wykehom Publication, London.
- Vajrabhaya, M. 1984. Embryogenesis. *Progress Report* **2**, 1-9.
- Wang, J., Denise, M., Seliskar dan John L.G., 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monocot *Scirpus robustus*. *Aquatic Botany* **79**, 163-174.
- Wehterell, D.F. and Dougall, D.K., 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiologia Plantarum* **37**: 97-103.
- White, P.R. 1963. *A Handbook of Plant and Animal Tissue Culture*. Jaques Cattel Press, Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Yap, T.C dan Mohd, S.S., 1990. *Pembiakan Tumbuhan*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.

