

KAJIAN TENTANG AKAR TRANSGENIK *Centella asiatica*  
UNTUK PENGHASILAN METABOLIT SEKUNDER

CHOONG HUI CHUANG

DISERTASIINI 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

2007



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**BORANG PERKESAHAN STATUS TESIS@**

JUDUL: KAJIAN TENTANG AKAR TRANSGENIK *Centella asiatica*  
UNTUK PENGHASILAN METABOLIT SEKUNDER

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUTIAN (KURSUS BIOTEKNOLOGI)

SESI PENGAJIAN: 2004 / 2005

Saya CHOONG HUI CHUANG

(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

*Choo*

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 9' Solok Betek 2,  
Taman Sri Jaya, Sungai Ranbari,  
14000 Butterworth

Nama Penyelia

Tarikh: 23/4/07

Tarikh:

CATATAN: \* Potong yang tidak berkenaan.

- \*\* Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.
- @ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kuras dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGAKUAN

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

20 April 2007



---

CHOONG HUI CHUANG

HS2004-1941



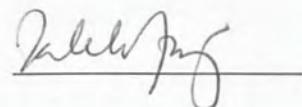
**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**DIPERAKUKAN OLEH**

Tandatangan

**1. PENYELIA**

(DR. ZALEHA ABDUL AZIZ)

**2. PEMERIKSA 1**

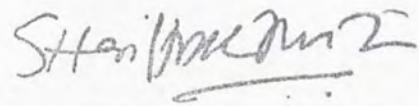
(DR. JUALANG AZLAN GANSAU)

**3. PEMERIKSA 2**

(DR. ROZIAH HJ. KAMBOL)

**4. DEKAN**

(SUPT/ KS PROF. MADYA DR. SHARIFF A. KADIR OMANG)

**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGHARGAAN

Pertama sekali, setinggi-tinggi penghargaan ingin saya sampaikan khasnya kepada penyelia projek saya, Dr Zaleha Abdul Aziz atas segala tunjuk ajar, nasihat dan sokongan yang diberikan oleh beliau ketika saya melakukan kajian projek tahun akhir ini. Sumbangan akar transgenik *Centella asiatica* yang diberikan oleh Dr. Zaleha bagi membolehkan projek saya dijalankan juga amat dihargai. Penghargaan ini juga ingin saya sampaikan kepada Dr. Noumie Surugau atas segala tunjuk ajar dalam penggunaan HPLC dan sokongan yang diberikan oleh beliau amat dihargai.

Saya ingin menggunakan peluang ini untuk mengucapkan setinggi-tinggi terima kasih kepada semua ahli keluarga saya, khasnya kepada ibu saya Tan Kim Cheng dan bapa saya Choong Cheng Hock ;kawan baik saya Jun Chin atas segala sokongan yang diberikan.

Ribuan terima kasih juga ditujukan kepada Pn. Radizah, En. Rizal, En. Jeffrey Pn. Doreen, En Rashidi, En. Chong, Kak. Ruth , Abg. Soon Kok, Kak Devina dan Abg. Cyril yang telah memberi bantuan sepanjang pelaksanaan projek tahun akhir saya.

Akhir kata, ucapan terima kasih juga dirakamkan kepada para pensyarah, rakan-rakan seprogram saya dan semua pihak yang terlibat sama ada secara langsung atau tidak langsung yang telah membantu saya dalam menjayakan projek ini.

## ABSTRAK

*Centella asiatica* kaya dengan sebatian triterpenoid yang penting, terutamanya asid asiatik yang banyak digunakan dalam perubatan. Maka, kaedah pengkulturan yang cekap harus diwujudkan untuk mempertingkat penghasilan asid asiatik. Penggunaan gula yang mengakibatkan penambahan dalam pertumbuhan dan penghasilan metabolit sekunder telah dibuktikan dalam pelbagai spesies tumbuhan. Akar transgenik *C. asiatica* yang telah ditransformasi oleh *Agrobacterium rhizogenes* R1601 telah digunakan untuk mengkaji kesan gula yang berlainan dan kepekatan sukrosa yang berbeza terhadap pertumbuhan dan penghasilan asid asiatik. Dalam kajian kesan berlainan jenis gula; sukrosa, maltosa, fruktosa dan glukosa bertindak sebagai sumber karbon dalam medium kultur. Manakala, bagi kajian tentang kepekatan sukrosa yang berbeza; 0%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% dan 10% (w/v) sukrosa telah dikultur dalam setiap kelalang kon yang mengandungi 50mL media MS tanpa hormon; diinokulasi selama 36 hari pada pH 5.8 dalam keadaan gelap pada suhu  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  dan bergerak pada 100rpm. Akar transgenik *C. asiatica* lebih cenderung kepada penggunaan sukrosa untuk mencapai pertumbuhan maksimum, dimana kadar pertumbuhannya adalah tertinggi sebanyak  $48.8455 \pm 16.0018$  (jisim kering) berbanding dengan kultur yang menggunakan glukosa, fruktosa dan maltosa. Berdasarkan keputusan yang diperolehi daripada HPLC analisis, sukrosa sekali lagi mencatatkan penghasilan asid asiatik yang terbanyak, iaitu  $0.9662\% \pm 0.1136$  (jisim kering akar). Bagi kesan kepekatan sukrosa pula, 6% (w/v) sukrosa telah memberi pertumbuhan yang paling tinggi, sebanyak  $64.8614 \pm 8.8492$  (jisim kering). Walaubagaimanapun, 3% (w/v) sukrosa memberikan penghasilan asid asiatik yang paling tinggi, dimana sebanyak  $0.7761\% \pm 0.1878$  (jisim kering akar) asid asiatik telah diperolehi.

## ABSTRACT

The active constituents of *Centella asiatica* are triterpenoids which are found as genins (asiatic and madecassic acids) and heterosides (asiaticoside and madecassoside). The triterpenoidic molecules are particularly interesting due to their commercially used in medicine. Significant increases in both growth and secondary product accumulation have been observed, upon incubation with sugar in certain plant species (Jung *et al.*, 1992; Zhang & Zhong, 1997; Ercan *et al.*, 1999). Consequently, the use of sugar *in vitro* has received increasing attention as a potential means for increasing secondary metabolites produced in small quantities. *C. asiatica* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* R1601 which grew rapidly in hormone-free MS medium was used to test the effect of difference sugars and various sucrose concentrations in liquid medium on the growth and the production of asiatic acid. Sucrose, maltose, glucose, and fructose which served as the carbon sources in culture medium were evaluated in hairy root cultures of *C. asiatica*. Concentrations of sucrose at 0%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% and 10% (w/v) in MS medium were tested on growth and asiatic acid production. It was found that transgenic roots in medium containing sucrose resulted in highest growth rate,  $48.8455 \pm 16.0018$  (dry wt). High performance liquid chromatographic (HPLC) analysis showed that transgenic roots in medium containing sucrose yielded  $0.9662\% \pm 0.1136$  asiatic acid (dry wt), the highest asiatic acid content as compare to glucose, maltose and fructose. Sucrose at 6% (w/v) resulted in the highest growth rate,  $64.8614 \pm 8.8492$  (dry wt). However, sucrose at the concentration of 3% (w/v) was the best for production of asiatic acid, where  $0.7761\% \pm 0.1878$  (dry wt) was obtained after 36 days of liquid culturing.

## 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 SARI KATA	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
SENARAI UNIT	xv
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	 1
 <b>BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN</b>	 4
2.1 Pegaga ( <i>Centella asiatica</i> )	4
2.1.1 Latar Belakang tentang <i>Centella asiatica</i>	4
2.1.2 Kegunaan Centella asiatica	5
a. Perubatan Tradisional	6
b. Perubatan Moden	6
c. Komersial	7
2.2 Kompaun Aktif dalam <i>Centella asiatica</i>	7
2.2.1 Triterpenoid	8
2.2.2 Laluan Biosintesis triterpenoid	9
2.2.3 Asid asiatik	10



2.2.4 Asiatikosida	11
2.3 Kultur Akar Transgenik Untuk Menghasilkan Sebatian Sekunder	12
2.3.1 Kultur Akar Transgenik	12
2.3.2 Agrobacterium	13
2.3.3 Perbandingan Kultur Transgenik dengan Kultur Tidak Transgenik	14
2.4 Karbohidrat Pengawalan Pertumbuhan Dan Penghasilan Sebatian Sekunder Dalam Akar Transgenik	15
2.4.1 Jenis Gula Yang Berbeza	17
2.4.2 Kepekatan Gula Yang Berbeza	19
2.5 Faktor- Faktor Lain Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Dan Penghasilan Sebatian Sekunder Dalam Akar Transgenik	20
2.5.1 Strain <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	20
2.5.2 Media Yang Sesuai	21
2.5.3 Pencahayaan	22
2.5.4 Elisitor	23
<b>BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH</b>	25
3.1 Stok Kultur Akar Transgenik	25
3.2 Penyediaan Media	26
3.2.1 Penyediaan Larutan Stok Makronutrien, Mikronutrien,Vitamin dan FerumNaEDTA untuk Media MS	26
a. Penyediaan Satu Liter Larutan Stok Makronutrien	27
b. Penyediaan Satu Liter Larutan Stok Mikronutrien	27
c. Penyediaan Satu Liter Larutan Stok Viamin	28
d. Penyediaan Satu Liter Larutan Stok FerumNaEDTA	28
3.2.2 Penyediaan 1L Media MS Tanpa Hormon (MSO) untuk Kultur Stok Akar Transgenik	28
3.2.3 Penyediaan Media MS Tanpa Hormon (MSO) untuk Kultur Akar Transgenik	29
3.3 Stok Kultur Akar Transgenik	30
3.4 Kultur Akar Transgenik Dengan Jenis Gula Yang Berbeza	31
3.4.1 Penentuan Biomass Akar Transgenik	32
3.4.2 Penyukatan Indeks Pertumbuhan Akar Transgenik	32



3.5 Kultur Akar Transgenik Dengan Kepekatan Sukrosa Yang Berbeza	33
3.6 Proses Pengekstrakan Triterpenoid	33
3.7 Analisis Kuantitatif Menggunakan Kromatografi Cecair Berupayaan Tinggi Fasa Songsang (RP-HPLC)	34
<b>BAB 4 KEPUTUSAN</b>	36
4.1 Pengaruh Pelbagai Gula	36
4.1.1 Pertumbuhan Akar Transgenik	36
4.1.2 Penghasilan Metabolit Sekunder Akar Transgenik	40
4.1.3 Hubungan Antara Pertumbuhan Dan Penghasilan Metabolit Sekunder	44
4.2 Pengaruh Kepekatan Sukrosa	46
4.2.1 Pertumbuhan Akar Transgenik	46
4.2.2 Penghasilan Metabolit Sekunder bagi Akar Transgenik	50
4.2.3 Hubungan Antara Pertumbuhan Dan Penghasilan Metabolit Sekunder	53
<b>BAB 5 PERBINCANGAN</b>	56
5.1 Kesan Gula Terhadap Akar Transgenik <i>Centella asiatica</i>	56
5.1.1 Pertumbuhan Akar Transgenik	56
5.1.2 Penghasilan Asid asiatik	59
5.1.3 Hubungan Antara Pertumbuhan Dan Penghasilan Asid asiatik	60
5.2 Kesan Kepekatan Sukrosa Terhadap Akar Transgenik <i>Centella asiatica</i>	61
5.2.1 Pertumbuhan Akar Transgenik	62
5.2.2 Penghasilan Asid asiatik	63
5.2.3 Penentuan Keadaan Optimum bagi Pertumbuhan Dan Penghasilan Asid asiatik	64
<b>BAB 6 KESIMPULAN</b>	67
<b>RUJUKAN</b>	69
<b>LAMPIRAN</b>	78



## SENARAI JADUAL

No. Jadual		Muka Surat
3.1	Media piawai MS (Murashige & Skoog, 1962)	26
3.2	Jenis gula yang berbeza untuk kultur akar transgenik	29
3.3	Kepekatan sukrosa yang berbeza untuk kultur akar transgenik	30
3.4	Peratus komposisi pelarut bergerak bagi HPLC	35
4.1	Jisim basah (g) dan jisim kering (g) bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikultur dalam medium MS dengan gula yang berlainan	37
4.2	Jisim basah (g) dan jisim kering (g) bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang kultur dalam medium MS dengan kepekatan sukrosa yang berbeza	47

## SENARAI RAJAH

No. Rajah		Muka Surat
2.1	Struktur bagi asid asiatik, asiatikosida dan asid madekassik	8
2.2	Laluan biosintesis triterpena dalam <i>C. asiatica</i>	10
2.3	Struktur-struktur kimia bagi gula monosakarida dan disakarida	16
4.1	Hubungan antara IPB dan IPK bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikulturkan dalam medium MS dengan gula yang berlainan	38
4.2	Bentuk spektrum bagi asid asiatik piawai yang dikenalpasti dengan spektrofotometer	41
4.3	Kromatogram HPLC asid asiatik dalam akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikultur dalam medium MS dengan gula yang berlainan	42
4.4	Kandungan asid asiatik bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikulturkan dalam medium MS dengan gula yang berlainan	44
4.5	Hubungan antara kandungan asid asiatik dan kadar pertumbuhan bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikulturkan dalam medium MS dengan gula yang berlainan	45
4.6	Hubungan antara IPB dan IPK bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang telah dikulturkan dalam medium MS dengan kepekatan sukrosa yang berbeza	48
4.7	Kromatogram HPLC asid asiatik dalam akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikultur dalam medium MS dengan kepekatan sukrosa yang berbeza	51
4.8	Kandungan asid asiatik bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang telah dikulturkan dalam medium MS dengan kepekatan sukrosa yang berbeza	53
4.9	Hubungan antara kandungan asid asiatik dan kadar pertumbuhan bagi akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang telah dikulturkan dalam medium MS dengan kepekatan sukrosa yang berbeza	55



## SENARAI FOTO

No. Foto		Muka Surat
2.1	Struktur morfologi <i>Centella asiatica</i>	5
3.1	Stok akar transgenik Petiol I/B yang digunakan dalam kajian	25
4.1	Akar transgenik <i>C. asiatica</i> dikulturkan dalam medium cecair MS dengan gula yang berlainan	39
4.2	Akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dituai daripada medium cecair MS dengan gula yang berlainan	39
4.3	Hasil pengekstrakan kompaun sekunder daripada rawatan gula yang berbeza terhadap akar transgenik <i>C. asiatica</i>	40
4.4	Akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dikulturkan dalam medium cecair MS dengan kepekatan sukrosa (w/v) berbeza.	49
4.5	Akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang ditunjukkan dalam piring petri adalah hasil tuaian daripada medium cecair MS dengan kepekatan sukrosa (w/v) berbeza.	49
4.6	Hasil pengekstrakan kompaun sekunder daripada kultur akar transgenik <i>C. asiatica</i> yang dirawat dengan kepekatan sukrosa yang berbeza.	50



## SENARAI SARI KATA

Kultur akar transgenik	-	hairy root culture
Variasi somaklona	-	somaclonal variation
Kompaun bioaktif	-	bioactive compounds
Transformasi	-	transformation
2,4- asid diklorofenosiasetik	-	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Klon	-	clones
Substrak pepejal	-	solid substrate
Impedans mekanik	-	mechanical impedance
Tudung kutikula	-	cuticular cover
Cefotasin	-	cefotaxime
Gred analitika	-	analytical grade
Asetonitril	-	acetonitrile
Elisitor	-	elicitor
Angiogenik	-	angiogenic
Masa pengekalan	-	retention time
Ketegaran	-	recalcitrance
Bebuli HPLC	-	HPLC vial



## SENARAI SINGKATAN

<b>IPP</b>	isopentenil pirofosfat
<b>OSCs</b>	oksidoskualena siklase
<b>HMGKoA</b>	3-hidroksi-3 metilglutaril-koenzim A
<b>MVA</b>	asid mevalonik
<b>IPP</b>	isopentenil pirofosfat
<b>DMAPP</b>	dimetil allil pirofosfat
<b>FPP</b>	farnesil pirofosfat
<b>bAS</b>	$\beta$ -amyrin sintase
<b>MJ</b>	metil jasmonat
<b>MSO</b>	Murashige & Skoog tanpa hormon
<b>IPK</b>	indeks pertumbuhan kering
<b>IPB</b>	indeks pertumbuhan basah

**SENARAI UNIT**

<b>g/l</b>	gram per liter
<b>ml</b>	mililiter
<b>g</b>	gram
<b>L</b>	liter
<b>M</b>	molar
<b>°C</b>	darjah Celsius
<b>rpm</b>	revolusi per minit
<b>mg/ml</b>	miligram per mililiter
<b>µl</b>	mikroliter
<b>µm</b>	mikrometer
<b>mm</b>	milimeter
<b>nm</b>	nanometer
<b>min</b>	minit
<b>mg/l</b>	milligram per liter

## BAB 1

### PENDAHULUAN

*Centella asiatica* (biasanya dikenali sebagai pegaga, Umbelliferae/Apiaceae) luas merebak di India, Asia dan Timur Tengah. Terkenal kerana mempunyai khasiat sebagai perubatan dan juga kaya dengan sebatian triterpenoid. Kompaun bioaktif utama adalah asid asiatik dan asiatikosida yang telah dibuktikan mempunyai kesan biologi seperti perlindungan sel hepatoma dan rintangan terhadap neurotoksik yang diakibatkan oleh b-amyloid dan glutamate dan juga boleh dijadikan sebagai satu agen untuk terapi kanser kulit manusia (Park *et al.*, 2005). Manakala, asiatikosida berkesan dalam pemulihan luka (Shukla *et al.*, 1999); membantu dalam pemulihan ulser gaster dengan sifatnya yang anti-radangan, merangsang gandaan sel dan angiogenik (Cheng *et al.*, 2004).

Menurut laporan bank eksport dan import India, *C. asiatica* adalah salah satu tumbuhan perubatan yang penting dalam pasaran antarabangsa. Kegunaan *C. asiatica* secara berluasa sebagai tumbuhan perubatan telah menggalakkannya dieksplorasi dengan giat dalam kultur *in vitro* untuk menampung permintaan dan juga meningkatkan penghasilan sebatian sekunder (Kim *et al.*, 2002; Nath & Buragohain, 2005). Masalahnya, sebahagian sebatian sekunder tidak dapat dihasilkan dalam sel

kultur tanpa transformasi dan jika ada hanya dalam kuantiti yang sedikit (Kim *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2006; Hu & Du, 2006)

Oleh itu, sebahagian penyelidik cuba menambahkan kadar sintesis sebatian sekunder tumbuhan herba dengan menggunakan kaedah kultur akar transgenik yang telah dibuktikan berkesan terhadap *A. maritime*, *Artemisia annua* dan *Hyoscyamus muticus* sebagai kaedah berpotensi untuk dieksplotasi (Kim *et al.*, 2002; Zid & Orihara, 2005). Flores *et al.* (1996) telah menghasilkan lebih daripada 20 klon akar transgenik dan keseluruhannya bertumbuh dengan cepat serta penghasilan hyoscyamine dengan kadar yang sama. *Hyoscyamus muticus* yang diperolehi daripada transformasi dengan *A. rhizogenes* boleh menghasilkan alkoloid tropana. Apabila akar transgenik dijadikan sel terampai dengan cara memasukkannya dalam medium yang mengandungi 2,4- asid diklorofenosiasasetik (2,4-D), didapati tiada tropana dihasilkan tetapi tropana dihasil semula apabila hormon tidak digunakan dalam medium.

Kultur akar transgenik *Centella asiatica* adalah satu kaedah alternatif untuk menghasilkan sebatian sekunder yang berpotensi untuk dieksplotasi. Walau bagaimana, menurut Society for *In Vitro* Biology Congress (1999) menyatakan bahawa perkembangan projek bioteknologi tumbuhan berkait rapat dengan mengenalpasti kaedah pengkulturan yang cekap bagi keseluruhan tumbuhan secara *in vitro*. Di samping itu, masalah ketegaran *in vitro* bagi kebanyakan spesies tumbuhan masih merupakan faktor utama mengehadkan eksplotasi bioteknologi dalam menghasilkan tumbuhan herba secara komersial (Benson, 2000). Maka, untuk mengeksplotasi kultur akar transgenik, kaedah pengkulturan yang cekap untuk spesies ini harus diwujudkan. Justeru, kajian ini dijalankan untuk melihat pengaruh

gula terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian sekunder *C. asiatica* dalam kultur akar transgenik.

Tujuan kajian ini ialah untuk mengkaji dan membandingkan kesan rawatan sumber karbon terhadap pertumbuhan dan pengeluaran hasil asid asiatik akar transgenik *C. asiatica*.



## BAB 2

### ULASAN PERPUSTAKAAN

#### 2.1 Pegaga (*Centella asiatica*)

##### 2.1.1 Latar Belakang tentang *Centella asiatica*

Di Malaysia terdapat 1200 spesies tanaman ubatan dan terdapat 60 spesies daripada 1200 spesies biasanya digunakan oleh masyarakat. Salah satu jenis herba yang terkenal dan disukai oleh masyarakat kita ialah pegaga. Nama *Centella asiatica* lahir dari bahasa latin. Perkataan *Cent* membawa maksud tumbuhan herba yang serbaguna dan *ella* menerangkan strukturnya yang kecil. Manakala *asia* bermaksud kebanyakan tumbuhan ini terdapat di negara Asia dan *tica* bermaksud merayap (Tan, 1990). Biasanya dua spesies pegaga iaitu *C. asiatica* Nyonya dan *C. asiatica* Kampung yang terkenal digunakan oleh penyelidik untuk membuat kajian (WHO, 1999).

*Centella asiatica* merupakan ahli kepada famili Umbelliferae/Apiaceae, yang biasanya dapat dijumpai di India, Asia dan Timur Tengah. Terkenal sebagai ‘Pegaga’ di Malaysia, ‘Luei Gong Gen’ di China, ‘Daun Kaki Kuda’ di Indonesia dan ‘Mandukaparni’ di India. *C. asiatica* biasanya tumbuh di kawasan yang kurang berbahaya seperti kawasan rumput yang lembap, di dalam longkang dan pinggir

sungai yang lembap. *C. asiatica* ialah tumbuhan herba jenis merayap yang kecil dan batangnya berwarna hijau kemerahan, melilit antara satu sama lain; hidup manjalar di atas permukaan tanah dan semusim (Fransworth & Bunyapraphatasara, 1992; WHO, 1999). Foto 2.1 menunjukkan morfologi *C. asiatica*.

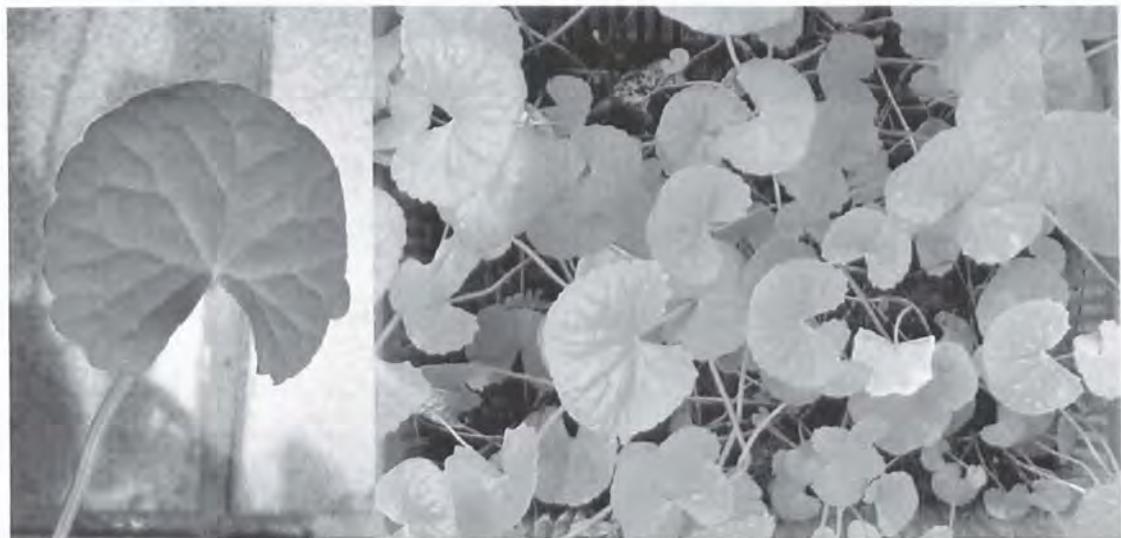


Foto 2.1 Struktur morfologi *Centella asiatica*

### 2.1.2 Kegunaan *Centella asiatica*

*Centella asiatica* telah terkenal pada tiga abad yang lalu, perebusan tumbuhan herba ini digunakan untuk rawatan sejuk, strok matahari, radang tonsil, jangkitan kawasan urea, hepatitis, penyakit kulit dan sebagainya. *C. asiatica* juga diguna sebagai ubat tradisional untuk penyakit kusta, tuberkulosis dan meningkatkan daya ingatan ([www.changzhou-centella.com](http://www.changzhou-centella.com)). Selain itu, terdapat banyak lagi aplikasi bagi *C. asiatica* yang boleh digolongkan dalam tiga kategori iaitu sebagai perubatan tradisional, perubatan moden dan juga kegunaan komersial.

a. **Perubatan Tradisional**

*Centella asiatica* atau pegaga ialah sejenis herba tempatan yang terkenal dan sering dimakan secara mentah oleh masyarakat Melayu. Mereka percaya bahawa herba ini dapat meningkat daya peringatan dan mengubati sakit mental seperti nyanyuk dan muram (Somchit *et al.*, 2004). *C. asiatica* telah diguna sebagai tonik otak dan paling terkenal sebagai makanan panjang usia di China berabad-abad lama. Pelbagai bahagian pada tumbuhan ini diguna oleh masyarakat Cina. Bahagian daun guna untuk mengubati ‘leukorrhea’ dan demam tosik. Manakala, demam yang lain dan bisul pula dirawati dengan bahagian pucuk *C. asiatica*. Di India, *C. asiatica* diguna untuk rawatan luka dan penyakit kulit seperti kusta, pelbagai ulcer dan eczema ([www.changzhou-centella.com](http://www.changzhou-centella.com)).

b. **Perubatan Moden**

Menurut laporan bank eksport and import India, *C. asiatica* adalah salah satu tumbuhan perubatan yang penting dalam pasaran antarabangsa. Triterpena glikosida yang kaya dalam *C. asiatica* ialah asiatikosida mempunyai kesan dalam pemulihan luka (Shukla *et al.*, 1999). Kajian telah membuktikan bahawa asiatikosida membantu dalam pemulihan ulcer gaster dengan sifatnya yang anti radangan, merangsang gandaan sel dan angiogenik (Cheng *et al.*, 2004). Dua puluh pesakit yang dijangkiti kronik ulcer kulit telah dirawati dengan krim mengandungi 1% ekstrak *C. asiatica*. Selepas 3 minggu, 17 pesakit berjaya diubati dan 3 pesakit lagi juga semakin sembuh (WHO, 1999).



### c. Komersial

Pada masa sekarang, pegaga telah diusahakan oleh banyak syarikat untuk menghasilkan produk siap seperti ubat-ubatan, jus dan sebagainya. Produk minuman yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengawal berat badan, menyingkirkan bahan-bahan tosik dan dapat mengawal keseleraan seseorang (Ozarko, 2002). Di samping itu, pegaga juga digunakan untuk menghasilkan produk kosmetik. Ini disebabkan pegaga dapat membentuk tisu dengan cara membina kolagen, merangsang pembentukan rambut dan kuku, menghasilkan kulit yang sihat dan sebagainya ([www.linnea-worldwide.com](http://www.linnea-worldwide.com)).

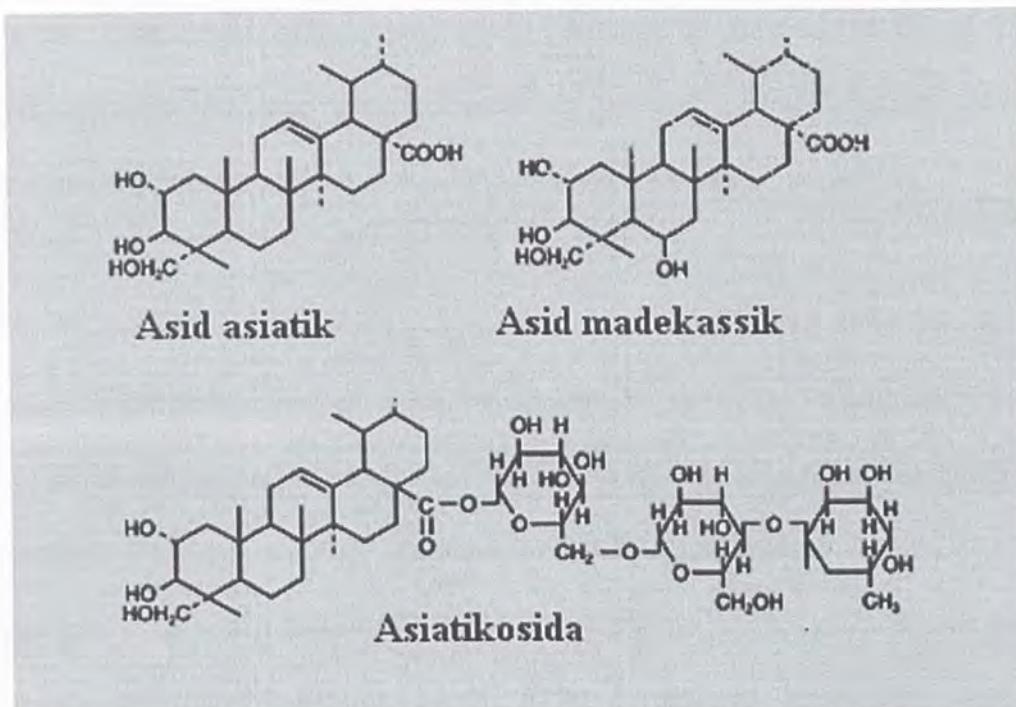
## 2.2 Kompaun Aktif dalam *Centella asiatica*

*Centella asiatica* menjadi tumbuhan yang terkenal sebab kaya dengan sebatian kimia semulajadi yang bersifat bioaktif dan dapat memberikan tindakan fisiologi pada manusia dan juga haiwan. Pada masa tertentu, tumbuhan ubatan akan menghasil jumlah sebatian sekunder yang banyak. Apabila tumbuhan ubatan dikeringkan semasa memungut atau menuai, kuantiti sebatian bioaktif yang banyak dengan kualiti yang maksimum dapat diperolehi (Tan, 1990).

Kandungan kompaun kimia utama *C. asiatica* yang aktif ialah triterpena saponin; brahmosida, brahminosida (saponin glikosida), asid brahmik, asid iso-brahmik, asid betulik, madekassosida, asid asiatik, asiatikosida dan asid madekassik, seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.1 (Inamdar *et al.*, 1996; WHO, 1999). Triterpenoid adalah sejenis kompaun kompleks yang tak berwarna, membentuk kristal



dan mudah cair. Sifat mudah cair ini membolehkannya bertindak sebagai komponen kimia yang aktif (Luckner, 1997).



Rajah 2.1 Struktur bagi asid asiatik, asiaticosida dan asid madekassik (Inamdar *et al.*, 1996). A) Asiaticosida; B) Asid asiatik; C) Asid madekassik

### 2.2.1 Triterpenoid

Sebatian sekunder merujuk kepada kumpulan produk kimia yang pelbagai, di mana tidak perlu untuk mengekalkan kehidupan tumbuhan. Biasanya, sebatian primer dihasilkan pada fasa log, manakala penghasilan sebatian sekunder hanya berlaku selepas mencapai fasa pegun. Sebatian sekunder yang paling banyak dan mempunyai struktur yang tidak serupa adalah famili terpenoid (isoprenoids) (Giri *et al.*, 2001).

Terpenoid adalah kumpulan sebatian sekunder yang diterbitkan daripada isopentenil pirofosfat (IPP) yang mempunyai hampir 22,000 ahli yang melebihi 300

## RUJUKAN

- Benson, E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* **36**, ms. 141–148.
- Bhagyalakshmi, N., Thimmaraju, R. & Narayan, M. S. 2004. Various hexoses and dihexoses differently influence growth, morphology and pigment synthesis in transformed root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **78**, ms. 183–195.
- Calamar, A. & Klerk, G. 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**, ms. 207–212.
- Candy, D.J. 1980. Biological functions of carbohydrates. *Glasgow* ms. 1-18.
- Changzhou Natural Copyringht, 2004. *Asiatic acid*. All Rights Reserved. <http://www.changzhou-centella.com/asiaticacid.htm>.
- Charlton, W.A. 1996. Lateral root initiation. Dlm: Waisell, Y., Eshel, A. & Kafkafi, U. (Ed.). *Plant Roots the Hidden Half Second Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, Inc. All Right Reserved, ms. 149-173.
- Chattopadhyay, S., Mehra, R. S., Srivastava, A. K., Bhojwani, S. S. and Bisaria, V. S. 2003. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, ms. 541-546.
- Cheng, C. L., Guo, J. S., Luk, J. & Koo, M. W. 2004. The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. *Life Sciences* **74**, 2237–2249.

- Choi, K. T., Ahn, I. O. & Park, J. C. 1994. Production of ginseng saponin in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer). *Abstract Russian Journal of Plant Physiology* **41**, ms. 784-788.
- Croteau, R., Kutchan, T. & Lewis, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). Dlm: Buchanan B, Grussem W & Jones R. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, ms. 1250–1318.
- David, W., Galbraith, Bohnet, H. J. & Bourque, D. P. 1995. Method in plant cell biology. UK: Academic Press Inc.
- Ercan, G., Taskin, M., Turgut, K. & Yuce, S. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. *Tr. J. of Botany* **23**, ms. 373-377.
- Flores, H. E., Weber, C. & Puffett, J. 1996. Underground plant metabolism: The biosynthetic potential of roots. Dlm: Waisell, Y., Eshel, A. & Kafkafi, U. (Ed.). *Plant Roots the Hidden Half Second Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, Inc. All Right Reserved, ms. 931-956.
- Flores, H. E., Vivanco, J.M., Loyola-Vargas, V. M. 1999. Radicle biochemistry: The biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* **4**, ms. 220–226.
- Fransworth, N. R. & Bunyapraphatasara, N. 1992. Thai Medical Plant-recommended for Primary Health Care Centre. Thailand: Prachachon Co. Ltd.
- Fu, C., Zhao, D. X., Xue, X. F., Jin, Z. P., Ma, F. S. 2005. Transformation of *Saussurea involucrata* by *Agrobacterium rhizogenes*: Hairy root induction and syringin production. *Process Biochemistry* **40**, ms. 3789–3794.

- Fu, C., Xu, Y., Zhao, D. X., Ma, F. S. 2006. A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucrata* in phenylpropanoids production. *Plant Cell Rep.* **24**, ms. 750–754.
- 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*. *Current Science* **81**(4), ms. 378-382.
- Grather, O and Schneider, B. 2001. The metabolic diversity of plant cell and tissue cultures. *Progress in Botany* **62**, ms. 266-304.
- He, H. J., Liang, P. & Shi H. P. 2005. Effects of sucrose and light on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Pubmed* **21**(8), ms. 1003.
- Hoevena, R. S., Monfortea, A. J., Breedena, D., Tanksleya, S. D. & Steffens, J. C. 2000. Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Plant Cell* **12**, ms. 2283-2294.
- Hu, Z.B. & Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* **48** (2), ms. 121–127.
- Inamdar, P. K., Yeole, R. D., Ghogare, A.B. & de Souza, N. J. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *J. Chromatography A.* **742**, ms. 127-30.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K. & Osbourn, A.E. 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **51**, ms. 731–743.

- Jacob, A. & Malpathak, N. 2004. Green hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke – a new route to *in vitro* solasodine production. *Current Science* **87**, ms. 10-25.
- Jacob, A. & Malpathak, N. 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**, ms. 247-257.
- Jansson, C. 2005. Mutation: Sugar signaling mutants in *Arabidopsis*. *Progress in Botany* **66**, ms. 50-67.
- Jayathirtha, M. G. & Mishra, S. H. 2004. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine* **11**, ms. 361–365.
- Jung, K. H., Kwak, S. S., Kim, S. W., Lee, H., Choi, C. Y. & Liu, J. R. 1992. Improvement of the catharanthine production in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. *Biotechnology Letters* **14** (8), ms. 695-700.
- Kanabus, J., Bressan, R. A. & Carpita, N. C. 1986. Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. *Plant Physiol.* **82**(2), ms. 363–368.
- Khawar, K. M. & Ozcan, S. 2004. Hairy root transformation in Turkish Chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Biotechnol. & Biotechnol.*, ms.12.
- Kim, O. T., Kim, M. Y., Hong, M. H., Ahn, J. C., Oh, M. H. & Hwang, B. 2002. Production of triterpene glycosides from whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Korea J. Plant Biotechnol.* **29**, ms. 275– 279.
- Kim, Y., Wyslouzil, B. E. & Wethers, P. J. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* **38**, ms. 1–10.

- Kim, O. T., Kim, M. Y., Hong, M. H., Ahn, J. C. & Hwang, B. 2004. Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Rep.* **23**, ms. 339–344.
- Kim, J. H., Chang, E. J. & Oh, H. 2005. Saponin production in submerged adventitious root culture of *Panax ginseng* as affected by culture conditions and elicitors. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **13**(2), ms. 87-91.
- Kim, O. T., Kim, M. Y., Huh, S. M., Bai, D. G., Ahn, J. C. & Hwang, B. 2005. Cloning of a cDNA probably encoding oxidosqualene cyclase associated with asiaticoside biosynthesis from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Rep.* **24**, ms. 304–311.
- 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**, ms. 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. *Ukrainica Bioorganica Acta* **1**(1), ms. 50-60.
- Kumar, V., Jones, B., & Davey, M. R. 1991. Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. *Plant Cell Reports* **10**, ms. 135-138.
- Lindhorst, T. K. 2003. *Essential of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Second, Revised and Updated Edition. Wiley- VCH, ms. 1-37.
- Linnea SA, 2002. *Centella asiatica* selected triterpenes a Linnea botanical brief, Switzerland. <http://www.linnea-worldwide.com/centella.html>.

- Liu, C., Guo, C., Wang, Y. and Ouyang, F. 2003. Factors influencing artemisinin production from shoot cultures of *Artemisia annua* L. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**, ms. 535-538.
- Luckner, J. C. 1997. Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and Bioengineering* **33**(6), ms. 388-394.
- MDidea Extracts Professional, 2006. <http://www.mdidea.com/products/herbextract/gotukola/data.html>.
- Murashige, T & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant* **15**, ms. 473-497.
- Murray M. T. 1996. *Centella asiatica*. *American Journal of Natural Medicine*. **3**(6), ms. 59-62.
- Nath, S. & Buragohain, A. K. 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Biologia Plantarum* **49** (3), ms. 411-413.
- Nigra, H. M., Alvarez, M. A., Giulietti, A. M. 1990. Effect of carbon and nitrogen sources on growth and solasodine production in batch suspension cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**, ms. 55-60.
- Ozarko, G. 2002. *Centella asiatica*. <http://www.ion.com.au/iridology/centella.html>
- 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**, ms. 81-90.

- Pesce, P. G. & Rugini, E. 2004. Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock 'Colt' (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **79**, ms. 223–232.
- Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Bartel, B. & Matsuda, S. P. T. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, ms. 1–10.
- Pilet, P.-E. 1996. Root growth and gravireaction: A reexamination of hormone and regulator implications. Dlm: Waisell, Y., Eshel, A. & Kafkafi, U. (Ed.). *Plant Roots the Hidden Half Second Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, Inc. All Right Reserved, ms. 285-305.
- Shatnawi, M. A., Shibli, R. A., Migdadi, H., Obeidat, A., Ereifej, K. & M-Abu-Ein, A. 2006. Influence of different carbon sources on wild pear (*Pyrus syriaca*) growth and sugar uptake. *World Journal of Agricultural Sciences* **2**(2), ms. 156-161.
- Shimon-Kerner, N., Mills, D. & Merchuk, J. C. 2000. Sugar utilization and invertase activity in hairy-root and cell-suspension cultures of *Symphytum officinale*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**, ms. 89-94.
- Shukla, A., Rasik, A. M., Jain, G. K., Shankar, R., Kulshrestha, D. K. & Dhawan, B. N. 1999. *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* **65**, ms. 1–11.
- Slesak, H., Skoczowski, A. & Przywara, L. 2004. Exogenous carbohydrate utilization by explants of *Brassica napus* culture *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **79**, ms. 45-51.

- 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 J. Pharmacol.* **36**, ms. 377-380.
- Subroto, M. A & Doran, P. M. 1994. Production of steroidal alkaloid by hairy roots of *Solanum aviculare* and of gibberellic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **38**, ms. 93-102.
- Tan, S. C. 1990. *Biokimia tumbuhan Hijau*. Dewan Bahasa dan Pustaka. Kuala Lumpur, ms. 68-72.
- Tripathi, L. & Tripathi, J. N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2** (2), ms. 243-253.
- Waisel, Y. and Agami, M. 1996. Ecophysiology of roots of submerged aquatic. Dlm: Waisell, Y., Eshel & A., Kafkafi, U. (Ed.). *Plant Roots the Hidden Half Second Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, Inc. All Right Reserved, ms. 895-909.
- West, C. A. 1997. Terpene biosynthesis and metabolism. Dlm: Dennis D. T., Turpin D. H., Lefebvre D. D & Layzell D. B. (Ed.). *Plant Metabolism*. Addison Wesley Longman Limited, ms. 430-445.
- Wijnsma, R., Verpoorte, R., Harkers, P., Vliet, T., Hoopen, H. T. and Svendsen, A. B. 1986. The influence of initial sucrose and nitrate concentration on the growth of *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **7**, ms. 21-29.
- World Health Organization Geneva, 1999. *Herba Centellae* .WHO monographs on selected medicinal plants Volume 1, ms. 77-85.

- Zenk, M. H, El-Shagi, H., Arens, H., Stockigt, J., Weiler, E. W. & Deus, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Abstract Plant Tissue Culture and its Biotechnological Applications*, ms.27-43.
- Zhang, Y. H. & Zhong, J. J. 1997. Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Abstract Enzyme and Microbial Technology* **21**, ms. 59-63.
- Zhao, D., Fu, C., Chen, Y., Ma, F. 2004. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production *Plant Cell Rep.* **23**, ms. 468–474.
- Zid, S. & Orihara, Y. 2005. Polyacetylenes accumulation in *Ambrosia maritima* hairy root and cell culture after elicitation with methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **81**, ms. 65-75.