

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Kesan Media Asas Terhadap Penghasilan Asid
Asiatik ke Atas Kultur Akar Transgenik Centella asiatica
Ijazah: Sarjana Muda dengan Kepujian Bioteknologi

SESI PENGAJIAN: 2004/2005

Saya JEANNE WONG LIN SAN

(HURUF BESAR)

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

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

SULIT

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

TERHAD

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

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

d-

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Dr. Zaleha Abdul Aziz

Nama Penyelia

Alamat Tetap: 115 B, Jalan Tun
Abang Haji Openg, 96000 Sibu,
Sarawak

Tarikh: 19/4/07

Tarikh:

CATATAN: * Potong yang tidak berkeraan.

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

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



KESAN MEDIA ASAS TERHADAP PENGHASILAN ASID ASIATIK KE ATAS
KULTUR AKAR TRANSGENIK *CENTELLA ASIATICA*

JEANNE WONG LIN SAN

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

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

April 2007



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

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

27 April 2007

jeanne

JEANNE WONG LIN SAN

HS2004-4298



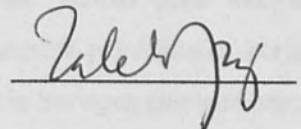
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

DIPERAKUKAN OLEH

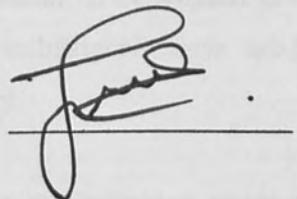
Tandatangan

1. PENYELIA

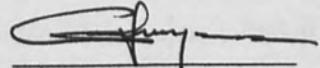
(Dr. Zaleha Abdul Aziz)

**2. PEMERIKSA 1**

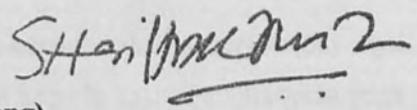
(Dr. Jualang Azlan Gansau)

**3. PEMERIKSA 2**

(Dr. Ivy Wong Nyet Kui)

**4. DEKAN**

(Supt./Ks. Prof. Madya Dr. Shariff A. Kadir S. Omang)

**UMS**
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Terlebih dahulu, saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih kepada penyelia saya, Dr. Zaleha Abdul Aziz atas bimbingan, nasihat, bantuan, panduan dan tunjuk ajar yang telah diberikan oleh beliau kepada saya sepanjang pelaksanaan kerja-kerja makmal dan hasil kerja ini. Beliau juga banyak menempah bahan-bahan kimia dan reagen yang saya perlukan semasa pelaksanaan kerja-kerja makmal. Saya juga ingin berterima kasih kepada Dr. Noumie Surugau atas cadangan dan bimbingan yang dihulurkan. Beliau telah meminjamkan peralatan HPLC kepada saya untuk menjayakan kajian projek ini. Kesudian beliau dalam meluangkan masa untuk mengajar saya dalam pengendalian mesin HPLC amat saya kenangi.

Selain itu, saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada kakitangan makmal, terutamanya Cik Roselin Baun Ajang, Cik Ruth, Puan Radizah, Encik Musbah, dan Encik Rizal yang telah banyak membantu sama ada dari segi nasihat dan tunjuk ajar, teknikal ataupun bahan-bahan serta radas yang diperlukan sepanjang saya melaksanakan projek ini.

Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan seperjuangan saya yang banyak berkongsi pendapat dan pengalaman mereka kepada saya. Penghargaan juga ditujukan kepada mereka atas kesudian meluangkan masa untuk menghulurkan bantuan dan panduan serta sokongan kepada saya semasa menjalankan kerja-kerja makmal.

Akhir sekali kepada semua individu yang terlibat yang tidak dapat saya sebutkan dalam ruangan ini, segala tunjuk ajar dan teguran, dorongan, bantuan yang tidak terhingga, serta kerjasama yang diberikan tidak akan saya lupakan.

ABSTRAK

Asid asiatik merupakan sejenis kompaun triterpenoid yang terdapat dalam tumbuhan *Centella asiatica* yang digunakan secara tradisional dalam rawatan penyakit kulit. Peningkatan penghasilan asid asiatik secara *in vitro* boleh dilakukan dengan memanipulasikan keadaan pengkulturan ke atas kultur akar transgenik *C. asiatica*. Kultur akar transgenik daripada stok disubkulturkan ke dalam kelalang Erlenmeyer 250 ml yang mengandungi 50 ml medium cecair MS (*Murashige & Skoog*), $\frac{1}{2}$ MS, B5 (*Gamborg B5*) dan White dengan 3% (w/v) sukrosa tanpa hormon. Kultur akar transgenik *C. asiatica* dikultur dalam inkubator penggoncang pada 100 rpm dengan suhu 25 ± 2 °C di bawah keadaan gelap selama 36 hari. Selepas 36 hari, kultur akar transgenik dituai dan dikeringkan pada suhu 40 °C sehingga memperoleh jisim kering yang tetap dan pengekstrakan triterpenoid dilakukan dengan menggunakan metanol:air dalam nisbah 9:1 di atas penggoncang berputar 100 rpm. Ekstrak kasar dilarutkan dalam 1 ml metanol dan dianalisis dengan Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi (HPLC). Pemisahan kromatografik dilakukan melalui fasa berbalik-HPLC (RP-HPLC) dengan menggunakan kolumn ZORBAX ECLIPSE SDB C₁₈ dengan air-acetonitril sebagai fasa bergerak. Kromatogram asid asiatik dimonitor pada 230 nm dengan kadar aliran 0.5 ml min⁻¹ dengan alat pengesan DAD pada 25°C. Keputusan menunjukkan bahawa medium kultur MS adalah paling baik untuk mengaruh pertumbuhan akar transgenik dan penghasilan asid asiatik. Medium MS memberikan indeks pertumbuhan akar transgenik yang paling tinggi (26.5910) dengan kandungan asid asiatik yang terbanyak (1.45% jisim kering akar). Sebaliknya, medium White memberikan indeks pertumbuhan yang paling rendah (9.5102) dengan kandungan asid asiatik yang sedikit (0.28% jisim kering akar).

ABSTRACT

THE EFFECT OF BASAL MEDIA ON THE PRODUCTION OF ASIATIC ACID IN HAIRY ROOT CULTURE OF *CENTELLA ASIATICA*

Asiatic acid is a triterpene compound which is found in *Centella asiatica* and has been traditionally used for skin diseases. The increase of asiatic acid production *in vitro* can be achieved by manipulating the culture condition of hairy root culture of *C. asiatica*. Hairy root cultures were transferred from its stock and were subcultured into 50 ml aliquots of MS (Murashige & Skoog), ½ MS, B5 (Gamborg B5) and White liquid medium supplemented with 3% (w/v) sucrose in 250 ml Erlenmeyer flasks. All the culture media were hormone-free. The cultures were kept under continuous agitation at 100 rpm in a rotary shaker and incubated under dark condition at 25 ± 2 °C for 36 days. After 36 days of culture, hairy root cultures were harvested and asiatic acid were extracted using methanol:water (9:1) with agitation at 100 rpm. The dried crude extracts were dissolved in 1ml HPLC grade methanol and analysed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Chromatographic separation was performed with a reversed-phase gradient method by using ZORBAX ECLIPSE SDB C₁₈ column with a water-acetonitrile mobile phase. The chromatogram was monitored at 230 nm with photodiode array detection (DAD). The flow rate was 0.5 ml min⁻¹. The results showed that among the four liquid medium tested, the best growth (26.5910) and asiatic acid production (1.45% dry weight root) were achieved in MS medium. On the other hand, White medium was inferior for both growth (9.5102) and asiatic acid production (0.28% dry weight root).

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	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN LITERATUR	4
2.1 <i>Centella asiatica</i>	4
2.2 Kegunaan <i>C. asiatica</i> Dalam Perubatan	5
2.2.1 Kegunaan <i>C. asiatica</i> dalam perubatan tradisional	6
2.2.2 Kegunaan <i>C. asiatica</i> dalam perubatan moden	7
2.3 Komponen Aktif Dalam <i>C. asiatica</i>	8
2.4 Transformasi Genetik	10
2.4.1 Kultur akar transgenik dan kebaikannya	11
2.4.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi penghasilan kultur akar transgenik	13
a. Strain <i>A. rhizogenes</i>	13
b. Eksplan	14



2.4.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi penghasilan metabolit sekunder	14
a. Medium	14
b. Faktor persekitaran	18
c. Fitohormon	19
d. Elisitor	19
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	20
3.1 Penyediaan Medium	20
3.1.1 Penyediaan larutan stok	20
3.1.2 Penyediaan medium kultur	24
3.2 Pengkulturan Akar Transgenik <i>C. asiatica</i>	25
3.3 Pengekstrakan Triterpenoid	26
3.4 Analisis Kuantitatif HPLC	27
3.5 Pengiraan Kandungan Asid Asiatik Dalam Kultur Akar Transgenik <i>C. asiatica</i>	28
BAB 4 KEPUTUSAN	29
4.1 Pengaruh Medium Asas ke Atas Pertumbuhan Akar Transgenik <i>C. asiatica</i> dan Penghasilan Asid Asiatik Tanpa Penukargantian Medium Kultur	29
4.1.1 Analisis kuantitatif HPLC untuk penentuan kandungan asid asiatik	33
4.2 Pengaruh Medium Asas Ke Atas Pertumbuhan Akar Transgenik <i>C. asiatica</i> Dengan Penukargantian Medium Kultur	38
BAB 5 PERBINCANGAN	42
5.1 Penggunaan Kultur Akar Transgenik <i>C. asiatica</i>	42
5.2 Pengaruh Medium Asas ke Atas Pertumbuhan Akar Transgenik dan Penghasilan Asid Asiatik Tanpa Penukargantian Medium	43
5.3 Pengaruh Penukargantian Medium Asas Terhadap Pertumbuhan Kultur Akar Transgenik	46
BAB 6 KESIMPULAN	48

RUJUKAN

49

LAMPIRAN

55



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Jumlah kepekatan jenis ion yang hadir dalam medium MS, B5 dan White	16
3.1 Senarai bahan kimia yang digunakan dalam penyediaan larutan stok MS dan isipadu yang diperlukan untuk menyediakan medium kultur MS dan $\frac{1}{2}$ MS	21
3.2 Senarai bahan kimia yang digunakan dalam penyediaan larutan stok B5 dan isipadu yang diperlukan untuk menyediakan medium kultur B5	22
3.3 Senarai bahan kimia yang digunakan dalam penyediaan larutan stok White dan isipadu yang diperlukan untuk menyediakan medium kultur White	23
3.4 Keadaan kecerunan untuk HPLC	27
4.1 Kultur akar transgenik pada hari pertama, hari ke-16 dan hari ke-36 dalam medium yang berbeza (tanpa penukargantian medium)	30
4.2 Penuaian dan pengeringan akar transgenik daripada medium $\frac{1}{2}$ MS, MS, B5 dan White dalam medium kultur selama 36 hari tanpa penukargantian medium	31
4.3 Indeks pertumbuhan akar transgenik <i>C. asiatica</i> selepas 36 hari	31
4.4 Kandungan asid asiatik yang dihasilkan dalam kultur akar transgenik <i>C. asiatica</i> tanpa penukargantian medium	37
4.5 Kultur akar transgenik pada hari pertama, hari ke-26 dan hari ke-36 dalam medium yang berbeza (penukargantian medium)	39
4.6 Penuaian dan pengeringan akar transgenik daripada medium kawalan, MS, B5 dan White selepas penukargantian medium kultur pada hari ke-26	40



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Produk <i>C. asiatica</i> yang dijual di pasaran	6
2.2 Struktur triterpenoid <i>C. asiatica</i> .	9
2.3 Laluan triterpenoid dalam <i>C. asiatica</i> .	9
2.4 Pembentukan akar transgenik pada kawasan daun yang luka	10
2.5 Kultur akar transgenik yang dikultur pada medium agar (c) dan medium cecair (d)	12
4.1 Kromatogram HPLC bagi standard asid asiatik	34
4.2 Kromatogram HPLC bagi sampel MS	34
4.3 Kromatogram HPLC bagi sampel $\frac{1}{2}$ MS	35
4.4 Kromatogram HPLC bagi sampel B5	35
4.5 Kromatogram HPLC bagi sampel White	36
4.6 Pengaruh medium asas terhadap kadar pertumbuhan akar transgenik dan penghasilan asid asiatik tanpa penukargantian medium	38
4.7 Kadar pertumbuhan akar transgenik <i>C. asiatica</i> selepas 36 hari dalam keadaan penukargantian medium kultur pada hari ke-26	41



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 <i>Centella asiatica</i>	5
2.2 Plasmid Ri jenis <i>agropine</i>	11
4.1 Pengekstrakan akar transgenik dengan metanol:air (9:1)	32
4.2 Ekstrak kasar akar transgenik untuk analisis HPLC	33



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI SIMBOL

cm	sentimeter
mm	milimeter
μm	mikrometer
nm	nanometer
ml	mililiter
g	gram
mg	miligram
μg	mikrogram
l	liter
μl	mikroliter
mg l^{-1}	miligram per liter
g l^{-1}	gram per liter
mg ml^{-1}	miligram per mililiter
ml min^{-1}	mililiter per minit
%	peratus
$^{\circ}\text{C}$	darjah Celsius
mmol l^{-1}	milimol per liter
$\mu\text{mol l}^{-1}$	mikromol per liter
$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	mikromol per meter persegi per saat
MS	Murashige & Skoog
B5	Gamborg's B5
N & N	Nitsch & Nitsch



SH	Schenk and Hildebrandt
rpm	revolution per minute
w/v	jisim/isipadu
v:v	isipadu/isipadu
β	beta
min	minit



BAB 1

PENDAHULUAN

Dewasa ini, perawatan yang berasaskan tumbuh-tumbuhan semulajadi semakin mendapat tempat di hati masyarakat. Kini pokok-pokok yang tumbuh meliar tidak kira di hutan belantara atau di sekeliling kita terus dikaji. Walaupun wujudnya perkembangan pesat dalam sintesis kompaun kimia, tumbuhan masih merupakan sumber utama bagi kebanyakan kompaun ubat dalam farmaseutikal (Bajaj, 1999). Menurut Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO), 80% penduduk dunia dijangka masih bergantung pada perubatan tradisional yang berasal dari tumbuhan herba pada masa kini (Leena & Jaindra, 2003). Justeru, hasil dari hutan hujan khatulistiwa ini tidak boleh dipandang sebelah mata sahaja kerana ia mempunyai banyak spesis tumbuhan herba yang bernilai komersial. Malahan kebanyakannya telah diproses dalam bentuk yang lebih moden serta sesuai digunakan untuk setiap keadaan dan masa. Antara tumbuhan herba yang tidak asing lagi ialah pegaga atau lebih dikenali *Centella asiatica* (Nair & Ganapathi, 1998). Di sesetengah tempat, pegaga juga dikenali dengan gelaran Mandukaparni, Indian pennywort, Brahmamanduki, Khulakhudi, Thol-khuri, Brahmi, Saraswataku, dan Vallarei (Prajapati & Purohit, 2004).



Walaupun hutan hujan Khatulistiwa mengandungi banyak jenis tumbuhan herba yang amat berguna dalam rawatan penyakit, namun terdapat banyak spesis tumbuhan herba yang kian jarang dijumpai, terancam dan mengalami kepupusan. Antaranya termasuklah *C. asiatica* yang mengalami masalah eksplorasi yang berlebihan kerana ciri-ciri perubatannya (Nath & Buragohain, 2005). Oleh itu, germplasma mereka perlulah dipelihara, diganda dan ciri-ciri mereka juga perlu dibaiki, terutamanya dalam penghasilan metabolit sekunder yang mempunyai nilai farmaseutikal yang tinggi (Bajaj, 1999).

Teknologi transformasi genetik dalam tumbuhan telah dikembangkan sejak 10 tahun yang lalu. Kajian telah dijalankan ke atas banyak spesis tumbuhan herba, termasuk *Atropa belladonna* dan *Nicotiana tabacum*. Tujuan menjalankan transformasi genetik ke atas tumbuhan herba adalah untuk meningkatkan atau menambahkan penghasilan farmaseutik, dadah, rasa, warna, dan kompaun ubat dalam keadaan yang terkawal (Bajaj, 1999).

Transformasi akar transgenik selain dapat menghasilkan metabolit sekunder yang diperlukan, ia juga dapat menghasilkan metabolit yang biasanya tidak dijumpai dalam akar tumbuhan induk (Bajaj, 1999). Justeru, kultur akar transgenik telah digunakan sebagai sumber alternatif bagi penghasilan metabolit sekunder. Kebaikan menggunakan kultur akar transgenik dalam menghasilkan metabolit sekunder adalah keadaan kultur boleh dikawal. Contohnya, kualiti dan kuantiti metabolit sekunder yang dihasilkan dalam kultur akar transgenik boleh dikawal. Selain itu, penghasilan metabolit sekunder yang berterusan tanpa bergantung pada perubahan faktor persekitaran juga dapat dicapai dengan menggunakan kultur akar transgenik (Sasson, 1991).

Dalam kajian ini, pengaruh beberapa media asas (MS, $\frac{1}{2}$ MS, B5 dan White) ke atas pertumbuhan dan penghasilan metabolit sekunder oleh kultur akar transgenik *C. asiatica* telah dikaji.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Objektif kajian adalah mengkaji pengaruh empat media asas (MS, $\frac{1}{2}$ MS, B5 dan White) ke atas pertumbuhan dan penghasilan asid asiatik oleh kultur akar transgenik *C. asiatica*.

BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 *Centella asiatica*

Centella asiatica (famili umbelliferae) biasanya dijumpai di Asia dan Afrika Timur, iaitu India, Sri Lanka dan Madagascar. Tumbuhan ini digelar dengan nama berlainan berdasarkan penyebarannya di negara masing-masing. Nama lain *C. asiatica* ialah Pegaga (Malaysia), Luei Gong Gen atau Tung Chain (China), Vallarai (India) dan Daun Kaki Kuda (Indonesia) (Somchit *et al.*, 2004).

Selain daripada Tongkat Ali dan Kacip Fatimah, *C. asiatica* merupakan tumbuhan herba yang mendapat perhatian di kalangan saintis pada masa ini (Adenan, 1998). Sejak kebelakangan ini, Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) telah mencadangkan kepentingan untuk memelihara pegaga memandangkan pegaga merupakan salah satu tumbuhan herba yang penting. Di Malaysia, tiga jenis *C. asiatica* telah dikenalpasti. Pegaga-pegaga ini dikenali dengan nama tempatan sebagai pegaga salad, pegaga biasa dan pegaga nyonya (Joseph *et al.*, 2005).

Habitat *C. asiatica* adalah luas kerana tumbuhan herba ini bukan sahaja dapat tumbuh di kawasan yang teduh seperti di pinggir hutan, tetapi juga

yang terdedah kepada cahaya seperti di atas tanah lembap, berdekatan pinggir saluran atau parit dan di dalam air cetek. Taburan *C. asiatica* meliputi kawasan tropikal dan sebahagian kawasan subtropikal (Joseph *et al.*, 2005).

Centella asiatica ialah tumbuhan hijau yang menjalar di permukaan tanah dan mengeluarkan akar pada setiap ruas daun. Daunnya berbentuk ginjal dengan bahagian tepi daun bersifat licin atau bergerigi mengikut spesis. Lebar daunnya adalah di antara 3-5 cm dan panjang tangkainya boleh mencapai 10-20 cm mengikut kultivar, kesuburan dan kepadatan tanaman. Bunganya kecil, kurang daripada 3 mm dan dalam jambak 3-4 kuntum dengan kelopak berwarna putih atau merah jambu. Buahnya berbentuk pipih dan kelihatan seperti biji cili (Joseph *et al.*, 2005).

Centella asiatica (Foto 2.1) popular di kalangan orang Melayu sebagai ulam. Ia dipercayai dapat menambahkan selera dan membantu dalam sistem pencernaan. Daun dan tangkainya yang segar selalunya dimakan mentah bersama sambal belacan. Pegaga juga boleh dimasak dengan susu kelapa dan cili serta dijadikan recipi dalam masakan kerabu dan nasi ulam (Joseph *et al.*, 2005).



Foto 2.1 *Centella asiatica*

2.2 Kegunaan *C. asiatica* Dalam Perubatan

Centella asiatica mempunyai pelbagai kegunaan dalam bidang perubatan tradisional dan moden. Ia semakin popular secara global dan mempunyai pasaran antarabangsa yang luas.

Banyak produk *C. asiatica* telah dijual di pasaran antarabangsa dengan nama dagang yang berlainan seperti *Madecassol*, *Centelase*, *Centasium*, *Ekzepiderm*, *Salve*, *Emdecassol*, dan *Elha-Dermidyn*. *Madecassol* (Rajah 2.1) dan *Centelase* terkenal sebagai ubat rawatan bagi pesakit dermatitis dan allergi (Bala & Ng, 2000).



Rajah 2.1 Produk *C. asiatica* yang dijual di pasaran (www.laboticadigital.com).

2.2.1 Kegunaan *C. asiatica* dalam perubatan tradisional

Dalam perubatan tradisional Malaysian, *C. asiatica* terkenal dengan kesan memanaskan badan dan oleh hal yang demikian, ia dimakan oleh ibu yang baru habis bersalin untuk memanaskan badan mereka, membantu pengecutan uterus, dan membantu peredaran darah (Joseph *et al.*, 2005).

Daun *C. asiatica* yang dikeringkan boleh dibuat teh manakala ekstrak daun segar *C. asiatica* boleh ditambahkan dengan gula atau madu untuk dijadikan jus. Jus daripada daun *C. asiatica* diekstrak dengan mendidihnya dalam air atau ditumbuk dijadikan pes. (Joseph *et al.*, 2005). Jus dan teh *C. asiatica* dipercayai boleh membersihkan darah dan merawat masalah pencernaan. Jus tumbuhan ini juga boleh diekstrak daripada bahagian akar dan digunakan untuk mencuci luka ulcer. Daun *C. asiatica* yang diramas boleh disapu pada kudis, luka dan ulcer untuk membantu dalam penyembuhan. Pes disapukan pada dahi dan seluruh badan untuk merawat demam (Joseph *et al.*, 2005).

Centella asiatica juga digunakan untuk merawat *urethritis*, *keloids*, *leucorrhoea*, *lupus*, leprosi, selulitis, bronkitis, lelah, kusta, disenteri, epilepsi dan masalah ginjal (Bala & Ng, 2000; Joseph *et al.*, 2005). Ia juga digunakan dalam merendahkan tekanan darah (Bala & Ng, 2000). Di India, *C. asiatica* banyak digunakan untuk merawat leprosi, menguatkan fungsi saraf, dan sebagai tonik otak untuk meningkatkan daya ingatan. Di Malaysia pula, *C. asiatica* dipercayai mempunyai nilai kosmetik yang berfungsi dalam mengekalkan keremajaan atau dikenali sebagai awet muda (Joseph *et al.*, 2005).

Dalam masyarakat Cina, *C. asiatica* digunakan sebagai ubat menurunkan api (kepanasan badan) (*antipyretic*). Ia juga digunakan sebagai penawar dalam cirit-birit, ekzema, pembentukan batu karang, campak, konjuntiviti, batuk kering, asma, dan glaukoma (Bala & Ng, 2000).

2.2.2 Kegunaan *C. asiatica* dalam perubatan moden

Bioaktiviti bagi *C. asiatica* adalah seperti mengurangkan kebimbangan, anti-bakteria, anti-kesuburan, anti-fungi, anti-radang, anti-mitotik, hipotensif, sebagai racun serangga dan pelicin bagi ketegangan otot. Dalam bidang farmaseutikal, *C. asiatica* digunakan sebagai anti-alergi, anti-kanser, mencegah cirit-birit, anti-disenteri, perangsang peredaran darah, diuretik, tonik, merawat sakit kerongkong, dan penyembuhan luka (Goh *et al.*, 1995).

Centella asiatica dapat melegakan ketegangan tisu, menggalakkan pembentukan keratin dan merangsang pertumbuhan retikulum endotelium. Di negara Eropah, tumbuhan ini digunakan untuk merawat ulser kaki, mempercepat penyembuhan luka selepas pembedahan, sebagai pelali, menghalang pembentukan *hypertropics* oleh tisu parut dalam merawat luka terbakar (Nair & Ganapathi, 1998).

Centella asiatica mempunyai aktiviti anti-oksidaan yang tinggi dan merupakan satu sumber anti-oksidan semula jadi yang baik (Joseph *et al.*, 2005). Kompaun fenolik dalam *C. asiatica* bukan sahaja mempunyai kesan anti-oksidaan, tetapi juga mempunyai kesan biologikal termasuk anti-trombotik, mencegah penyakit arteriosklerosis, kencing manis, dan *arthritis* (Zainol *et al.*, 2003).

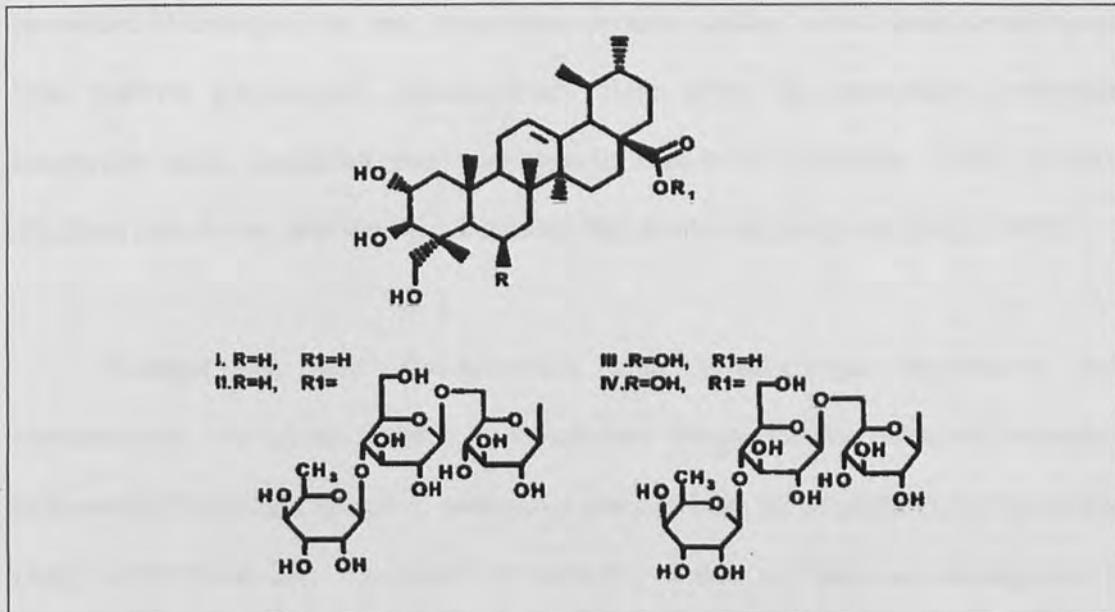
Asid asiatik, salah satu kompaun aktif dalam tumbuhan *C. asiatica*, telah terbukti dalam mengaruh apoptosis dalam sel melanoma manusia SK-MEL-2. Selain itu, kompaun ini juga didapati meningkatkan proliferasi fibroblast dan mengaruh kolagen sintesis. Asid asiatik juga memberi kesan perlindungan dalam menentang neurotoksiviti yang diaruh oleh β -amiloid dan glutamat (Park *et al.*, 2005). Asiatikosida telah dikenal pasti sebagai kompaun yang paling aktif dalam tumbuhan *C. asiatica* dan selalunya dikaitkan dengan penggunaannya dalam penyembuhan luka dan ulser duodenum (Kim *et al.*, 2004).

2.3 Komponen Aktif Dalam *C. asiatica*

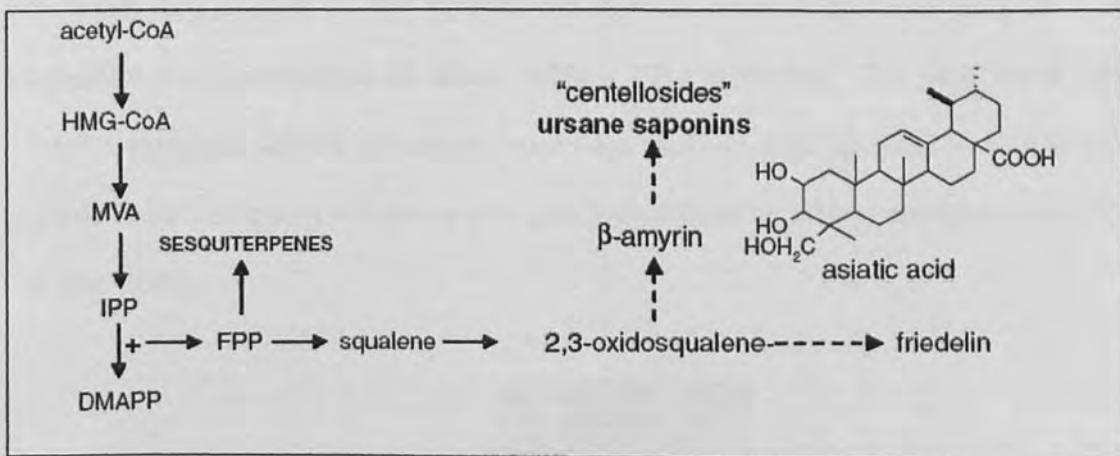
Centella asiatica boleh dimakan mentah. Komposisi nutrien untuk 100 g bahagian yang boleh dimakan pada tumbuhan ini ialah 87.7 g air, 2 g protein, 0.2 g lemak, 6.7 g karbohidrat, 1.6 g serat, 1.8 g abu (*ash*), 171 mg kalsium, 32 mg fosforus, 5.6 mg ferum, 21 mg natrium, 391 mg kalium, 42 mg magnesium, 0.3 mg kuprum, 2 mg zink, 2649 μ g karotenoid, 442 μ g vitamin A, 0.09 mg vitamin B1, 0.19 mg vitamin B2, 0.1 mg niasin, dan 48.5 mg vitamin C (Joseph *et al.*, 2005).

Kompaun triterpenoid (Rajah 2.2) penting yang diekstrak daripada *C. asiatica* ialah asiatikosida, madekassosida, asid asiatik, dan asid madekassik (Inamdar *et al.*, 1996; Joseph *et al.*, 2005). Kompaun-kompaun tersebut merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *C. asiatica*. Tumbuhan menghasilkan metabolit sekunder sebagai respon

kepada infeksi oleh bakteria dan fungi. Sesetengah metabolit sekunder yang dihasilkan adalah untuk memberi perlindungan daripada dimakan oleh haiwan herbivor (Kovalenko & Maliuta, 2003). Rajah 2.3 menunjukkan laluan pembentukan triterpenoid (*centelloides*).



Rajah 2.2 Struktur triterpenoid *C. asiatica*. Struktur asid asiatik(I), asiatikosida(II), asid madekassik(III) dan madekassosida (IV) (Inamdar *et al.*, 1999).



Rajah 2.3 Laluan triterpenoid dalam *C. asiatica*. *HMG-CoA*, β -hidroksi- β - metilglutaril-CoA; *MVA*, Mevalonat; *IPP*, Isopentenil pirofosfat; *FPP*, Farnesil pirofosfat (Mangas *et al.*, 2006)

RUJUKAN

- Adenan, M. I. 1998. Opportunities on the planting of medicinal and herbal plants in Malaysia. *Planter* **74**, 339-342.
- Ahn, J. C., Kim, O. T., Kim, K. S. & Hwang, B. 2002. *Effects Of Major Nutrients, Exogenous Hormones, Elicitors For Enhancement Of Triterpene Glycosides Production In Centella asiatica L. Urban Whole Plant Cultures*. Department of Biological Sciences, Chonnam National University, Korea.
- Asha, J. & Nutan, M. 2005. Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **80**, 247-257.
- Aziz, Z. 2001. *Tissue Culture Of Centella asiatica: Biosynthesis Of Asiaticoside*. Disertasi Sarjana Sains, University of Nottingham, London.
- Bais, H. P., Venkatesh, R. T., Chandrashekhar, A. & Ravishankar, G. A. 2001. *Agrobacterium rhizogenes-mediated Transformation of Witloof chicory: In vitro Shoot Regeneration and Induction of Flowering*. Central Food Technological Research Institute, India.
- Bajaj, Y.P.S. 1999. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 45: Transgenic Medicinal Plants*. Springer-Verlag, Germany.
- Bala, J. & Ng, L. T. 2000. *Centella asiatica. Herbs in Green Pharmacy of Malaysia*. Mardi, Selangor.
- Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands.
- Bourgaud, F., Bouque, V. & Guckert, A. 1999. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**, 97-104.



Dodds, J. H. & Roberts, L. W. 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press, Australia.

Giri, A., Ravindra, S. T., Dhingra, V. & Narasu, M. L. 2001. *Influence of Different Strains of Agrobacterium rhizogenes on Induction of Hairy Roots and Artemisinin Production in Artemisia annua*. Jawaharlal Nehru technological University, India.

Goh, S. H. & Chuah, C. H. 1995. *Malaysian Medicinal Plants for The Treatment of Cardiovascular Diseases*. Pelanduk Publications Sdn Bhd, Selangor.

Huang, S.Y. & Chou, S. N. 2006. Elucidation of the effects of nitrogen source on proliferation of transformed hairy root and secondary metabolite productivity in a mist trickling reactor by redox potential measurement. *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 803-813.

Hu, Z. B. & Min, D. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**, 121-127.

Inamdar, P. K., Yeole, R. D., Ghogare, A. B. & Souza, de. N. J. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography A* **742**, 127-130.

Joseph, S., Sugumaran, M. K. & Lee, L. W. 2005. *Herbs of Malaysia: An Introduction to The Medicinal, Culinary, Aromatic & Cosmetic Use of Herbs*. Federal Publication Sdn. Bhd, Malaysia.

Jouhikainen, K., Lindgren, L., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, T. H., Oksman-Caldentey, K. M. 1999. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta* **208**, 545-551.

- Jung, K. H., Kwak, S. S., Choi, C. Y. & Liu, J. R. 1994. Development of two stage culture process by optimization of inorganic salts for improving catharanthine production in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77** (1), 57-61.
- Kim, O. T., Kim, M. Y., Hong, M. H. & Ahn, J. C. 2004. Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Rep* **23**, 339-344.
- Kim, Y. J., Wyslouzil, B. E. & Weathers, P. J. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vivo Cell. Dev. Biol. – Plant* **38**, 1-10.
- Kittipongpatana, N., Hock, R. S. & Porter, J. R. 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **52**, 133-143.
- Kovalenko, P. G. & Maliuta, S. S. 2003. An effect of transformation by Ri-plasmid and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukr. Bioorg. Acta* **1** (1), 50-60.
- Lamine, B., Francoise, G., Jose, E. N. S. & Fliniaux, M.A. 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy root. *Journal of Biotechnology* **85**, 35-40.
- Leena, T. & Jaindra, N. T. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2** (2), 243-253.
- Liu, C. Z., Guo, C., Wang, Y. C. & Fan, O. Y. 2002. Effect of light on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry* **38**, 581-585.

- Mangas, S., Bonfill, M., Osuna, L., Moyano, E., Tortoriello, J., Cusido, R. M., Piñol, M. T. & Palazón, J. 2006. The effects of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus*, and *Galphimia glauca* Cultured Plants. *Phytochemistry* **67** (18), 2041-2049.
- Motomori, Y., Shimomura, K., Mori, K., Kunitake, H., Toshiki, N., Tanaka, M., Miyazaki, S. & Ishimaru, K. 1995. Polyphenol production in hairy root cultures of *Fragaria xananassa*. *Phytochemistry* **40** (5), 1425-1428.
- Nair, M.N.B. & Ganapathi, N. 1998. *Medicinal Plants: Cure For The 21st Century*. Faculty of Forestry, University Putra Malaysia, Malaysia.
- Nath, S. & Buragohain, A. K. 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Biologia Plantarium* **49** (3), 411-413
- Park, B. C., Bosire, K. O., Lee, E. S., Lee, Y. S. & Kim, J. A. 2005. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Letters* **218**, 81-90
- Payne, G. F., Bringi, V., Prince, C. L. & Shuler, M. L. 1995. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*. John Wiley & Sons Inc, USA.
- Prajapati, N. D. & Purohit, S. S. 2004. *Agro's Colour Atlas of Medicinal Plants*. Agrobios, India.
- Ramesh, K. S., Devanand, P. F. & Susan, E. 2007. Enhanced production of azadirachin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *Journal of Biotechnology* **128**, 281-289.
- Rhodes, M.J.C., Parr, A. J., Giulietti, A. & Aird, E.L.H. 1994. Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation of transformed root cultures. *Plant Cell and Organ culture* **38**, 143-151.

- Sasson, A. 1991. *Production of Useful Biochemicals by Higher-Plant Cell Cultures: Biotechnological and Economic Aspect*. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, France.
- Sivakumar, G., Yu, K. W., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. *Current Science* **89** (4), 641-649.
- Somchit, M. N., Sulaiman, M. R., Zuraini, A., Samsuddin, L., Somchit, N., Israf, D. A. & Moin, S. 2004. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Centella asiatica*. *Indian Journal of Pharmacology* **36** (6), 377-380.
- Stéphanie, G., Joceylyne, T., Pratap, K. P., Marc, R. & Pascal, G. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology* **24** (9), 403-409.
- Teresa, M. P., Javier, P., Rosa, M. C. & Montserrat, R. 1999. Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Science* **141**, 41-49.
- Terzi, M., Cella, R. & Falavigna, A. 1995. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M. S. & Ravishankar, G. A. 2003. Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. *Process Biochemistry* **38**, 1069-1076.
- Washida, D., Shimomura, K., Nakajima, Y., Takido, M. & Kitanaka, S. 1998. Ginsenosides in hairy roots of a Panax hybrid. *Phytochemistry* **49** (8), 2331-2335.
- Zainol, M. K., Hamid, A. A., Yusof, S. & Muse, R. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry* **81**, 575-581.

Zhao, D. X., Fu, C. X., Chen, Y. Q. & Ma, F. S. 2004. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production. *Plant Cell Rep* **23**, 468-474.

<http://www.laboticadigital.com>