

UJIAN FITOKIMIA DAN ANTIOKSIDAN AKAR *Labisia pumila* var. *pumila*

NIK NADIAH BINTI NIK ABDUL KHALID

TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI

FAKULTI SAINS DAN SUMBER ALAM

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

2014



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS

JUDUL: UJIAN FITOKHIMIA DAN ANTIOKSIDAN AKAR
Labisia pumila var. pumila

IJAZAH: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN
(BIOTEKNOLOGI)

SAYA: NIK NADIAH BINTI NIK ABDUL KHALID 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

[Signature]
(TANDATANGAN PENJILIS)

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Disahkan NURULAIN BINTI ISMAIL
LIBRARIAN
[Signature]
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat tetap: NO 142, JLN PUTRA 04,
KESEORA PUTRA,
18300 GUA MUSANG, KELANTAN

PROF. DR JUALANG AZLAN GANAU
NAMA PENYELIA

Tarikh: 24 JUN 2014

Tarikh: 24 JUN 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



PENGAKUAN

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



NIK NADIAH BT NIK ABDUL KHALID

BS11110422

24 Jun 2014

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang serta selawat ke atas nabi junjungan kita, Nabi Muhammad s.a.w.

Syukur kehadiran Ilahi kerana dengan izinNya dapat saya menyiapkan tesis ini. Semoga tesis ini dapat membantu kajian-kajian akan datang serta membantu dalam mengembangkan ilmu pengajian bioteknologi itu sendiri.

Seterusnya saya ingin mengambil kesempatan untuk mengucapkan jutaan terima kasih terutama sekali kepada Prof. Madya Dr. Jualang Azlan Gansau, penyelia saya atas segala tunjuk ajar, dorongan dan nasihat sepanjang proses penyelidikan ini.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada pensyarah-pensyarah, pembantu-pembantu makmal dan juga kakak-kakak master yang banyak memberi tunjuk ajar semasa proses amali terutama kak Mary, kak Judy dan kak Ozy. Tidak lupa juga ucapan terima kasih kepada mama, baba dan keluarga tersayang yang telah memberi sokongan dan dorongan yang berterusan secara langsung dan tidak langsung.

Akhir kata, saya ingin merakamkan ucapan terima kasih yang tidak terhingga juga buat rakan seperjuangan Norliana, Siti Aisyah, Khairul Atikah, Siti Nadia, Zuleha, Zakiah, Rizennor dan Hamizah yang sentiasa membantu dalam proses penyelidikan ini.

ABSTRAK

Akar rerambut mempunyai kapasiti biosintesis yang tinggi, khususnya metabolit seperti yang terdapat dalam akar normal *in vivo* dan juga boleh digunakan sebagai sumber berterusan untuk pengeluaran metabolit sekunder yang bernilai. Objektif kajian ini adalah untuk mengukur aktiviti antioksidan dan mengenalpasti kandungan polifenol dan flavonoid ke atas akar normal dan rerambut *Labisia pumila* var. *pumila*. Sampel akar rerambut disubkultur atas media MSO dengan dua kali vitamin manakala eksplan batang digunakan untuk pengaruh akar normal atas media MS dengan 3.0 mg/L IBA. Eksplan yang berusia 16 minggu digunakan untuk pengekstrakan metanol. Ekstrak metanol kedua-dua sampel digunakan untuk penentuan aktiviti antioksidan menggunakan asai DPPH. Jumlah kandungan fenolik (TPC) telah ditentukan dengan kaedah spektrofotometri menggunakan reagen Folin-Ciocalteu manakala jumlah kandungan flavonoid (TFC) telah dianggarkan dengan kaedah kolorimetrik menggunakan aluminium klorida. Keputusan ujian DPPH ke atas ekstrak akar rerambut dan normal *Labisia pumila* menunjukkan ekstrak akar rerambut mempunyai aktiviti antioksidan yang lebih tinggi. Nilai IC_{50} akar rerambut ialah 0.038 ± 0.0046 mg/ml dan akar normal ialah 0.0417 ± 0.0021 mg/ml. Nilai IC_{50} yang rendah menunjukkan kehadiran aktiviti antioksidan yang tinggi. Kandungan polifenol ditentukan berdasarkan persamaan keluk regresi penentukuran piawai asid galik dan dinyatakan sebagai asid galik setara (GAE) bagi setiap gram sampel. Ekstrak akar rerambut mempunyai 18.02 mg GAE/g sampel; 0.0451 ± 0.0011 mg/ml dan akar normal 12.93 mg GAE/g sampel; 0.0323 ± 0.0023 mg/ml. Manakala, kandungan flavonoid ditentukan berdasarkan persamaan keluk regresi penentukuran piawai quercetin dan dinyatakan sebagai quercetin setara (QE) bagi setiap gram sampel. Ekstrak akar rerambut mempunyai 22.27 mg QE/g sampel; 0.0557 ± 0.004 mg/ml dan akar normal 3.32 mg QE/g sampel; 0.0083 ± 0.0007 mg/ml. Terdapat hubungan negatif yang signifikan antara antioksidan dengan TPC dan TFC, menunjukkan bahawa nilai IC_{50} antioksidan tidak mempengaruhi TPC atau TFC ($r = -1.000$, $p < .01$). Keputusan yang diperoleh menunjukkan aktiviti antioksidan dan kandungan polifenol dan flavonoid dalam ekstrak akar rerambut adalah lebih tinggi daripada ekstrak akar normal.

**PHYTOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT TEST ON ROOTS OF *Labisia pumila*
var. *pumila***

ABSTRACT

Transgenic hairy roots have high biosynthetic capacity, in particular root-inherent metabolites as found in original in vivo roots and they also can be used as a continuous source for the production of valuable secondary metabolites. The objectives of this study were to measure the antioxidant activity and quantify the phenolic and flavonoids contents on hairy and normal roots of Labisia pumila var. pumila. The hairy roots were subcultured on MSO media with two times vitamin concentration and normal roots were induced from stems on MS media treated with 3.0 mg/L IBA. After 16 weeks, the roots were harvested and extracted with methanol. The methanolic extract of both samples were used for the determination of antioxidant activity using DPPH assay. Total phenolic content (TPC) was determined by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu reagent test and total flavonoid content (TFC) was estimated by colorimetric method using aluminum chloride test. DPPH test on both roots extract of Labisia pumila showed hairy root extract has higher antioxidant activity. The IC_{50} value of hairy roots is 0.038 ± 0.0046 mg/ml and normal roots is 0.0417 ± 0.0021 mg/ml. Lower IC_{50} values indicate the presence of high antioxidant activity. Phenolic content was determined based on the regression equation of Gallic acid standard curve and expressed as Gallic acid equivalents (GAE) per gram of sample. The TPC value of hairy roots extract is 18.02 mg GAE/g 0.0451 ± 0.0011 mg/ml samples and normal root is 12.93 mg GAE/g 0.0323 ± 0.0023 mg/ml samples. Flavonoid content was determined based on the regression equation of Quercetin standard curve and expressed as Quercetin equivalents (QE) per gram of sample. The TFC value of hairy roots extract is 22.27 mg QE/g 0.0557 ± 0.004 mg/ml samples and normal root is 3.32 mg QE/g 0.0083 ± 0.0007 mg/ml samples. There is a significant negative correlation between antioxidant with TPC and TFC, indicating that IC_{50} decreases as TPC or TFC value increases ($r = -1.000$, $p < .01$). The result obtained show that the antioxidant activity and phenolic and flavonoid content in hairy roots extract is higher than normal root extract.

SENARAI KANDUNGAN

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 SIMBOL, SINGKATAN DAN UNIT	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	
2.1 <i>Labisia pumila</i>	4
2.1.1 Taksonomi <i>Labisia pumila</i>	6
2.1.2 Kesan <i>Labisia pumila</i> Terhadap Kardiovaskular	6
2.1.3 Sifat Fitoestrogenik <i>Labisia pumila</i>	7
2.2 Pengaruh akar	8
2.2.1 Transformasi Akar Rerambut	10
2.3 Metabolit Sekunder	11
2.3.1 Strategi Meningkatkan Penghasilan Metabolit	13
2.4 Antioksidan	14

2.4.1 Teori Penentuan Ujian Antioksidan	14
2.4.2 Kaedah DPPH	17
2.4.3 Kaedah FRAP	17
2.5 Fitokimia Tumbuhan	18
2.5.1 Sebatian Polifenol	18
2.5.2 Sebatian Flavonoid	18

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1 Sumber Eksplan	20
3.2 Penyediaan Larutan Stok MS	21
3.3 Penyediaan Larutan Stok Hormon	24
3.4 Penyediaan Media MS	24
3.5 Pengkulturan Eksplan	25
3.6 Penyediaan Ekstrak Tumbuhan	25
3.7 Ujian Antioksidan	27
3.7.1 Ujian DPPH	27
3.8 Ujian Fitokimia	27
3.8.1 Penentuan Jumlah Kandungan Polifenol (TPC)	28
3.8.2 Penentuan Jumlah Kandungan Flavonoid (TFC)	28

BAB 4 KEPUTUSAN

4.1 Pengkulturan Sampel	29
4.2 Pengekstrakan Sampel	31
4.3 Ujian DPPH	32

4.4	Ujian Fitokimia	34
4.4.1	Ujian Kandungan Polifenol (TPC)	34
4.4.2	Ujian Kandungan Flavonoid (TFC)	35
4.5	Ujian Korelasi	37

BAB 5 PERBINCANGAN

5.1	Pengkulturan Sampel	37
5.2	Pengekstrakan Metabolit Sekunder dari Tumbuhan	39
5.3	Ujian DPPH	39
5.4	Jumlah Kandungan Polifenol (TPC)	41
5.5	Jumlah Kandungan Flavonoid (TFC)	42
5.6	Korelasi Antara Antioksidan, TPC dan TFC	43

BAB 6 KESIMPULAN

RUJUKAN	45
----------------	----

LAMPIRAN	56
-----------------	----

SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka surat
2.1 Taksonomi <i>Labisia pumila</i>	6
2.2 Kaedah/ jenis pengukuran kapasiti ujian antioksidan (Giardi <i>et al.</i> , 2010)	15
3.1 Komposisi dan kepekatan garam organik dan bukan organik dalam larutan kerja dan larutan stok untuk media MS (Murashige & Skoog, 1962)	23
4.1 Peratusan pengestrakan sampel menggunakan pelarut metanol	31
4.2 Aktiviti pemerangkapan radikal bebas DPPH dalam setiap sampel <i>Labisia pumila</i> var <i>pumila</i> .	34
4.3 Kandungan polifenol dalam setiap sampel <i>L. pumila</i> var. <i>pumila</i>	35
4.4 Kandungan flavonoid dalam setiap sampel <i>L. pumila</i> var <i>pumila</i>	36
4.5 Korelasi antara antioksidan, jumlah kandungan polifenol (TPC) dan jumlah kandungan flavonoid (TFC)	37

SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka surat
2.1 Reaksi radikal bebas larutan DPPH dengan sampel (Md. Nur Alam, 2012)	17
2.2 Struktur kimia bagi kategori-kategori lazim flavonoid. (Krystyna & Magdalena, 2009)	19
3.1 Langkah-langkah pengekstrakan kasar	26
4.1 Graf kadar pemerangkapan aktiviti radikal bebas (% RSA) melawan kepekatan (mg/ml). (a) Kepekatan galik asid sebagai piawai, (b) Kepekatan ekstrak akar normal, (c) Kepekatan ekstrak akar rambut.	33
4.2 Kepekatan galik asid sebagai larutan piawai mengikut kepekatan yang berbeza (0-1.0 mg/ml) untuk menentukan kandungan polifenol	35
4.3 Kepekatan quercetin sebagai larutan piawai mengikut kepekatan yang berbeza (0-1.0 mg/ml) untuk menentukan kandungan flavonoid	36

SENARAI FOTO

No. Foto	Muka surat
2.1 <i>Labisia pumila</i> var. <i>alata</i> (Chua <i>et al.</i> , 2012)	5
3.1 Sampel akar rerambut <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i>	20
3.2 Sumber ekplan pengaruh akar normal <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i>	21
4.1 Pertumbuhan kultur <i>in vitro</i> akar rerambut <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> di atas media MSO dua kali vitamin.	30
4.2 Pertumbuhan kultur <i>in vitro</i> akar <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> di atas media MS dengan kepekatan hormon 3.0 mg/L IBA.	30

SENARAI SIMBOL, SINGKATAN DAN UNIT

cm	Sentimeter
m	Meter
M	Molar
%	Peratus
mM	Milimolar
Al(NO ₃) ₃	Aluminium nitrat
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
NaNO ₂	Natrium nitrit
NaCl ₂	Natrium klorida
NaOH	Natrium hidrosida
MgCl ₂	Magnesium klorida
C ₁₅	15 molekul karbon
CUPRAC	Kapasiti terturun antioksidan ion kuprik
IAA	Asid indol-3-asetik
IBA	Asid indol-3-butirik
FSH	Hormon rangsangan folikel
LH	Hormon luteinizing
<i>L. pumila</i>	<i>Labisia pumila</i>
LPvp	<i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i>
LPva	<i>Labisia pumila</i> var. <i>alata</i>
LPvl	<i>Labisia pumila</i> var. <i>lanceolata</i>
NAA	Asid asetik naftalena
NO	Nitrik oksida

ORAC	Penyerapan oksigen radikal
ROS	Spesies oksigen reaktif
SERMs	Modular reseptor estrogen terpilih
L	Liter
mL	Mililiter
mg	Miligram
nm	Nanometer
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Darjah Celcius
g	Gram
kg	Kilogram
w/v	Berat per isipadu
min	Minit

BAB 1

PENDAHULUAN

Labisia pumila (BI.) F. Vill. (Myrsinaceae), atau lebih dikenali sebagai Kacip Fatimah ialah permaisuri bagi herba di Malaysia. Kacip Fatimah ini banyak didapati di Hutan Hujan di Malaysia, Thailand, Indochina, Filipina dan Papua New Guinea (Stone, 1998; Jamia & Houghton, 2000; Wiart & Wong, 2002; Ong, 2004; Nabil, 2012). Di negara jiran, tumbuhan ini juga dikenali sebagai Seluluh Fatimah, Rumput Siti Fatimah, Akar Fatimah, Kachit Fatimah, Kachip Patimah, Pokok Pinggang, Rumput Palis, Tadah Matahari, Mata Pelandok Rimba, dan Bunga Belangkas Hutan.

Antara herba-herba terkenal yang sering digunakan di Malaysia ialah *Labisia pumila*, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali), *Orthosiphon stamineus* (Misai Kucing), *Quercus infectoria* (Manjakani) dan *Piper sarmentosum* (Kaduk berbahaya) (Nadia *et al.*, 2012). Secara tradisionalnya, *Labisia pumila* ini diekstrak secara rebusan air daripada akar, daun atau pun keseluruhan pokok kemudian diminum (Burkill, 1935; Zainon *et al.*, 1999; Runi, 2001). Kebiasaannya, ia digunakan untuk mempercepatkan proses bersalin, mengecutkan rahim, memperbaiki kitaran haid dan juga untuk mengurangkan berat badan (Arifin, 2005). Sehingga kini masih diambil oleh masyarakat tempatan untuk mengekalkan sistem pembiakan wanita, merawat ketidakstabilan haid serta meningkatkan fungsi seksual (Burkill, 1935; Runi, 2000; Prosea, 2003; Wan, 2007). Kaum wanita lebih banyak menggunakan herba ini kerana dipercayai herba ini mempamerkan aktiviti fitoestrogen, mengandungi sebatian struktur kimia yang lebih



kurang sama dengan estrogen (Jamia *et al.*, 2003). Walaupun *L. pumila* kebiasaannya digunakan oleh perempuan, terdapat juga kaum lelaki dari beberapa kumpulan etnik di Sarawak, Malaysia yang menggunakan tumbuhan ini untuk mengekalkan dan meningkatkan stamina (Runi, 2000).

Oleh kerana tahap populariti dan permintaan yang tinggi bagi tumbuhan herba, tumbuhan ini telah dibiakkan melalui kaedah *in vitro*. Sebilangan besar tumbuhan perubatan telah menunjukkan potensi terapeutik yang bermanfaat. Pelbagai jenis herba dan rempah dilaporkan mempamerkan aktiviti antioksidan. Majoriti aktiviti antioksidan adalah disebabkan oleh flavones, isoflavon, flavonoid, antiosianin, lignan, coumarin, catechins dan isocatechins (Aqil, 2006). Formulasi ubat-ubatan berasaskan antioksidan digunakan untuk pencegahan dan merawat penyakit-penyakit kompleks seperti aterosklerosis, strok, kencing manis, Alzheimer dan kanser (Devasagayam, 2004). Flavonoid adalah kompaun polifenolik yang mengandungi rangka flavone C₁₅ (diphenylpropane) dan dikenali juga sebagai vitamin P. Mereka terdiri daripada flavone, flavonol, flavanone dan flavanonols, dan ia mewakili majoriti metabolit sekunder tumbuhan. Harbone (1993) melaporkan bahawa lebih daripada 2000 flavonoid telah dikenalpasti dan bilangan ini akan terus bertambah. Flavonoid dipercayai memainkan peranan penting dalam melindungi tumbuh-tumbuhan daripada serangan mikrob dan juga serangga. Selain itu, flavonoid dikenalpasti menggalakkan tahap kesihatan, seperti anti-radang (Yamamoto & Gaynor, 2001), anti-mikrob (Tim Cushnie & Lamb, 2005), antioksidan (Shahidi & Wanasundara, 1992), anti-kanser (Wei *et al.*, 1990) dan pencegahan osteroporosis (Migliaccio & Anderson, 2003).

Metabolit dibahagikan kepada dua kumpulan, metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer seperti asid amino, organik asid dan karbohidrat (Hurtado-Fernández *et al.*, 2011), adalah penting untuk hidup dan terdapat dalam semua tumbuh-tumbuhan. Metabolit sekunder pula terlibat secara tidak langsung dalam kitaran hidup normal tetapi membantu tumbuhan menyesuaikan diri dengan persekitaran (Bentley, 1999; Pichersky & Gang, 2000; von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004). Flavonoid merupakan salah satu

komponen metabolit sekunder. *Labisia pumila* dilaporkan mempunyai kuantiti flavonoid yang tinggi dimana ianya berfungsi sebagai antioksidan.

Antioksidan memainkan peranan penting dalam sistem pertahanan badan terhadap spesies oksigen reaktif (ROS). Antioksidan adalah organisma tanpa enzim yang menjadi pertahanan terhadap reaktif O, N-spesies; penting untuk kesihatan manusia. Kebanyakan sebatian antioksidan diperkenalkan kepada organisma melalui diet. ROS adalah hasil sampingan berbahaya yang dijana semasa respirasi aerobik sel normal (Gutteridge & Halliwell, 2000). Di samping itu, faktor persekitaran yang berbeza seperti pencemaran, kemarau, suhu, intensiti cahaya yang berlebihan dan pemakanan yang terhad akan meningkatkan penghasilan ROS (Ehling-Schulz & Scherer, 1999; Arora *et al.*, 2002; Rijstenbil, 2002).

Akar rerambut adalah stabil dari segi genetik dan juga biologinya. Beberapa kajian terdahulu melaporkan polar dan pengeluaran flavonoid glikosida dalam kultur akar rerambut, termasuklah *Glycyrrhiza glabra* (Li *et al.*, 2000), *Glycyrrhiza pallidiflora* (Li *et al.*, 2001, 2002), *Gly-cyrrhiza uralensis* (Zhang *et al.*, 2009), *Catharanthus Roseus* (Chung *et al.*, 2009), *Medicago truncatula* (Staszaków *et al.*, 2011), *Scutellaria baicalensis* (Park *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 1997) dan *Verbascum Xanthophoeniceum* Griseb (Georgiev *et al.*, 2011) yang tinggi. Namun, belum ada kajian dijalankan untuk menguji perbezaan kadar antioksidan keatas akar rerambut dan akar normal. Objektif kajian ini adalah:

1. Mengukur aktiviti antioksidan ke atas akar normal dan rerambut *L. pumila* var. *pumila* menggunakan ujian DPPH.
2. Mengenalpasti kandungan fitokimia seperti kandungan polifenol dan flavonoid dalam tumbuhan *in vitro* akar normal dan rerambut *L. pumila* var. *pumila*.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Labisia pumila*

Terdapat tiga varieti *Labisia pumila*, iaitu *L. pumila* var. *pumila* (LPvp), var. *alata* (LPva), dan var. *lanceolata* (LPvl) (Stone, 1998; Arifin, 2005). Jenis-jenis tumbuhan ini boleh dibezakan antara satu sama lain berdasarkan petiole dan ciri-ciri daun mereka. LPva mempunyai petiole bersayap dan daunnya berurat merah, manakala LPvp mempunyai petiole bermarginat dan bilah daunnya berbentuk ovat dan LPvl mempunyai daun yang panjang dan tidak bersayap. Jenis var. *alata* digunakan secara meluas dalam perubatan tradisional kerana tumbuhan jenis ini paling senang dijumpai di Malaysia (Jamal *et al.*, 2003).

Myrsinaceae adalah pokok-pokok atau pokok renek yang terdiri daripada kira-kira 30 genus dan lebih kurang 1,000 jenis spesies. Daunnya bersifat normal, kelenjar yang berpunkta, biasanya berselang-seli dan berskorbia. Bunganya pula aktinomorfik dan biseksual atau uniseks dan buahnya mempunyai biji. *Ardisia* adalah salah satu genus yang terbesar dalam famili Myrsinaceae, dan kira-kira 500 spesies pokok renek malar hijau dan pokok terdapat di seluruh kawasan subtropika dan tropika di dunia (Kobayashi *et al.*, 2005). *Ardisia kivuensis* Taton ialah spesies yang ditemui di Gunung Oku dan

Gunung Koupe di Cameroon (Cheek *et al.*, 2000; 2004). Daun dan batangnya digunakan dalam perubatan tradisional untuk merawat penyakit kelamin. Dari kajian sebelum ini, alkybenzoquinones, ardisiaquinones J dan K yang diasingkan daripada batang *Ardisia kivuensis* Taton memberi kesan anti-proliferasi terhadap sel garisan kanser manusia (Ndontsa *et al.*, 2011).

Labisia pumila biasanya tumbuh setinggi 30-60 cm, setiap tumbuhan mempunyai 4-10 helai daun yang menghala ke atas. Daunnya mempunyai variasi yang sangat luas dari segi bentuk dan saiz, ada yang berbentuk mata lembing, bujur telur atau lonjong, hujung daun tajam, pangkal daun runcing, lebar atau bulat. Daun *Labisia pumila* lebih kurang 5-30 cm dan lebarnya antara 1.8-10 cm. Sempadan daun ada yang bergerigi halus dan banyak urat sekunder. Tangkainya pula ada yang pendek dan ada yang panjang, lebih kurang 10-12.5 cm. Bunga *Labisia pumila* sangat kecil, berwarna putih atau merah jambu, terdapat dalam jambakan yang pendek-pendek atau sampai 30 cm panjang. Sepal, petal dan stamen bunganya adalah 5. Buahnya pula berbentuk bulat bebola, lebih kurang 5 mm ukuran garis pusat, berwarna hijau semasa muda dan bertukar menjadi merah atau ungu apabila masak (Ong, 2004).



Foto 2.1: *Labisia pumila* var. *alata* (Chua *et al.*, 2012)

2.1.1 Taksonomi *Labisia pumila*

Labisia pumila adalah dari famili Myrsinaceae dan dari genus *Labisia*. Taksonomi *Labisia pumila* adalah seperti dalam Jadual 2.1. Pengelasan ini diperoleh dari jabatan perhutanan Negeri Terengganu, 2011.

Jadual 2.1: Taksonomi *Labisia pumila*

Domain	Eukariot
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Viridaeplantae
Filum	Tracheophyta
Subfilum	Euphyllphyrtina
Infrafilum	Radiotopses
Kelas	Magnoliopsida
Subkelas	Dilleniidae
Superorder	Primulanae
Order	Myrsinales
Famili	Myrsinaceae
Genus	<i>Labisia</i>
Spesifik	<i>pumila</i>
Nama botani	<i>Labisia pumila</i>

2.1.2 Kesan *Labisia pumila* Terhadap Kardiovaskular

Menopaus diketahui mempunyai kaitan dengan penambahan berat badan dan adipositi disebabkan oleh kekurangan estrogen, dan teori di sebaliknya adalah berkaitan dengan peningkatan saiz adipocytes diikuti oleh peningkatan dalam bilangan (Kinlay *et al.*, 1992). Peningkatan adipositi dikaitkan dengan risiko kardiovaskular. Sejak *Labisia pumila* dianggap mempunyai peranan sebagai fitoestrogen, tindak balas tumbuhan ini dengan adipositi telah dikaji. Model haiwan tikus yang telah dibuang satu atau dua ovarinya, (ovariectimized) menunjukkan bahawa terdapat peningkatan dalam saiz dan vasculature tisu adipos dilihat melalui mikroskop elektron penghantaran. Penebalan membran adipos yang juga dapat diperhatikan dalam tikus ovariectomized. Walau bagaimanapun, terdapat pemecahan gentian kolagen yang memegang adipocytes pada tikus diberikan *Labisia pumila* dan rawatan estrogen. Oleh itu, kajian ini menunjukkan bahawa *Labisia*

pumila mungkin berperanan dalam modulasi postmenopausal adipositi melalui proses lipolisis dalam tisu adipos (Ayida *et al.*, 2006).

Kekerasan aorta dikaitkan dengan aterosklerosis dan memburukkan lagi fungsi arteri. Secara tidak langsung, ianya adalah salah satu faktor yang dikaitkan dengan risiko kardiovaskular. Oleh itu, kekerasan aortik dijadikan sebagai salah satu langkah untuk mengukur tahap kesihatan kardiovaskular, yang mempunyai nilai ramalan dalam morbiditi dan kemortalan. Kajian ke atas haiwan telah menunjukkan bahawa ekstrak air *Labisia pumila* mempunyai keupayaan dalam mengekalkan kekenyalan lamela aortae di dalam tikus ovariectomized berbanding tikus yang normal. Keputusan ini juga menunjukkan bahawa ekstrak *Labisia pumila* mungkin boleh memodulasi risiko postmenopausal kardiovaskular tetapi bukan melalui mekanisme fitoestrogen (Boutouyrie *et al.*, 2002).

2.1.3 Sifat Fitoestrogenik *Labisia pumila*

Wanita masa kini hidup lebih daripada satu pertiga tahun putus haid daripada kehidupan mereka. Peningkatan jangka hayat di kalangan wanita akan mendedahkan mereka untuk mengalami morbiditi kerana kehilangan fungsi ovari. Menopaus dikaitkan dengan keadaan kronik seperti peningkatan risiko kardiovaskular, osteoporosis, penurunan fungsi kognitif dan masalah lain yang dikaitkan dengan obesiti. Wanita menopaus juga mungkin mengalami gejala vasomotor seperti panas badan, berpeluh malam, insomnia, kekeringan faraj dan gejala kencing (Kinlay *et al.*, 1992). Rawatan semasa untuk gejala putus haid dan penyakit yang berkaitan dengan kekurangan estrogen adalah terapi penggantian hormon. Walau bagaimanapun, kajian baru-baru ini telah mengubah amalan ini kerana kesan yang buruk mengenai terapi hormon gantian (WHI , 2002). Atas sebab ini, terdapat pertumbuhan besar dalam penggunaan terapi alternatif untuk melegakan gejala menopaus.

Wanita di Malaysia menggunakan *Labisia pumila* secara meluas terutamanya dalam membantu melahirkan anak dan semasa tempoh berpantang. Amalan ini telah membawa kepada spekulasi bahawa tumbuhan ini mempamerkan aktiviti fitoestrogen, sebatian yang mempunyai kesan yang sama dengan hormon estrogen (Turner *et al.*, 2007). Tumbuhan ini juga diandaikan mempunyai kesan tertentu sama ada mereka adalah agonis estrogen penuh atau antagonis atau agonis separa. Secara teorinya, ekstrak tumbuhan ini bertindak dengan mengikat reseptor estrogen dan mengenakan kesan estrogenik lemah berbanding dengan hormon wanita (IFST, 2001). Kajian telah menunjukkan bahawa *Labisia pumila* bertindak sebagai modular reseptor estrogen terpilih (SERMs) yang merupakan antagonis separa (Malaysian Herbal Medicine Center, 2011). Memandangkan bukti awal bahawa ianya adalah fitoestrogen, andaian bahawa tumbuhan ini mempunyai kesan yang baik kepada wanita menopause dari segi kesan positif ke atas lipid dan profil hormon.

Laporan telah menunjukkan bahawa tumbuhan ini memaparkan tindak balas aktiviti estrogen yang tidak signifikan dalam kaedah *in vitro* (Houghton *et al.*, 1999). Ekstrak air *L. pumila* mampu menggantikan estradiol yang mengikat kepada antibodi yang bertindak terhadap estradiol, menjadikannya serupa dengan estrogen lain seperti estron dan estradiol (Husniza, 2002). Dalam kajian lain, ekstrak *Labisia pumila* menggunakan etanol mempamerkan aktiviti estrogenik yang lemah diuji menggunakan asai *in vitro* dalam sel Ishikawa, tetapi tiada yang dapat diperhatikan daripada ekstrak daun. Manakala dalam kajian yang dilakukan haiwan iaitu pada tikus ovariectomized, ekstrak tumbuhan menunjukkan peningkatan tahap estradiol dan menyekat hormon rangsangan folikel "Follicle Stimulating Hormone" (FSH) dan hormon luteinizing "Luteinizing Hormone" (LH) yang menyerupai kesan terapi estrogen (Wahab *et al.*, 2011).

2.2 Pengaruhannya Akar

Penggunaan auksin eksogenus mempunyai kesan positif yang signifikan pada pembentukan akar adventitus. Sebagai contoh, rawatan keratan plum menggunakan

'indole-3-butyric acid' (IBA) pada 2000 mg/L atau 3000 mg/L memberikan tindak balas perakaran yang terbaik (Sharma dan Aier, 1989) dan 1000 mg/L IBA pula merangsang perakaran pada keratan neem (Palanisamy *et al.*, 1998). Manakala bagi keratan batang *Dendrocalamus asper*, asid asetik naftalena (NAA) mendorong perakaran adventitious lebih berkesan daripada IBA apabila tumbuhan ini dirawat dengan kepekatan larutan auksin yang sama iaitu pada 2mM (Singh *et al.*, 2004). IBA dan NAA telah disyorkan untuk mempromosikan perakaran dalam pembiakan keratan batang. Walau bagaimanapun, respon perakaran adalah berbeza mengikut jenis auksin, kepekatan auksin dan genotip tumbuhan.

Auksin diangkut secara aktif dari sel ke sel melalui pengangkutan efluks, yang dikenali sebagai protein PIN, daripada pucuk hingga ke jidal akar, dimana ianya berkumpul untuk membentuk 'local maximum' dan gradien spatial sepanjang paksi-apikal basal akar. Penyetempatan di hujung akar menggalakkan percambahan sel dan mengekalkan saiz pembahagian zon (Perrot-Rechenmann, 2010). Model proses pengangkutan multi-sel ini telah dicadangkan dalam Grieneisen *et al.* (2007) dan digunakan untuk meramalkan pengangkutan auksin mencukupi untuk membentuk satu gradien dengan kepekatan yang maksimum dalam hujung akar.

Dari kajian yang dibuat Aishah dan Sobri (2013), didapati eksplan daun adalah lebih baik daripada eksplan batang untuk pengaruh akar adventitious *Labisia pumila*. Keputusan yang dinilai dalam kajian ini adalah dari segi peratusan pembentukan akar, bilangan akar bagi satu eksplan dan jisim kering yang boleh menghasilkan akar. Secara umumnya, eksplan daun mempamerkan bilangan nombor akar yang tinggi per eksplan (17.80 ± 9.4) dengan jisim (0.123 ± 0.096 g) dan ($72.4 \pm 9.3\%$). Eksplan daun adalah lebih efektif dalam pengeluaran akar adventitious daripada batang mungkin disebabkan daun memiliki keupayaan menghasilkan auksin endogenus. Auksin endogenus akan dihantarkan ke bawah secara polar, bahagian basal tumbuhan seperti batang dan akar dalam (Terasaka *et al.*, 2005). Oleh sebab itu eksplan daun kurang bergantung kepada Indole-3-asitik asid (IAA) eksogenus.

Daripada kajian ini, 5 mg/L IBA adalah auksin terbaik yang menghasilkan peratusan pertumbuhan akar terbaik bagi pengaruh akar adventitus *L. pumila* (Aishah & Sobri, 2013). IBA adalah auksin yang sering digunakan secara meluas untuk merangsang pertumbuhan akar kerana mempunyai kebolehan untuk menggalakan pertumbuhan akar dan juga kurang bertoksik dan lebih stabil jika dibandingkan dengan NAA dan IAA. IBA juga lebih stabil terhadap pelbagai cahaya dan suhu sama ada dalam larutan dan juga kaedah *in vivo* (Qadoury & Amssa, 2004). Selain itu, IBA adalah aktif dan kadar kongjugasinya adalah lebih rendah daripada IAA yang menyebabkan IBA diperlukan untuk mengaruh perkembangan akar dan boleh didapati dalam jangka masa yang lama.

2.2.1 Transformasi Akar Rerambut

Banyak tumbuhan telah dikaji untuk menghasilkan lebih banyak metabolit sekunder yang lebih berharga dengan menggunakan teknik bioteknologi seperti pengkulturan sel. Beberapa tahun kebelakangan ini, ramai penyelidik memberi perhatian kepada inokulasi dan pengeluaran akar rerambut melalui jangkitan bakteria gram-negatif, bakteria tanah *Agrobacterium rhizogenes*. Bakteria ini bertindak sebagai sistem vektor semula jadi bagi transformasi yang merupakan punca akar rerambut transgenik dalam tumbuhan (Binns, 2002). Akar rerambut ini cepat pertumbuhannya dalam ketiadaan eksogenous pengawal selia pertumbuhan tumbuhan (fitohormon) tanpa kehilangan fenotip dan untuk menghasilkan jumlah metabolit sekunder yang lebih tinggi daripada pengkulturan ampai dan juga sel semulajadi. Tumbuhan ini mempunyai keupayaan tersebut kerana kehadiran plasmid bakteria seperti *rolB*.

Apabila bakteria menjangkiti tumbuhan, T-DNA antara rantau TR (T-DNA right border) dan TL (T-DNA left border) di Ri-plasmid dalam bakteria dipindahkan dan dikamirkan ke dalam genom nuklear host. Gen virulens yang membentuk rantau vir di Ri-plasmid, dan gen *chv* terdapat di kromosom bakteria menjadi pengantara pemindahan T-DNA (Kayser & Quax, 2007). Transformasi bagi spesies tumbuhan rekalsitran boleh diubah dengan cara pengaruh gen *vir* daripada bakteria oleh isyarat

PROJEK TUGAS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

RUJUKAN

- Abdalla, A.E. and Roozen, J.P. 1999. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion, *Food Chemistry*, **64**: 323-329.
- Aishah Hasan and Sobri Hussein. 2013. Adventitious root induction of *labisia pumila* in respond to plant growth regulators and different type of explants. *Science Letters* **7**: 9-18
- Allan E.J., Eeswara J.P., Jarvis A.P, Mordue A.J., Morgan E.D., Stuchbury T., 2002. Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. and their production of azadirachtin and other important insect bioactive metabolites, *Plant Cell Reproduction*, **21**: 374-379.
- Andersen, O.M., Markham, K.R. (Eds.), 2006. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Apak R., K. GÜÇLÜ, M. O'zyürek, S.E. Karademir, 2004. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **52**, 7970.
- Apak R., K. GÜÇLÜ, M. O'zyürek, S.E. Karademir, M. Altun, 2005. *Free Radical Resources*, **39**, 949.
- Aqil F, Ahmed I, Mehmood Z. 2006. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turkey Journal of Biology*, **30**: 177-183.
- Arifin, N., 2005. Penyembuhan semula jadi dengan herba. PTS Litera Utama, Kuala Lumpur.
- Arnao, M. B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science and Technology*, **11**, 419-421.
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastave, G. C., 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1238
- Ayida, A.W., Wan Nazaimoon, W.M., Farihah, H.S., Azian, A.L., 2007. Effect of ovariectomy, *Labisia pumila* var. *alata* treatment and estrogen replacement therapy on the morphology of adipose tissue in ovariectomized Sprague Dawley rats. *Journal of Medical and Biological Sciences*, **1**, 1-7.
- Bentley, R. 1999. Secondary metabolite biosynthesis: The first century. *Critical Reviews in Biotechnology*, **19**(1), 1-40.
- Benzie I.F.F., J.J. Strain, Anal. 1996. *Biochemistry*, **239**, 70.

- Benzie I.F.F., Y.T. Szeto, 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 633.
- Binns, AN. 2002. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends in Plant Science* **7**:231-233.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**: 1199-1200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, **30**: 609-615.
- Bouayed J, Bohn T., 2010. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; **3**(4): 228-237
- Boue, S.M., Wiese, T.E., Nehls, S., Burow, M.E., Elliott, S., Carter-Wientjes, C.H., Shih, B.Y., McLachlan, J.A., Cleveland, T.E., 2003. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 2193-2199
- Boutouyrie, P., Tropeano, A. I., Asmar, R., Gautier, I., Benetos, A., Lacolley, P., & Laurent, S. (2002). Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: A longitudinal study. *Hypertension*, **39**, 10-15. <http://dx.doi.org/10.1161/hy0102.099031>
- Briante R, Febbraio F, Nucci R. 2003. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 6975-6981
- Brown, K., Trigo, J.R., 1995. The ecological activity of alkaloids. In: Cordell, G.A. (Ed.), *The Alkaloids*, vol. **47**, pp. 227–354.
- Burkill, I.H., 1935. *Dictionary of the economic products of the Malay peninsula*. Crown Agents for the Colonies Publisher, London, p. 1023.
- Cao G., Verdon C.P., Wu A.H.B., H. Wang, R.L. Prior, 1995. *Clinical Chemistry*, **41**: 1738
- Cheek, M., Onana, J.M., Pollard, B.J., 2000. The plants of Mount Oku and the Ijim ridge, Cameroon. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 149.
- Cheek, M., Onana, J.M., Pollard, B.J., Darbyshice, L., Wild, C., 2004. The Plant of Kupe, Manengouba and The Bakossi Mountains, Cameroon. The Board of Trustees of Royal Botanic Gardens, Kew, p. 349.

- Chua L.S., Norliza Abdul Latiff, Sze Yean Lee, Chew Tin Lee, Mohamad Roji Sarmidi, Ramlan Abdul Aziz. 2011. Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). *Food Chemistry*, **127**, 1186–1192
- Chung, I.M., Ahmad, A., Ali, M., Lee, O.K., Kim, M.Y., Kim, J.H., Yoon, D.Y., Peebles, C.A.M., San, K.Y., 2009. Flavonoid glucosides from the hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Journal of Natural Products*, **72**, 613–620.
- Dai J., R.J. Mumper, 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, **15**, 7313–7352.
- Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK. 2004. Review: Free radical and antioxidants in human health. *Curr Stat Fut Pros JAPI* **53**: 794-804.
- Dhingra, V.K., Seshadri, T.R., Mukerjee, S.K., 1975. *Indian Journal of Chemistry*, **13** (4): 339–341.
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, 1998. Functional food science and defence against reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition* ; **80** (1): S77-S112.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenyl propanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1085-1097.
- Ehling-Schulz, M., & Scherer, S., 1999. UV protection in *cyanobacteria*. *European Journal of Pharmacology*, **34**, 329–338.
- Fraenkel, G., 1959. The raison d'être of secondary substances. *Science* **129**, 1466–1470.
- Fraga, C.G. (Ed.),. 2010. Phenolics and Human Health–Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey
- Fritz, K.L., Seppanen, C.M., Kurzer, M.S., Saari Csallany, A., 2003. The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. *Nutrition Resources*, **23**: 479-487.
- Georgiev, M., Ludwig-Müller, J., Alipieva, K., Lippert, A., 2011. Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xantho phoeniceum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation. *Plant Cell Reports*. **30**: 859–866.
- Georgiev, M., Pavlov, A., Bley, T., 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**: 1175–1185.
- Ghaffari MA, Mojab S. 2007. Influence of flavonols as *in vitro* on low density lipoprotein glycation. *Iran Biomedical Journal*, **11**(3): 185-191

- Gheldof N., Wang X.H., Engeseth N.J., 2002. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 5870.
- Giardi, M. T, Rea, G. & Berra, B. 2010. Bio Farms For Nutraceuticals: *Functional Food & Safety Control by Biosensors*. Landes Bioscience & Springer Science & Business Media.
- Giri A, Banerjee S, Ahuja PS, Giri CC. 1997. Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* wall. Using *Agrobacterium rhizogenes*. *In vitro Cell Development Biology in Plant*; **33**: 280–4.
- Giri, A., Narasu, M.L., 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. **18**: 1–22.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Mare' e, A.F.M., Hogeweg, P., Scheres, B., 2007. Auxin transport insufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**: 136–147.
- Harborne, J. B. (Ed.). 1993. *The flavonoids: Advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall.
- Harborne JB, Baxter H. 1999. The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology*, **96**: 67-202.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. **13**: 572-584
- Houghton, P. J., Jamal, J. A., & Milligan, R. S. 1999. Studies on *Labisia pumila* herb and its commercial products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**, 236.
- Huang D., B. Ou, R.L. Prior, 2005. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, 1841
- Hurtado-Fernández, E., Pacchiarotta, T., Gómez-Romero, M., Schoenmaker, B., Derks, R., Deelder, A. M., et al., 2011. Ultra high performance liquid chromatography–time of flight mass spectrometry for analysis of avocado fruit metabolites: Method evaluation and applicability to the analysis of ripening degrees. *Journal of Chromatography*, **1218** (42): 7723–7738.

- Husniza, H., 2002. Estrogenic and androgenic activities of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*). Abstract of Research Project, Kuala Lumpur: Institute for Medical Research (IMR), Ministry of Health
- IFST. 2001. Current Hot Topics, Phytoestrogens. Institute of Food Science and Technology, London, UK.
- Imin N., Nizamidin M., Daniher D., Nolan K. E., Rose R. J., and Rolfe B. G., 2005. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*, *Plant Physiology*, **137**: 1250-1260.
- Iwashina, T., 2003. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biology Sciences*, **17**, 24-44
- Jaganath, I.B., Crozier, A., 2010. Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: Fraga, C.G. (Ed.), *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1-49.
- Jagetia, G.C., Shirwaikar, A., Rao, S.K. and Bhilegaonkar, P.M. 2003. Evaluation of the radioprotective effect of *Ageratum conyzoides* Linn extract in mice exposed to different doses of gamma radiation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **55**: 1151-1158
- Jamal JA, Houghton PJ, Milligan SR, Jantan I. 2003. The oestrogenic and cytotoxic effects of the extracts of *Labisia pumila* var. *alata* and *Labisia pumila* var. *pumila* *in vitro*. *Sains Kesihatan*, **1**: 53-60.
- Jamia, A.J., Houghton, J.P., Milligan, R.S., Jantan, I., 2003. The oestrogenic and cytotoxic effects of the extracts of *Labisia pumila* var. *alata* and *Labisia pumila* var. *pumila* *in vitro*. *Jurnal Sains Kesihatan* **1**: 53-60.
- Jamia, A.J., Houghton, P.J., 2000. Determination of iron content from *Labisia pumila* using inductively coupled plasma technique. In: Proceeding of 16th National Seminar on Natural Products, pp. 118-120.
- Jane Higdon, V.J. Drake. 2013. An evidence-based approach to phytochemicals and other dietary factors (2nd ed.)Thieme, New York. Chapter 8-19
- Javanmardi J, Stushnoff C, Lockeb E, Vivanco JM. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, **83**: 547-550
- Jia Z., Tang M.C., Wu J.M., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64** (4): 555-559
- Kayser O, Quax WJ, 2007. Medicinal Plant Biotechnology. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.

- Kiana pirian, Khosro piri, Taiebeh ghiyasvand. 2012. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline as production. *Molecular Medicine*, **3**: 642-649.
- Kim D., Lee C.Y., in R.E., Wrolstad T.E., Acree H., An E.A., Decker M.H., Penner D.S., Reid P., S.J. Sporns, C.F. Schwartz, Shoemaker (Eds.), 2002. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. I.0.1-I.0.2.
- Kinlay, S. M., Brambilla, D. J., & Posner, J. G., 1992. The normal menopause transition. *Maturitas*, **14**: 103-115
- Kobayashi, H., Mejia, E., 2005. The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*. **96**: 347-354.
- Krystyna Pyrzynska, Magdalena Biesaga. 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. **28**, 7
- Laundry, L.G., Chapple, C.C., Last, R.L., 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sun screens exhibit enhanced ultraviolet-B injury oxidative damage. *Plant Physiology*, **109**: 1159-1166
- Levin, D.A., 1976. The chemical defences of plants to pathogens and herbivores. Annual Review of Ecology and Systematics **7**: 121-159
- Li, W., Asada, Y., Koike, K., Hirotani, M., Rui, H., Yoshikawa, T., Nikaido, T., 2001. Flavonoids from *Glycyrrhiza pallidiflora* hairy root cultures. *Phytochemistry* **58**: 595-598.
- Li, W., Asada, Y., Yoshikawa, T., 2000. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry* **55**: 447-456.
- Li, W., Koike, K., Asada, Y., Hirotani, M., Rui, H., Yoshikawa, T., Nikaido, T., 2002. Flavonoids from *Glycyrrhiza pallidiflora* hairy root cultures. *Phytochemistry* **60**: 351-355.
- Malaysian Herbal Medicine Research Center. 2011. *Estrogenic and androgenic activities of Kacip Fatimah (Labisia pumila)*. Institute for Medical Research (IMR), Kuala Lumpur. Retrieved from http://www.imr.gov.my/org/hmrc_r2.htm
- Mandal S.M., Chakraborty D., S. Dey. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses, *Plant Signal Behavior*, **5**: 359-368.
- Md. Nur Alam *, Nusrat Jahan Bristi, Md. Rafiquzzaman. 2012. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21**: 143-152

- Migliaccio, S., & Anderson, J. B. 2003. Isoflavones and skeletal health: Are these molecules ready for clinical application. *Osteoporosis International*, **14**: 361–368.
- Miller N.J., C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, 1993. *Clinical of Sciences*, **84**, 407.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plants* **15**: 473–497.
- Nabil Ali Al-Mekhlafi, Khozirah Shaari, Faridah Abas, Ralf Kneer, Ethel Jeyaseela Jeyaraj, Johnson Stanslas, Naoshi Yamamoto, Toshio Honda, Nordin H. Lajis. 2012. Alkenylresorcinols and cytotoxic activity of the constituents isolated from *Labisia pumila*. *Phytochemistry*, **80**: 42–49
- Nadia, M. E., Nazrun, A. S., Norazlina, M., Isa, N. M., Norliza, M., & Ima Nirwana, S., 2012. The anti-inflammatory, phytoestrogenic, and antioxidative role of *Labisia pumila* in prevention of postmenopausal osteoporosis. *Advances in Pharmacological Science*.
- Nair, V.D., Panneerselvam, R., Gopi, R., Hong-bo, S., 2013. Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. *Industrial Crops and Products*, **45**, 406–415.
- Ndontsa, B.L., Tatsimo, J.S.N., Csupor, D., Forgo, P., Berkecz, R., Berenyi, A., Tene, M., Molnar, J., Zupko, I., Hohmann, J., Tane, P., 2011. Alkylbenzoquinones with antiproliferative effect against human cancer cell lines from stem of *Ardisia kivuensis*. *Phytochemical Letter*, **4**: 227–230.
- Nguyen C, Bourgaud F, Forlot P, Guckert A. 1992. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Reports*, **11**: 424–7.
- Ong H.C, 2004. Tumbuhan liar: khasiat ubatan & kegunaan lain. Utusan Publications
- Ovaskainen M.L., Torronen R., Koponen J.M., Sinkko H., Hellstrom J., Reinivuo H. *et al.*, 2008. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *Journal of Nutrition*, **138**: pp. 562-566.
- Palanisamy, K., Ansari, S.A., Kumar, P., Gupta, B.N., 1998. Adventitious rooting in shoot cuttings of *Azadirachta indica* and *Pongamia pinnata*. *New For.* **16**: 81–88.
- Park, N.I., Xu, H., Li, X., Kim, Y.S., Lee, M.Y., Park, S.U., 2012. Overexpression of phenylalanine ammonia-lyase improves flavones production in transgenic hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Process Biochemistry*, **47**: 2575–2580
- Perrot-Rechenmann, C., 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspect. Biology*, **2**, a001446

- Philip Molyneux, 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn, Journal Sciences Technology*, **26(2)** : 211-219
- Pichersky, E., & Gang, D. R., 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Plant Science*, **5(10)**: 439–445.
- Prakash D, Suri S, Upadhyay G, Singh BN. 2007. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Internet Journal of Food Sciences and Nutritions*, **58**: 18-28.
- Prakash S, Gautam S, Jain A. 2011. Phytochemical screening of selected medicinal plants used in skin diseases. *Internet Journal of Pharmacology Sciences*, **3(2)**:1402-1406.
- Prosea. 2003. Plant resources of Southeast Asia. *Prosea Foundation, Bogor Indonesia*, **12(3)**, 782.
- Qaddoury A. and M. Amssa, 2004. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date palm offshoots, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. **45**: pp. 127-131.
- Rhodes MJC, Parr AJ, Ceielutt A, Aird ELH. 1994. Influence of exogenous hormone on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **38**:143–51.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. *Free Radical in Biology Medicine*, **20**, 933.
- Rijstenbil, J. W. 2002. Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation. *Journal of Plankton Research*, **24**: 1277–1288.
- Rosenthal, G.A., Berenbaum, M.R., 1991. Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. Academic Press, San Diego. *The Chemical Participants*, vol. **1**.
- Runi SP. 2000. Studies on medicinal plant in Sarawak. In: Chang YS, editor. Towards bridging science and herbal industry Proc. sem. medicinal aromatic plants, Forest Research Institute Malaysia, Kepong; p. 112–9.
- Runi, S.P., 2001. Studies on medicinal plant in Sarawak. In: Dlm. Chang et al. (pynt), Towards Bridging Science and Herbal Industry. Forest Research Institute of Malaysia (FRIM), Kuala Lumpur, pp. 112-119.

- Sa'nchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Resources*, **32**: 407-412.
- Sanchez-Moreno C., J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto, 1998. *Journal of Sciences and Food Agriculture*, **76**, 270.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H. and Tijburg, L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *Food Resources Technology*, **212**: 319-328.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. K. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**: 67-103.
- Shanks, J.V., Morgan, J., 1999. Plant hairy root culture. *Current Opinion in Biotechnology*. **10**: 151-155.
- Sharma, S.D., Aier, N.B., 1989. Seasonal rooting behaviour of cuttings of plum cultivars as influenced by IBA treatments. *Sciences Hortic.* **40**: 297-303
- Shrutika Dhakulkar, T.R. Ganapathi, Sujata Bhargava, V.A. Bapat. 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. And production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* **169**: 812-818
- Singh, S., Kumar, P., Ansari, S.A., 2004. A simple method for large-scale propagation of *Dendrocalamus asper*. *Sciences Hortic.* **100**: 251-255.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M., Jr., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **830**: 152-178.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T.S., Manick-avasagam, M., Selvaraj, N., Ganapathi, A., 2012. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) *Dunal*. *Industrial Crops and Products* **37**: 124-129.
- Srinivasan V, Pestchanker L, Moser S, Hirasuna TJ, Taticek RA, Shuler ML. 1995. Taxol production in bioreactors: Kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake and taxol production by cell suspension of *Taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineer*, **47**: 666-76.
- Srivastava, V., Kaur, R., Chattopadhyay, S.K., Banerjee, S., 2013. Production of Industrially important cosmaceutical and pharmaceutical derivatives of betuligenol by *Atropa belladonna* hairy root mediated biotransformation. *Industrial Crops and Products*, **44**: 171-175.

- Staszów, A., Swarczewicz, B., Banasiak, J., Muth, D., Jasiński, M., Stobiecki, M., 2011. LC/MS profiling of flavonoid glycoconjugates isolated from hairy roots, suspension root cell cultures and seedling roots of *Medicago truncatula*. *Metabolomics*, **7**: 604–613.
- Stone, B.C., 1998. Notes on the genus *Labisia* Lindl (Myrsinaceae). *Malayan Nature Journal*, **42**: 43–51.
- Terasaka K., Blakeslee J. J., Titapiwatanakun B., W. A. Peer, A. Bandyopadhyay and S. N. Makam, 2005. PGP4 an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots, *Plant Cell*, vol. **17**, pp. 2922-2939.
- Tim Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Internet Journal of Antimicrobial Agents*, **26**: 343–356.
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review of Environment.
- Turner, J. V., Agatonovic-Kustrin, S., & Glass, B. D. 2007. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *Journal of Pharmacy and Sciences*, **96** (8): 1879-1885.
- von Roepenack-Lahaye, E., Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., et al., 2004. Profiling of *Arabidopsis* secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiology*, **134** (2): 548-559
- Wahab, N. A., Yusoff, W. H. W., Shuib, A. N., Wan, N. W. M., & Khatiza, H. A., 2011. *Labisia pumila* has similar effects to estrogen on the reproductive hormones of ovariectomised rats. *Internet journal of herbal and plants medicine*, **1** (1). <http://dx.doi.org/10.5580/1366>
- Wan Ezumi, M.F., Siti Amrah, S., Suhaimi, A.W.M., Mohsin, S.S.J., 2007. Evaluation of the female reproductive toxicity of aqueous extracts of *Labisia pumila* var. *alata* in rats. *Indian Journal of Pharmacology* **39**: 30-32.
- Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., & Birt, D. F. 1990. Inhibitory effect of epigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Research*, **50**: 499–502
- Wiat, C., Wong, F.K.E., 2002. Medicinal Plants of Southeast Asia, 2nd ed. Prentice Hall, Petaling Jaya.

- Wink, M., 2008. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism* **9**: 996–1009
- Wink, M., 2010a. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. *Annual Plant Reviews*, Wiley-Blackwell, Oxford. vol. **39**.
- Wink, M., 2010b. Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Plant Reviews*, Wiley-Blackwell, Oxford, vol. **40**.
- Writing Group for the Women's Health Initiative (WHI) Investigators. 2002. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy post-menopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, **288**: 321-333. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.288.3.321>
- Yamamoto, Y., & Gaynor, R. B. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, **107**: 135–142
- Zainon, A.S., Musa'adah, M., Ismail, M., Wan-Fadhilah, W.Z.A., 1999. Ethobotany of medicinal plants at Pos Lanai, Lipis, Pahang. In: Mawardi, *et al.* (Eds.), *Interdisciplinary Approaches in Natural Products Research*. Department of Chemistry, University Putra Malaysia, Serdang, pp. 35-42.
- Zhang, H.C., Liu, J.M., Lu, H.Y., Gao, S.L., 2009. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Reports* **28**: 1205–1213.
- Zhou, Y., Hirota, M., Yoshikawa, T., Furuya, T., 1997. Flavonoids and phenylethanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Phytochemistry* **44**: 83–87.