

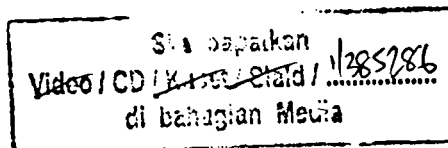
KAJIAN AWAL KESAN EJEN MUTASI EMS (ETIL METANASULFONAT)
TERHADAP AKTIVITI ANTIOKSIDAN *Labisia pumila* var. *lanceolata* IN-VITRO

NICHOLAS JR KEER

DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN DARIPADA
SYARAT MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
FAKULTI SAINS DAN SUMBER ALAM
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



2013

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS



JUDUL: KAJIAN AWAL KESAN EBEN MUTASI EMS (ETL MATANASU TERHADAP AKTIVITI ANTIOKSIDAN YABISIA PUMILA YAR. LAN IN VITRO

IJAZAH: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN BIOTEKNOLOGI

SAYA: NICHOLAS JR KEE SESI PENGAJIAN: 2011-2014
(HURUF BESAR)

Mengaku membenarkan tesis *(LPSM/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 AKTA RAHSIA RASMI 1972)

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

TIDAK TERHAD

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Disahkan oleh NURULAIN BINTI ISMAIL
LIBRAHIAN

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Nicholas
(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat tetap: K9 - Penampang Baru,
88600 KAPAK
SABAH

Hartini MARGAWIE
NAMA PENYELIA

Tarikh: 27 / JUNE / 2014

Tarikh: 27 / JUNE / 2014

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 disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM)

PERPUSTAKAAN UMS



* 1000358285 *

PENGAKUAN

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




NICHOLAS JR KEER
(BS11110421)
20 DISEMBER 2013

DIPERAKUKAN OLEH

PENYELIA

(CIK HARTINIE MARBAWI)

TANDATANGAN

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Hartinie Marbawi', written over a horizontal line.

PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin mengucapkan syukur dan terima kasih kepada ibu bapa saya kerana sokongan tanpa henti yang diberikan kepada saya untuk menyiapkan projek akhir tahun ini.

Setinggi-tinggi penghargaan dan ribuan terima kasih saya ucapkan kepada Puan Hartinie Binti Marbawi, Pensyarah Bioteknologi, Sekolah Sains dan Teknologi selaku penyelia projek tahun akhir saya. Bantuan yang diberikan oleh beliau dari segi bimbingan dan tunjuk ajar amatlah saya hargai. Tidak lupa juga kepada Dr. Jualang Azlan Gansau yang menjadi penasihat sepanjang tempoh projek ini disiapkan.

Ribuan terima kasih juga saya ingin ucapkan kepada Puan Marrylyn Tadi selaku pembantu makmal bagi Makmal Tisu Kultur, Sekolah Sains dan Teknologi. yang membantu menyediakan radas-radas dan bahan-bahan yang diperlukan sepanjang kajian projek ini. Terima kasih juga kepada Pn. Judi iaitu pelajar PhD kerana tunjuk ajar yang diberikan.

Akhir sekali saya ingin mengambil kesempatan ini kepada rakan-rakan seperjuangan iaitu Zakiah Zaid dan Rizennor bt Ali kerana bantuan dan sokongan yang diberikan. Tidak lupa juga rakan-rakan lain yang turut menabur jasa sepanjang tempoh projek akhir tahun ini.

ABSTRAK

Labisia pumila atau lebih dikenali sebagai Kacip Fatimah dikenali kerana mengandungi nilai perubatan seperti antioksidan terutama kepada kaum wanita. Oleh itu, kajian dijalankan untuk mengenalpasti tumbuhan yang mempunyai aktiviti antioksidan yang tertinggi daripada stok kultur *in-vitro* *Labisia pumila* var. *lanceolata* untuk dikekalkan. Sepuluh kultur induk daripada tumbuhan ini dipilih secara rawak berdasarkan morfologi yang berbeza untuk disubkultur ke atas media Murashige & Skoog dengan dua kali ganda kepekatan vitamin. Selepas tujuh bulan, hujung pucuk daripada tiga tumbuhan terpilih dirawat menggunakan 250mM mutagen etil metanasulfonat (EMS) dan dikultur semula di atas media baru selama 2 bulan. Bahagian *Labisia pumila* var. *lanceolata* yang selebihnya diekstrak menggunakan metanol tulen. Hasil pengekstrakan digunakan untuk menentukan aktiviti antioksidan dengan menggunakan ujian memerangkap radikal bebas DPPH dan digunakan sebagai kawalan dalam kajian ini. Bacaan serapan yang diperolehi digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Nilai aktiviti antioksidan yang tertinggi adalah daripada sampel L4 (39.73 ± 3.83) diikuti dengan L5 (39.86 ± 3.53) dan L7 (42.14 ± 2.43) dalam $\mu\text{g/ml}$. Setelah dua bulan, kultur hujung pucuk yang telah dirawat EMS diekstrak untuk ujian DPPH. Hasil nilai IC_{50} yang diperolehi adalah L4 (31.51 ± 4.16), L5 (41.94 ± 2.73) dan L7 (52.50 ± 5.18) dalam $\mu\text{g/ml}$. Hasil ini menunjukkan bahawa berlaku peningkatan pada aktiviti antioksidan bagi sampel L4 dan pengurangan bagi sampel L5 dan L7. Walaupun hanya satu daripada tiga sampel yang dipilih menunjukkan peningkatan aktiviti antioksidan, EMS mempunyai potensi dalam meningkatkan aktiviti antioksidan *Labisia pumila* var. *lanceolata*.

ABSTRACT

Labisia pumila or famously known as Kacip Fatimah are recognized for its medical value such as antioxidant medicinal value especially to women. Therefore, a research study has been done to identify *Labisia pumila* var. *lanceolata* in-vitro stock culture with the highest antioxidant activity and will be maintained. Ten mother plant are selected randomly based on their morphology and subcultured in Murashige & Skoog media with two times vitamin concentration. After seven month, shoot tips from three of the selected plant are treated with 250mM ethyl methanesulfonate(EMS) mutagen and cultured on the new media for 2 weeks. The rest of the plant part are extracted by using absolute methanol. This extract are used to determine the antioxidant activity by free radical scavenging activity DPPH test. Absorbance obtained are used to determine IC_{50} value. Highest antioxidant activity shown by sample L4 (39.73 ± 3.83) followed by L5 (39.86 ± 3.53) dan L7 (42.14 ± 2.43) in $\mu\text{g/ml}$. After two month, shoot tips culture treated with EMS extracted for DPPH test. From the test, IC_{50} value shown are L4 (31.51 ± 4.16), L5 (41.94 ± 2.73) dan L7 (52.50 ± 5.18) in $\mu\text{g/ml}$. This shows increase in antioxidant activity for sample L4 and decrease in sampel L5 dan L7. Therefore, EMS mutagen shows a great potential in increasing *Labisia pumila* var. *lanceolata* antioxidant activity.

KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	i
PENGESAHAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL DAN UNIT	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENGENALAN	1
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	3
2.1. <i>Labisia pumila</i> (Kacip Fatimah) var. <i>lanceolata</i>	3
2.1.1. Taksonomi	3
2.1.2. Ciri-ciri Fizikal	4
2.1.3. Taburan Geografi	5
2.1.4. Kegunaan Tradisional	6
2.1.5. Kajian Saintifik	7
2.2. Kultur Tisu	8
2.2.1. Kelebihan Kultur Tisu	8
2.2.2. Faktor Mempengaruhi Kultur Tisu	10
2.3. Mutagen	11

2.3.1.	Kesan Mutagen Terhadap Tumbuhan	11
2.3.2.	Etil Metanasulfonat (EMS)	14
2.4.	Fitokimia	16
2.5.	Antioksidan	16
2.5.1.	Aktiviti Antioksidan dan Antiradikal	17
2.5.2.	Ujian DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	18
BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	19
3.1.	Carta Alir Kajian	19
3.2.	Penyediaan Larutan Stok Bagi Media MS	20
3.3.	Penyediaan Media MS	21
3.4.	Pengkulturan Sampel	22
3.5.	Penyediaan Ekstrak Metanol	23
3.6.	Rawatan Mutagen	24
3.6.1.	Rawatan Etil Metanasulfonat (EMS)	24
3.7.	Ujian Aktiviti Antioksidan	25
3.7.1.	Ujian Memerangkap Radikal Bebas DPPH	25
3.8.	Analisa Data	26
BAB 4	KEPUTUSAN	27
4.1.	Pengkulturan Sampel	27
4.2.	Pengekstrakan Sampel	31
4.3.	Ujian Memerangkap Radikal Bebas DPPH	33
BAB 5	PERBINCANGAN	37
5.1.	Pengkulturan Sampel	37

5.2.	Ujian Memerangkap Radikal Bebas DPPH	39
5.3.	Kesan Rawatan Mutagen EMS Terhadap Aktiviti Antioksidan Sampel	41
BAB 6	KESIMPULAN	43
	RUJUKAN	44
	LAMPIRAN	58

SENARAI JADUAL

NO. JADUAL	MUKA SURAT
2.1. Perbezaan antara varieti <i>L. pumila</i> (<i>lanceolata</i> , <i>pumila</i> dan <i>alata</i>) berdasarkan ubahsuaian daripada Stone et al., Zahri et al., dan glosari bentuk tumbuhan dalam laman web http://www.flora.dempstercountry.org/Leaf.Glossary.html .	4
3.1. Komposisi media MS yang dirujuk daripada Murashige & Skoog (1962).	20
4.1. Hasil pengekstrakan sampel kawalan menggunakan metanol	32
4.2. Hasil pengekstrakan sampel yang dirawat menggunakan mutagen EMS	32
4.3. Nilai IC ₅₀ DPPH bagi sampel L4, L5 dan L7 yang dipuratakandaripada tiga replikat <i>L. pumila</i> var. <i>lanceolata</i> .	35

SENARAI RAJAH

NO. RAJAH	MUKA SURAT
2.1. Taburan geografi dunia <i>L. pumila</i> berdasarkan ubahsuaian daripada Jamia &Houghton (2000) dan lakaran peta dunia daripada laman web http://commons.wikimedia.org/wiki/File:A_large_blank_world_map_with_oceans_marked_in_blue.PNG .	5
2.2. Struktur kimia etil metanasulfonat (EMS) (Ottoline & Ian, 2002)	14
3.1. Ringkasan perjalanan keseluruhan kaedah yang digunakan dalam projek	19
4.1. Keluk piawai yang mewakili peratusan aktiviti memerangkap piawai galik asid dengan kepekatan yang berbeza. Kaluk ini diplot dengan peratus (%) aktiviti memerangkap radikal bebas melawan kepekatan galik asid.	33
4.2. Keluk yang mewakili peratusan aktiviti memerangkap radikal bebas sampel Asid Galik sebagai piawai, sampel L4, sampel L5 dan sampel L7 dengan kepekatan yang berbeza. Peratus (%) aktiviti memerangkap radikal bebas melawan kepekatan galik asid atau sampel ($\mu\text{g/ml}$).	34
4.3. Keluk yang mewakili peratusan aktiviti memerangkap radikal bebas sampel yang dirawat menggunakan mutagen EMS sampel L4, sampel L5 dan sampel L7 dengan kepekatan yang berbeza. Peratus (%) aktiviti memerangkap radikal bebas	34

melawan kepekatan asid galik atau sampel ($\mu\text{g/ml}$).
Keluk asid galik digunakan sebagai piawai.

SENARAI FOTO

NO. FOTO	MUKA SURAT
2.1. Produk-produk inovasi <i>L. pumila</i> yang digunakan pada hari ini untuk tujuan pemakanan, perubatan dan tonik. Dipetik daripada https://www.google.com/search?q= produk+kacip+fatimah	6
3.1. Stok kultur <i>in-vitro</i> <i>L. pumila</i> var. <i>lanceolata</i> di Makmal Tisu Kultur, SST, Universiti Malaysia Sabah.	22
4.1. Kultur induk <i>in-vitro</i> <i>Labisia pumila</i> var. <i>lanceolata</i> yang dipilih secara rawak untuk disubkultur berdasarkan morfologi dan kesuburan. Setiap sampel masing-masing dilabel L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9 dan L10	28
4.2. Tiga sampel yang dipilih setelah dikultur secara tiga replikat selama tujuh bulan berdasarkan kesuburan dan tumbesaran iaitu sampel L4, L5 dan L7	29
4.3. Langkah keseluruhan dalam ujian aktiviti antioksidan bermula daripada pemilihan kultur	30
4.4. Ekstrak daripada sampel L4, L5 dan L7 yang dipekatkan menggunakan metanol.	31

SENARAI SIMBOL DAN UNIT

SIMBOL	UNIT
(γ)	Gamma
Gy	Gray
nm	Nano meter
L	Liter
mL	Mililiter
μ L	Microliter
g	Gram
mg	Miligram
μ g	Microgram
pH	$-\log_{10}[\text{H}^+]$
M	Molar, (Mol/L)
mM	Milimolar
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
%	Peratus
(w/v)	Berat/Isipadu
W_i	Berat awal
W_f	Berat akhir
Rpm	Revelosi per minit
ρ	Signifikan
NaN_3	Natrium azida
IC_{50}	Setengah kepekatan penghalang maksimum

SENARAI SINGKATAN

SINGKATAN	MAKSUD
<i>et al.,</i>	Dan yang lain
var.	Varieti
EMS	Etil Metanasulfonat
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Power
MS	Murashige & Skoog
TFC	Jumlah Kandungan Flavonoid
TPC	Ujian Jumlah Kandungan Polifenol
TPRO	Kandungan Proantosianidin
UNESCO	United Nations Educational Scientific and Cultural Organization
<i>L. pumila</i>	<i>Labisia pumila</i>
ERT	Terapi penggantian estrogen
TILLING	Targeting Induced Local Lesions In Genomes
G	Guanina
C	Sitosina
A	Adenina
T	Timinina
SOD	Superoksida
POD	Peroksida
UV	Ultra ungu
HPLC	Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi
PAL	Fenilalanina amonia liase
SST	Sekolah Sains dan Teknologi
GAE	Asid Galik
TPTZ	2,4,6-TripIridil-s-Triazina

BAB 1

PENGENALAN

Manusia telah mula menggunakan tumbuhan dalam pelbagai rawatan penyakit bermula ribuan tahun yang dahulu (Hong-Fang *et al.*, 2009). Sehingga hari ini, permintaan terhadap ubat-ubatan semakin tinggi menyebabkan banyak pengeluaran ubat-ubatan sintetik dibuat dari kilang-kilang perubatan. Walau bagaimanapun, perubatan secara organik dan semula jadi masih lagi menjadi pilihan pengguna dalam merawat pelbagai masalah kesihatan manusia di seluruh dunia (Unnikrishnan, 2010). Kerana hal ini, permintaan tumbuhan herba tidak pernah merudum untuk kegunaan perubatan tulen, tonik, anti-venom, perisa tambahan, dan sebagainya. Hutan tropika di Malaysia dianggarkan berusia hampir 130 juta tahun dan dijadikan sebagai Taman Negara oleh UNESCO pada tahun 1964. Taman Negara juga digelar sebagai "Hutan Farmasi" mempunyai lebih daripada 1,200 jenis tumbuhan perubatan dan banyak lagi telah bersedia untuk diterokai (Alfred *et al.*, 2010).

Salah satu herba yang mendapat perhatian pada masa kini di Malaysia adalah Kacip Fatimah atau dengan nama saintifik *Labisia pumilla*. Herba ini boleh ditemui dalam lokasi di seluruh Malaysia termasuklah di Sabah. Kacip fatimah adalah sangat popular di kalangan masyarakat Malaysia terutamanya kaum wanita. Salah satu sebabnya adalah kerana kandungan fenolik khususnya antioksidan yang berpotensi untuk mencegah dan mengubati pelbagai masalah kesihatan. Selain ubatan tulen, Kacip Fatimah juga boleh ditemui pada masa kini dalam produk kecantikan, minuman, makanan dan sebagainya. Dalam erti kata lain, permintaan terhadap tumbuhan ini amat tinggi dan boleh menyebabkan kepupusan Kacip fatimah jika dituai daripada hutan dengan jumlah yang banyak, berterusan dan tidak terkawal.

Dalam bidang bioteknologi, teknik tisu kultur digunakan untuk tujuan pemuliharaan spesies tumbuhan serta mengekalkan garis sel bagi tumbuhan yang mempunyai ciri-ciri yang tersendiri. Selain itu, teknik tisu kultur mempunyai kelebihan untuk menggandakan tumbuhan yang dipelihara dengan kuantiti yang banyak dalam tempoh yang singkat. Tisu kultur juga membuka peluang kepada penyelidik untuk mengkaji kandungan antioksidan melalui ujian-ujian fenolik. Setelah maklumat mengenai kandungan antioksidan diperolehi, kajian seterusnya boleh dilakukan seperti meningkatkan antioksidan tumbuhan yang dikaji. Salah satu kaedah yang berpotensi untuk meningkatkan aktiviti antioksidan dalam tumbuhan adalah melalui pengaruh mutasi (Nilesh *et al.*, 2010). Setakat ini, kajian-kajian yang dijalankan hanyalah analisis kandungan, kuantiti dan aktiviti sebatian antioksidan *L. pumila*. (Christopher *et al.*, 2011, Khairulet *et al.*, 2005, Ehsan *et al.*, 2013). Ini merupakan kajian pertama melibatkan kesan mutagen terhadap antioksidan *L. pumila*.

Oleh itu, kajian awal untuk meningkatkan kandungan antioksidan dengan menggunakan mutagen dilakukan terhadap *L. Pumilla* var. *lanceolata*. Beberapa kultur *in-vitro* bagi tumbuhan ini dipilih dan disubkultur. Hasil subkultur tumbuhan yang dipilih dan didorong mutasi diuji kandungan aktiviti antioksidan. Oleh itu, objektif dalam kajian ini adalah untuk:

1. Mengkaji kesan agen mutasi terhadap tumbuhan *in-vitro* yang terpilih untuk meningkatkan kandungan antioksidan.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1. *Labisia pumila* (Kacip Fatimah) var. *lanceolata*

Labisia pumila atau dengan nama poplarnya Kacip Fatimah merupakan salah satu tumbuhan berbunga yang tidak asing lagi terutamanya di Malaysia. Tumbuhan ini seringkali disamakan seperti Tongkat Ali bagi kaum hawa.

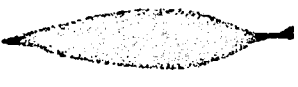


2.1.1. Taksonomi

Domain	: Eukariot
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridaplantae
Filum	: Tracheophyta
Subfilum	: Euphyllophytina
Infraclass	: Radiatopses
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Superorder	: Primulanae
Order	: Myrsinales
Famili	: Myrsinaceae
Genus	: <i>Labisia</i>
Spesifik epitet	: <i>pumila</i>
Varieti	: <i>lanceolata</i>
Nama botani	: <i>Labisia pumila</i> var. <i>lanceolata</i>

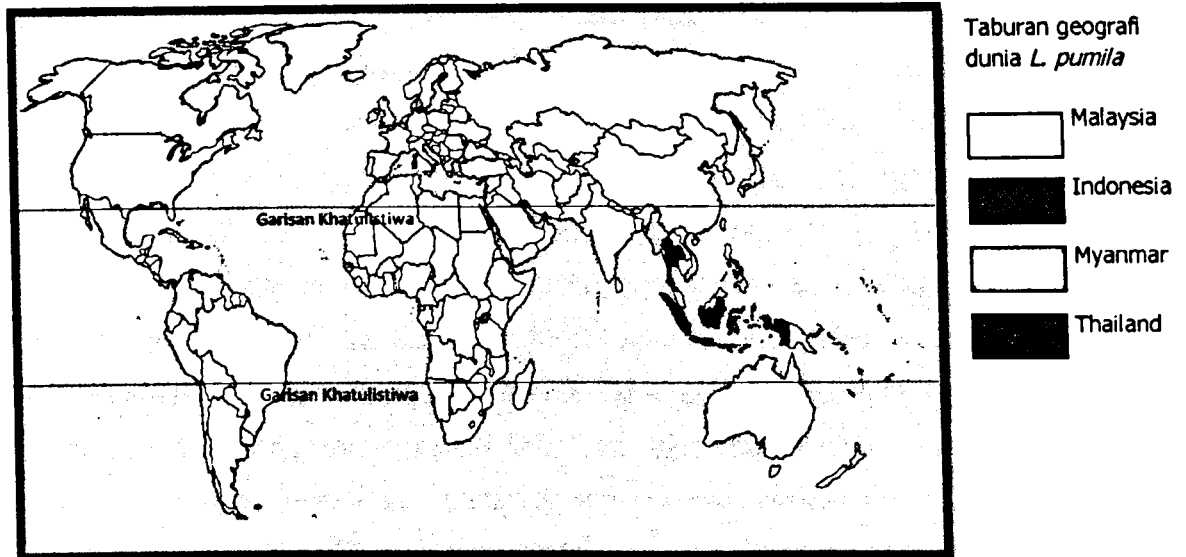
2.1.2. Ciri-ciri Fizikal

Tiga jenis varieti tumbuhan ini biasanya ditemui dalam Malaysia iaitu *L. pumila* var. *lanceolata*, *L. pumila* var. *pumila* dan *L. pumila* var. *alata*. Ketiga-tiga varieti tumbuhan adalah berbeza dari segi morfologi dan kemungkinan besar fisiologinya juga. Ketiga-tiga varieti ini dibezakan antara satu sama lain mengikut ciri-ciri daun dan tangkai daun yang menghubungkan daun dan batang tumbuhan (Stone, 1988). Tangkai daun *L. pumila* var. *pumila* adalah amat berdekatan dengan daun dan daunnya berbentuk bujur. Tangkai daun *L. pumila* var. *alata* pula adalah lebih lebar tetapi bentuk daunnya adalah sama seperti var. *pumila*. Manakala *L. pumila* var. *lanceolata* pula berbentuk silinder dan daunnya berbentuk tombak (Zahri *et al.*, 1999).

Jadual 2.1 Perbezaan antara varieti *L. pumila* (*lanceolata*, *pumila* dan *alata*) berdasarkan ubahsuaian daripada Stone *et al.* 2008, Zahri *et al.* 1999, dan glosari bentuk tumbuhan dalam laman web <http://www.flora.dempstercountry.org/Leaf.Glossary.html>.

<i>Labisia pumila</i>	var. <i>lanceolata</i>	var. <i>pumila</i>	var. <i>alata</i>
Bentuk Daun	 Tombak	 Oval	 Oval
Tangkai Daun	Silinder	Lebar	Hampir dengan tangkai

2.1.3. Taburan Geografi



Rajah 2.1 Taburan geografi dunia *L. pumila* berdasarkan ubahsuaian daripada Jamia & Houghton (2000) dan lakaran peta dunia daripada laman web http://commons.wikimedia.org/wiki/File:A_large_blank_world_map_with_oceans_marked_in_blue.PNG.

Selain di Malaysia, *L. pumila* juga dikenalpasti boleh ditemui di beberapa negara lain seperti Indonesia, Myanmar dan Thailand (Jamia & Houghton, 2000). Biasanya, tumbuhan ini dijumpai tumbuh meliar di dalam hutan tropika yang sejajar dengan garisan khatulistiwa bumi. Kawasan lembah yang terlindung dari sinaran matahari yang terik dan berkelembapan tinggi merupakan kawasan habitat bagi tumbuhan ini.

Tumbuhan ini juga dikatakan dapat tumbuh dengan keadaan yang subur di kawasan tanah yang mempunyai kuantiti bahan organik yang tinggi dan kawasan tanah di mana airnya mencukupi dan tidak bertakung, lebih kurang 150 kaki dari aras laut. Selain itu, tumbuhan ini juga memerlukan kuantiti sinaran matahari yang sesuai iaitu sebanyak 50 peratus. Apabila terdedah kepada sinaran matahari yang berlebihan, tumbuhan ini akan mati disebabkan pancaran UV yang merosakkan kandungan selular tumbuhan ini (Jamia & Houghton, 2000).

2.1.4. Kegunaan Tradisional

Untuk pengambilan *L. pumila* ini pula, secara tradisionalnya tumbuhan ini direbus dan ekstrak cecair yang diperoleh akan diminum begitu sahaja (Zainon *et al.*, 1999; Runi, 2001). Pada hari ini, bentuk ekstrak yang berkhasiat daripada tumbuhan ini telah ditambah baik dengan bantuan teknologi moden. Salah satunya adalah di mana ekstrak *L. pumila* akan dikeringkan dan ditukarkan kepada bentuk serbuk dan akan diproses untuk dijadikan dalam bentuk kapsul dan pil (Siti *et al.*, 2013). Selain khusus untuk tujuan perubatan, tumbuhan ini turut dapat diperolehi dalam bentuk makanan dan minuman pada hari ini. Sebagai contoh, khasiat Kacip Fatimah dapat digunakan dalam bentuk uncang sama seperti teh biasa yang boleh ditemui dalam pasaran. Tambahan pula, *L. pumila* kini dapat dijumpai dalam bentuk minuman paket, tin, serbuk dan sebagainya. (Singh *et al.*, 2009).



Foto 2.1 Produk-produk inovasi *L. pumila* yang digunakan pada hari ini untuk tujuan pemakanan, perubatan dan tonik. Dipetik daripada <https://www.google.com/search?q=produk+kacip+fatimah>

2.1.5. Kajian Saintifik

Kajian saintifik membuktikan bahawa *L. pumila* mempunyai pelbagai kesan perubatan seperti kesan antibakteria, anti-radang dan antioksidan (Karimi *et al.*, 2011). Kesan antioksidan mempunyai banyak kebaikan seperti anti-penuan, memberikan tenaga, memulihkan kecederaan sel dan banyak lagi (Ivana *et al.*, 2013). Penyakit seperti disentri, reumatik dan gonorea juga boleh menggunakan *L. pumila* sebagai penawar pesakit ini. Tambahan pula, Kacip Fatimah juga mujarab untuk menyingkir dan menghalang pembentukan gas dalam usus manusia dan menangani masalah sembelit (Varga & Veale, 1997).

Tumbuhan ini juga mampu menguatkan otot-otot abdomen dalam badan kerana kajian menunjukkan *L. pumila* mengandungi sebatian fito-estrogen (estrogen tumbuhan) yang secara semulajadi terkandung dalam tumbuhan. Selain itu, tumbuhan ini menunjukkan sifat mekanisma anti-karsinogenik di mana sel kanser akan melalui proses apoptosis jika didedahkan pada ekstrak *L. pumila*. Sifat ini adalah penting kerana dapat menghalang pembentukan sel tumor dan kanser (Azimahtol *et al.*, 2011). Selain itu, tumbuhan ini juga dikenalpasti mempunyai potensi mengelakkan dan merawat penyakit kronik seperti penyakit jantung, strok, kanser, penyakit pernafasan dan diabetes (Hazlina, 2013).

Kajian saintifik turut membuktikan bahawa *L. pumila* mempunyai kesan anti-nosiseptif dan analgesik. Kesan ini adalah penting dalam dunia perubatan kerana mampu melegakan kesakitan. Tambahan pula, penggunaan dan terapi penggantian estrogen (ERT) yang terhasil daripada *L. pumila* dapat mengelakkan ovariectomy (pembedahan putus haid) yang dipercayai menyebabkan pertambahan berat badan dan pertambahan adipos yang disebabkan oleh kekurangan hormon estrogen dalam badan (Ayida *et al.*, 2007).

2.2. Kultur Tisu

Salah satu prinsip bioteknologi merupakan kaedah atau teknik yang melibatkan penggunaan organisma yang hidup ataupun produk daripada organisma ini sebagai bahan pengubahsuaian (Zahner, 1978). Secara am, kultur tisul adalah teknik pengkulturan sel, tisul, organ dan bahagian tumbuhan yang lain dalam medium nutrien dengan keadaan yang steril (Thorpe, 2007). Tujuan kajian menggunakan teknik kultur tisul adalah dengan harapan tingkahlaku pelbagai komponen dalam tumbuhan-tumbuhan dapat dikaji. Kajian tumbuhan-tumbuhan ini akan membolehkan kita untuk mengenalpasti dan memanipulasi pelbagai potensi yang mendatangkan kebaikan. Ada beberapa jenis kultur yang tisul seperti kultur kalus, kultur protoplast, kultur sel ampai, serta kultur organ-organ tumbuhan yang lain (Street, 1997). Kebanyakan media kultur yang digunakan adalah media Murashige-Skoog (MS) (Bringmann *et al.*, 2002).

2.2.1. Kelebihan Kultur Tisu

Penyelidik tumbuhan biasanya terlibat dalam membesarkan tumbuhan yang baru dalam keadaan yang terkawal. Tumbuhan yang terlibat pula mungkin mempunyai kandungan genetik yang sama atau diubah. Ini boleh dicapai melalui kultur tisul yang hanya diperoleh daripada bahagian kecil tumbuhan yang ingin dikaji. Bahagian kecil tumbuhan ini biasanya diperoleh daripada satu pokok induk atau hasil pokok yang diperoleh daripada transformasi genetik daripada satu pokok yang sama. Bahagian kecil daripada pokok ini dibesarkan menjadi keseluruhan pokok yang baru. Teknik tisul kultur seperti ini telah digunakan untuk penghasilan tumbuhan secara komersial dan kajian-kajian tumbuhan (Steph, 2007).

Melalui teknik ini juga, satu eksplan yang diperoleh daripada tumbuhan dapat dikultur berpotensi mencapai ribuan pokok dalam tempoh masa yang singkat dengan keadaan yang diselia kawal. Melalui kultur tisul ini, banyak spesis tumbuhan yang jarang dijumpai dan diancam kepupusan dikultur dapat diselamatkan dengan pemuliharaan mikropropagasi *in-vitro*. Semua ini adalah disebabkan oleh

RUJUKAN

- Ahloowalia, B.S. & Maluszynski, M. 2001. Induced Mutations- A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, **118**: 167-173.
- Akin-Idowu P.E., Ibitoye, D.O. & Ademoyegun, O.T. (2009) Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *Africa Journal of Biotechnology*, **8(16)**: 3782-3788.
- Alexis, R. & Christine, R. 2009. Extraction of Chlorophyll and Carotenes from Spinach and Analysis by Thin Layer Chromatography. *Physiological Chemistry*. 103-108.
- Alfred, R., Ahmad, A.H., Payne, J., Williams, C. & Ambu, L. 2010. Density and Population Estimation of the Bornean Elephants (*Elephas Maximus Borneensis*) in Sabah. *Online Journal of Biological Sciences*, **10(2)**: 92-102.
- Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A.A. 2009. UV radiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**: 512-516
- Altaf, N., Iqbal, J. & Ahmad, M.S. 1998. Influence of Microsperma Lentil Genotypes on Tissue Culture Responses. *Pakistan Journal of Biological Science*, **1(4)**: 335-338.
- Ayida, A.W., Wan, N.W.M., Farihah, H.S. & Azian, A.L. Effect of ovariectomy, *Labisia pumila* var. *alata* treatment and estrogen replacement therapy on the morphology of adipose tissue in ovariectomized Sprague Dawley rats. *J Med Biol Sc*, **(1)**: 1-7.

- Azimahtol, H., Lope, P., Zainul, A.Z. and Fezah, O. 2011. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of *Labisia pumila* Ethanol Extract and Its Active Fraction in Human Melanoma HM3KO Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **(2012)**: 1-12.
- Barbara, K.M. & Sarah, P.O. 2000. Masking and purging mutations following EMS treatment in haploid, diploid and tetraploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Genetic Research Cambridge*, **77**: 9-26.
- Baumann, J. Wurn, G. & Bruchlausen, F.V. 1979. Prostaglandin synthetase inhibiting, O₂-radical scavenging properties of some flavanoids and related phenolic compounds. *Naunyn Pharmacol*, **308**: 27-32.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **(239)**: 70-76.
- Bhat, T.A., Sharma, M. & Anis, M. 2007. Comparative analysis of meiotic aberrations induced by diethylsulphate and sodium azide in broad bean (*Vicia faba L.*). *Asian Journal of Plant Science*, **6**:1051-1057.
- Biondi, S., Scaramagli, S., Oksman-Caldentey, K. M. & Poli, F. 2002. *Plant Sci.***163**: 563-569.
- Brian, W.W.G. 2003. Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination. *Methods in Molecular Biology*, **111**: 115-124.
- Bringmann, G., Noll, T., Rischer, H., 2002. In vitro germination and establishment of tissue cultures of *Bulbine caulescens* and of two Kniphofia species (Asphodelaceae). *Plant Cell Rep*, **(21)**: 125-129.

- Brown, D.C.W. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous dicots *in-vitro*. *Embryogenesis in plants*, **120(5)**: 808-813.
- Bushra, S., Farooq, A. & Muhammad, A. 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*,**14**: 2167-2180.
- Chen, L. C., Chang, C.W. & Ching 2009. The antimutagenic and antioxidative activity for functional formula beverage. *Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science*,**47 (6)**: 277-284.
- Choi, H. K., Kim, D. H., Kim, J. W., Ngadiran, S., Sarmidi, M. R., & Park, C. S. (2010). *Labisia pumila* extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 291–296.
- Christapher, V., Christina, R., Veeresamy, R., Pea, N.H. & Chen, S.M. 2011. Antioxidant Activity of Hydroalcoholic Extract of *Labisia pumila* var. *alata*, an Indigenous Plant of Malaysia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, **4 (2)**
- Chua, L.S., Latiff, N.A., Lee, S.Y., Lee, S.T., Sarmidi, M.R. & Aziz, R.A. 2011. Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). *Food Chemistry***127**: 1186-1192.
- Ciomea, E., Artenie, V., Ichim, D., Ghiorghita, G., Cojocaru, D. & Vararu, D. 2004. The influence of certain treatments with physical mutagene agent on the activity of some enzymes in *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *Genetic Alteration*,**5**: 11.

- Dalmacio, R.D. 1992. "Transfer of blast and bacterial blight resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to the cultivated rice, *O. sativa*". *Theory & Applications of Genetics*,**84**: 345–354.
- Damian, R.P & Ueli, G. 2002. The Art And Design Of Genetic Screens: Arabidopsis Thaliana. *Macmillan Magazine*,**3**: 124-136.
- David, W. & Burden. 2008. Guide to the Homogenization of Biological Samples. *Random Primers*, **7**: 1-14.
- Davies K.J.A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement system. *IUBM Life*,**50(4)**: 279-289.
- Dhakshanamoorthy,D.,Sevaraj, R. &Chidambaram,A. 2010. Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas L.* to induce variability in seed germination,growth and yield traits. *Journal of Plant Biology*,**55(2)**: 261-266.
- Dhanayanth, K. P. M. & Reddy, V.C. 2000. Cytogenetic effect of gamma rays and ethyl methane sulphonate in chilli piper (*Capsicum annum*). *Cytologia*,**65**: 129-133.
- Dixon R.A., Pavia N.I. 1995. Stressinduced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*,**7**: 1085-1097
- Doughari, J.H., Human, I.S, Bennade, S. & Ndakidemi, P.A. 2009. Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*,**3(11)**: 839-848.

- Ehsan, K. & Hawa, Z. E. J. 2011. HPLC and GC-MS Determination of Bioactive Compounds in Microwave Obtained Extracts of Three Varieties of *Labisia pumila* Benth. *Molecules*, **16**: 6719-6805.
- Ehsan, K., Hawa, Z.E., Jaafar, Ali, G. & Hafiz, M.I. 2013. Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* benth. *Australian Journal of Crop Science*, **7 (7)**: 1016-1023.
- Ehsan, K., Hawa. Z.E., Ali, G. & Mohd, H.I. 2013. Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. *Australian Journal of Crop Science*,**7(7)**: 1016-1023.
- Fatimah, Z.I., Zaiton, Z., Jamaludin, M., Gapor, M.T., Nafeeza, M.I. & Khairul, O. 1998. Biological Oxidants and Antioxidants. *Molecular Mehchanism and Health Effects*. AOCS Press, Champaign, Illinois, Chapter 22.
- Frohnmeier, H. & Staiger, D. 2003. Ultraviolet-B radiation (UV-B) mediated responses in plants - balancing damage and protection. *Plant Physiology*,**133**:1420-1428
- Garcia, G.R, Quiroz, K., Carrasco, B. & Caligari, P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e investigación agraria*, **37(3)**: 5-30.
- George, T.,Sreejayan, Latha, J. & Philomena, K. 2001. Genetic variation and population structure in *Oryza malampuzhaensis* Krish. et Chand. endemic to Western Ghats South India. *Genetics*.**80**: 141-148.
- Ghiorghita, G. & Comeanu, G. 2002. Radiobiologie. *Bacau*, 307.

- Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., et al. 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics***(164)**: 731–740.
- Hanh, P.H. 1998. Chemical constituents of Mallotus japonicus. *Vietnamese Journal of Chemistry*, **50(4)**: 183-186.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y. & Yusahara, E. 1989. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **37**: 2016-2021.
- Hazlinah, N. 2013. Potential Role of Labisia pumila in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Journal of Food Research*, **2(4)**: 6.
- Hong-Fang, J., Xue-Juan, L. & Hong-Yu, Z. 2009. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports*, **10 (3)**: 194-200.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**53**: 1841–1856.
- Ibrahim, M.H. & Jaafar, H.Z. 2011. The relationship of nitrogen and C/N ratio with secondary metabolites levels and antioxidant activities in three varieties of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Blume). *Molecules***16**: 5514-5526.
- Ionela, D.M., Elena, C. & Gogo, G. 2011. The Activity Of Some Oxidoreductases In *Hordeum Vulgare* L. Plants Treated With Ethyl–Methane-Sulfonate And *Rosmarinus Officinalis* L. Hydro-Alcoholic Extracts. *Seciunea Genetic Biologie Molecular*, **13**: 67-72

- Ivana, B., Viktor, L., Milanka, Lj., Jelena, M. and Dusan, S. 2013. Skin Ageing: Natural Weapons and Strategies. *Evidence Based Complement Alternative Medicine*, **27(12)**: 973–985.
- James, C. 2004. Preview: Global status of commercialized Biotech/GM crops 2004. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, *Ithaca*, **32**: 80-93
- Jamia, A.J., Houghton, P.J., 2000. Determination of iron content from *Labisia pumila* using inductively coupled plasma technique. *In: Proceeding of the 16th National Seminar on Natural Products*. pp. 118–120.
- Janszewska, A. & Bartosz, G. 2002. Assay of total antioxidant capacity. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, **62**: 231 – 236.
- Jeng, T.L., Shih, Y.J., Lai, C.C., Wu, M.T. & Sung, J.M. 2010. Anti-oxidative characterization of NaN₃-induced common bean mutants. *Food Chemistry*, **119**: 1006-1011.
- Karimi, E., Hawa, Z.E. and Syahida, A. 2013. 2013. Antifungal, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of three varieties of *Labisia pumila benth* from microwave obtained extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **(13)**: 20.
- Karimi, E., Jaafar, H.Z. & Ahmad, S. 2011. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila*Benth. *Molecules***16(6)**: 4438-4450.
- Katarzyna, H. & Christel, B. 2011. Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. *Strategies for Sustainability*, **9**: 89-100.

- Kenny, O. & O'Beime, D. 2010. Antioxidant phytochemicals in fresh-cut carrot disks as affected by peeling method. *Postharvest Biology and Technology*, **58(3)**:247-253.
- Khairul, F.K., Nurul, H.M. & Zhari, I. 2005. Oxidative Properties of Various Extracts of *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). *Current Trends and Perspectives*, 306-311.
- Khodary, S.E.A. & Moussa, H.R. 2003. Influence of Gamma Radiation and/or Salinity Stress on Some Physiological Characteristics of Lupine Plants. *Egyptian Journal Biotechnology*, **13**: 29-36.
- Kokate, C.K. & Purohit, A.P. 2004. *Text book of Pharmacognosy*, **(29)** : 317-318.
- Krieg, D. R. 1963. Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4rII mutants. *Genetics* **(48)**: 561-580.
- Lee, S.C., Norliza, A.L., Sze, Y.L., Chew, T.L. Mohammad, R.S. & Ramlan, A.Z. 2011. Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). *Food Chemistry*, **127**: 1186-1192.
- Leong, L.P. & Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry* **(76)**: 69-75.
- Lobo, V., Phatak, A. & Chandra, N. 2010. Comparative evaluation of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extract of *Cassia tora* Linn leaves. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, **1**: 826-832.
- Mahandjiev, A., Kosturkova, G. & Mihov, M. 2001. Enrichment of *Pisum sativum* gene resources through combined use of physical and chemical mutagens. *Israel Journal of plant sciences*, **49(4)**: 279-284.

- Mary, D. & Douglas, W.A. 2011. Risk and Culture: An Essay on the Selection of Technological and Environmental Dangers. *Selected Environmental Sciences*, **3**: 701-706.
- Masao, S., Hideo, N., Kunihisa, O. & Tiller, F.M. 2004. Theory of batchwise centrifugal filtration. *AIChE Journal*, **3(1)**: 190-120.
- MASSOT, B., MILESI, S., GONTIER, E., BOURGAUD, F. & GUCKERT, A. 2000. *Plant Cell Tissue Organ Cult.***62**: 11–19.
- McGhie, T.K. & Walton, M.C. 2007. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards better understanding. *Molecular Nutritional Food Research*, **51**: 702-713.
- Mercier, J. 1997. Role of phytoalexins and other antimicrobial compounds from fruits and vegetables in postharvest disease resistance. *Photochemistry of fruit and vegetables*,**1**: 221–241.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*, **7**: 405-410.
- Mohd. Noh, H.J., Mohd. Jelani, B., Mohd. Akhir, A.H., 2002. Prestasi Pertumbuhan Empat variasi Kacip Fatimah di Ladang Semaian Sungkai, Perak. *Proceeding of Seminar on Medicinal Plants, FRIM, Kepong*: 25.
- Monica, B. & Ioana, G. 2012. Antioxidant (Antiradical) Compounds. *Bioequivalence & Bioavailability*, **4(6)**: 112-124.

- Mostafa, G.G. 2011. Effect of sodium azide on the growth and variability induction in *Helianthus annuus* L. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, **5** (1): 76-85
- Musa, A.K. 2008. Laboratory Evaluation Of The Toxicity Of Methanolic Extract Of African Bush Tea Seed (*Hyptis suaveolens* Poit.) For The Control Of Cowpea Beetle (*Callosobruchus maculatus* Fabricius). *Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension*, **7**(2): 114-117.
- Nilesh, P.R., Mansingraj, N., Sandeep, P., Firdose, K. & Ghansham, D. 2010. RP-HPLC analysis of 6-gingerol and assessment of antioxidant activities in EMS treated ginger. *Journal of Phytology*, **2** (3): 13–23.
- Nilima, S.R. Kunda, N. G. & Mansore, S.R. 2012. Evaluation Of Free Radical Scavenging Activity Of *Justicia adhatoda*: A Gamma Radiation Study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**(4): 93-96.
- Norhaiza, M., Maziah, M., & Hakiman, M. (2009). Antioxidative properties of leaf extracts of a popular Malaysian herb, *Labisia pumila*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**: 217–223.
- Oktay, M., Gulein, I. & Kufrevioglu, I., Labenson-Wiss U. *Technology*, **(36)**: 263-71.
- Ottoline, L. & Ian, S. 2002. Mutagenesis in *Arabidopsis*. *Circadian Rhythms : Methods and Protocols*, **362**: 197-206.
- Peiyuan, L., Lin, Huo., Wei, Su., Rumei, Lu., Chaocheng, D., Liu, L. Deng, Y., Nana, G., Lu. & He, C. 2010. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *Pouzolzia zeylanica*. *Journal of Serbian Chemical Society*, **76**(5): 709-717.

- Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Dn, W. Plescher, A., Gartzia I., Jimenez, D., Lamuela Raventos, R., Buxaderas, S. & Condina, C.2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* **97**:137-150
- Rao, S.M. & Ravishankar, G.A. 2002. Plant Organ Culture. *Biotechnol. Adv.* **20**: 101–153.
- Ricardo, M. and A. Ando, 1998. Effects of gamma radiation and sodium azide on quantitative characters in rice (*Oryza sativa L.*). *Genetics of Molecular Biology*, **21(1)**: 244-251.
- Salim, K., Fahad, A. & Firoz, A. 2009. Sodium Azide: a Chemical Mutagen for Enhancement of Agronomic Traits of Crop Plants. *Environment & We an International Journal of Science & Technology*, **4**: 1-21.
- Shinamoto, Y., Tarun, M.K., Jun, T. & Takeshi, I. 2009. Using Micromanipulation to Analyze Control of Vertebrate Meiotic Spindle Size. *Cell reports*, **5(1)**: 44-50.
- Sies H. 2004. Antioxidants in Disease, Mechanisms and Therapy, *Academic Press*, New York, pp 124.
- Simon, B.F., Perez-Illarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordoves, C. & Estrella, I. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agriculture Food Science*, **40**:1531-1565.
- Singh, G.D., Ganjoo, M., Youssouf, M.S., Koul, A., Sharma, R., Singh, S., Sangwan, P.L., Koul, S., Ahamad, D.B. & Johri, R.K. 2009. Sub-acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Labisia pumila*, a Malaysian herb. *Food and Chemical Toxicology*, **(1)**: 81-102.

- Siti, N.F.,² Norazlina, M., Norliza, M., Isa, N.M., Ima, N.S. & Ahmad, N.S. 2013. *Labisia pumila* regulates bone-related genes expressions in postmenopausal osteoporosis model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **(13)**: 217-220.
- Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. & Almeida, L.M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, **26**: 469-478.
- Steph, B. 2007. Commercially Production of Tissue Culture Product. *Biotechnology*, **1**: 1-10.
- Stone, B.C. 1988 Notes on the genus *Labisia* Lindl. (Myrsinaceae). *Malayan Nature Journal*, **42 (1)**: 43-51
- Street, H.E. 1997. Introduction to Plant tissue culture and cell culture. *Oxford, UK, Blackwell*, pp. 1-10.
- Sucheta, A.G, Gayatri, S.K., Swati Devare, Nirmala, R.D. and Jyoti P.S. 2011. In vitro evaluation of free radical scavenging potential of *Cassia auriculata* L. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3(4)**: 766-772.
- Thompson J. N. 2005. The geographic mosaic of coevolution. *Evolution molecular*, **2(3)**: 301-305.
- Thorpe, T. (2007) History of plant tissue culture. *Journal of Molecular Microbial Biotechnology*, **(37)**: 169-180.
- Tian, H.C. & Marcotrigiano, M. 1993. Origin and Origin and development of adventitious shoot meristems initiated on plant chimeras. *Developmental Biology*, **155(1)**: 155(1): 259-269.

- Unnikrishnan, P. 2010. Role of Traditional Medicine in Primary Health Care: An Overview of Perspectives and Challenges. *World Health Report*, <http://www.who.int/whr/2006/en/> accessed on 28th August 2009.
- Varga, C.A. and Veale, D.J.H. 1997. Isihlambezo: Utilization Patterns And Potential Health Effects Of Pregnancyrelated Traditional Herbal Medicine. *Social Science Medicine*,**(44)**: 911-924.
- Varga, C.A. and Veale, D.J.H. 1997. Isihlambezo: utilization patterns and potential health effects of pregnancy related traditional herbal medicine. *Soc Sci Med*, **(44)**: 911-924.
- Villano, D., Famandez, M.S., Moya, M.L & Transcoso, A.M. 2007. Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*,**71**: 230-235.
- WA Ratula, DJ Weber. 1999. Infection Control: the role of disinfection and sterilization. *ICHE***20(12)**: 821-7.
- William, P.J. & Douglas, A.L. 2005. Extraction of Plant Secondary Metabolites. *Methods in Biotechnology*, **20**: 323-351
- Wink M. 1997. Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Advance Botany Research*, **25**: 141-69.
- Yen, G.C., Duh, P.D. & Tsai, C.L. 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **41**: 67-70.
- YongSig, K., Karen, S. & Jian-Kang, Z. 2006. EMS Mutagenesis of Arabidopsis. **323**: 101-102.

- Yuan, H.Y. & Zhang, Z. 1993. Effect of free radicals and temperature on sister chromatid exchanges in *Hordeum vulgare* L. *Acta Botanica Sinica*, **35**: 20-26.
- Zahner, H. 1978. The Search for New Secondary Metabolites in Antibiotics and Other Secondary Metabolites. *Academic Press London*, **(1)**: 1– 17.
- Zahri, I., Norhayati, I. and Jaafar, L. 1999. In: Malaysia Herbal Monograph Vol. I, Ministry of Health. Kuala Lumpur, Malaysia, pp 47.
- Zainon, A.S., Musaadah, M., Ismail, M. & Wan-Fadhilah, W.Z.A. 1999. Ethobotany of Medicinal Plants at Pos Lanai, Lipis, Pahang. In Interdisciplinary Approaches in Natural Products Research, Eds: Department of Chemistry, University Putra Malaysia: Serdang, Malaysia, pp. 35–42.
- Zeerak, N.A. 1991. Cytological effect of gamma rays and ethyl methane sulphonate in brinjal (*Solanum melongena* L.) *Cytologia*, **56**: 639-643.
- Zhang, Q., & Ye, M. 2008. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan Cao (*licorice*). *Journal of Chromatography A*, **1216**: 1954–1969.