

**PEMENCILAN, PENULENAN DAN PENGKULTURAN PROTOPLAS  
DARIPADA SUSPENSI KALUS DAUN PEGAGA (*Centella asiatica*)**

**RAHIMAH BT. AMIR**

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

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

**MAC 2006**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

UDUL: Pemenciran, Penulenan dan Pengkulturan Protoplas Daripada  
Suspens; Kulit Daun Pegaga (Centella asiatica)

IJAZAH: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN  
HG 07 BIOTEKNOLOGI

SAYA RAHIMAH BT AMIR SESI PENGAJIAN: 2003 / 2004

(HURUF BESAR)

Sengaku membenarkan tesis (LPSM/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



(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: NO 48, JALAN  
PT 10RAHIM, 82000  
PONTIAN, JOHOR

DR. ZALDHA ABD AZIZ

Nama Penyelia

Tarikh: 28/4/06Tarikh: 28/4/06

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).



## KANDUNGAN

Muka Surat	
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI FOTO	xi
SENARAI SIMBOL	xii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
<b>BAB 2 ULASAN LITERATUR</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Centella asiatica</i>	5
2.2 Morfologi <i>Centella asiatica</i>	6
2.3 Habitat <i>Centella asiatica</i>	7
2.4 Kandungan kimia <i>Centella asiatica</i>	7
2.5 Kegunaan <i>Centella asiatica</i>	8
2.5.1 Kegunaan tradisional	8
2.5.2 Kegunaan moden	9



2.6	Kultur kalus	11
2.7	Kultur sel ampaian	13
2.8	Protoplas	14
2.8.1	Definisi protoplas	14
2.8.2	Kaedah pemencilan	15
2.9	Faktor-faktor mempengaruhi kultur protoplas	15
2.9.1	Komponen media	15
2.9.2	Hasil dan daya hidup protoplas	17
2.9.3	Keadaan persekitaran kultur	18
2.9.4	<i>Plating density</i>	18
2.10	Aplikasi teknologi protoplas	19
2.11	Kepentingan protoplas	21
<b>BAB 3</b>	<b>BAHAN DAN KAEADAH</b>	23
3.1	Penyediaan medium separa pepejal MS	23
3.2	Penyediaan medium cecair MS	24
3.3	Subkultur kalus	25
3.4	Memulakan kultur sel ampaian	25
3.5	Penyediaan larutan stok enzim (100ml)	26
3.6	Pemencilan protoplas	28
3.7	Penulenan, dan penaksiran hasil protoplas	28
3.8	Penyediaan medium untuk kultur protoplas	30
3.9	Pengkulturan protoplas	33
<b>BAB 4</b>	<b>KEPUTUSAN</b>	34

4.1	Kultur kalus	34
4.2	Kultur sel ampaian	35
4.3	Pemencilan protoplas	37
4.4	Ujian keberdayaan ( <i>viability test</i> )	39
<b>BAB 5</b>	<b>PERBINCANGAN</b>	41
5.1	Kultur kalus	41
5.2	Kultur sel ampaian	42
5.3	Pemencilan protoplas dan ujian keberdayaan	44
<b>BAB 6</b>	<b>KESIMPULAN</b>	49
<b>RUJUKAN</b>		50
<b>LAMPIRAN</b>		54



## PENGAKUAN

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

22 MAC 2006

Rahmah  
RAHIMAH BT. AMIR  
HS2003-2841

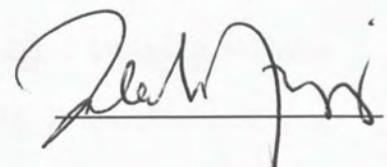


**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**DIPERAKUKAN OLEH**

Tandatangan

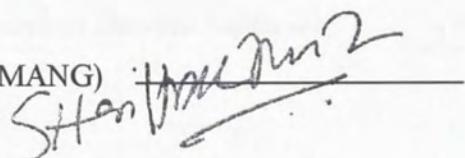
(1) PENYELIA  
(DR. ZALEHA ABD. AZIZ)



(2) PEMERIKSA 1  
(DR. JUALANG AZLAN GANSAU)



(3) DEKAN  
(SUPT/KS PROF MADYA DR. SHARIFF A.K. OMANG)

**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGHARGAAN

Alhamdulillah. Syukur ke hadrat Ilahi, disertasi kajian ini dapat disiapkan akhirnya. Jutaan terima kasih terutamanya kepada penyelia projek iaitu Dr. Zaleha Abd. Aziz yang telah banyak membantu saya menjalankan projek ini dengan memberikan nasihat, dorongan, tunjuk ajar bagaimana menjalankan projek ini, dan tidak jemu menyumbangkan idea serta memberi panduan yang berguna kepada saya bagi memastikan projek ini berjalan lancar. Terima kasih juga kepada pensyarah-pensyarah lain yang memberikan tunjuk ajar yang membantu menyiapkan disertasi kajian ini.

Tidak lupa juga terima kasih kepada kedua-dua ibu bapa yang banyak memberikan kata-kata semangat kepada saya, pelajar pasca-siswazah, pembantu makmal dan kawan-kawan yang membantu saya secara langsung atau tidak langsung dalam menjayakan projek ini.

## ABSTRAK

*Centella asiatica* (Linn.) Urban merupakan tumbuhan herba yang tergolong dalam famili Umbelliferae. Kalus rapuh diperolehi daripada subkultur yang berterusan dalam medium pengaruan separa pejal kalus yang berasaskan medium Murashige dan Skoog (1962) dengan penambahan 3%(w/v) sukrosa,  $0.23 \text{ mgL}^{-1}$  BAP,  $0.21 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D dan juga  $0.5\text{gL}^{-1}$  kasien hidrolysate. Kultur sel ampaian diaruh untuk sumber proses pemencilan protoplas dengan mengkultur kalus rapuh pada medium pengaruan kalus dalam medium bentuk cecair. Protoplas dipencarkan dengan mengeramkan kalus dalam larutan enzim selama 14 jam. Kombinasi enzim yang terdiri daripada 1.5%(w/v) *Cellulase Onozuka R10*, 1.0%(w/v) *Macerozyme R10* dan 0.5%(w/v) *Driselase* digunakan. Kultur sel ampaian pada hari ke-7 dan hari ke-10 pasca-subkultur telah diuji terhadap penghasilan protoplas. Pemencilan protoplas menggunakan kultur sel ampaian pada hari ke-7 pasca-subkultur menghasilkan protoplas lebih banyak iaitu  $1.33 \times 10^5$  protoplas/ml berbanding pada hari ke-10 pasca-subkultur iaitu 0 protoplas/ml. Pemencilan protoplas dapat dilakukan namun begitu protoplas tidak dapat dikultur kerana tidak banyak protoplas berjaya ditulenkan. Protoplas hidup yang diperolehi selepas penulenan kurang daripada 70% dan ini menyebabkan kultur protoplas tidak dapat diteruskan. Namun begitu, kultur sel ampaian yang stabil berjaya diaruh dan dikekalkan untuk kajian pada masa hadapan.

## ABSTRACT

*Centella asiatica* (Linn.) Urban is the medicinal plants of family Umbelliferae. Friable callus were sub cultured continuously on semisolid medium based on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with 3%(w/v) sucrose,  $0.23 \text{ mg L}^{-1}$  BAP,  $0.21 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D and also  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  casein hydrolysate. The cell suspension culture was initiated as a source of protoplast isolation by culturing the friable callus in callus induction medium in the form of liquid. Protoplasts were isolated by incubating the callus in an enzyme solution for 14 hours. The enzyme solution was comprised of 1.5%(w/v) *Cellulase Onozuka R10*, 1.0 %(w/v) *Macerozyme R10* and 0.5%(w/v) *Driselase*. Cell suspension cultures with 7 and 10 days post-subculture were evaluated for protoplast yield. Higher protoplast yield was obtained when using 7 day post-subculture cell suspension ( $1.33 \times 10^5$  protoplasts/ml) as compared to 10 day post-subculture (0 protoplast/ml). The isolated protoplasts could not be cultured due to high loss of protoplasts during the purification process. The viability of protoplasts was obtained less than 70% hence the protoplasts were not cultured. However, stable cell suspension cultures were successfully initiated and maintained for future work.

## SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Khasiat dan kandungan <i>Centella asiatica</i>	11
3.1 Nutrien dalam media MS (Murashige & Skoog's, 1962)	55
3.2 Komposisi pelarut enzim	27
3.3 Nutrien dalam media B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1974)	55
3.4 Jenis dan komposisi media untuk pengkulturan protoplas	31
4.1 Pengiraan protoplas pada haemocytometer	39
4.2 Peratusan keberdayaan protoplas	40



## SENARAI FOTO

No. Foto	Muka surat
2.1 <i>Centella asiatica</i>	6
4.1 A) Subkultur kalus daripada sumber kalus daun pegaga	35
B) Pembentukan kalus setelah 4 minggu subkultur	35
4.2 A) Pengaruhan kultur sel ampaian	36
B) Pengaruhan kultur sel ampaian setelah 2 minggu subkultur	36
C) Pasca subkultur kultur sel ampaian hari ke-2 subkultur	36
D) Pasca subkultur kultur sel ampaian setelah 2 minggu subkultur	36
4.3 A) Protoplas tidak berbentuk sfera (10 hari pasca-subkultur)	38
B) Protoplas dalam keadaan berkelompok (10 hari pasca-subkultur)	38
4.4 A) Protoplas sebelum penulenan (7hari pasca-subkultur)	38
B) Protoplas selepas penulenan (10 hari pasca-subkultur)	38
4.5 A) & B) Protoplas pada haemocytometer	40



## SENARAI SIMBOL

Mikroliter	$\mu\text{L}$
Mililiter	$\text{mL}$
Kilogram	$\text{kg}$
Putaran per minit	Rpm
Darjah Celsius	$^{\circ}\text{C}$
Sentimeter	$\text{cm}$
Meter	$\text{m}$
Milimolar	$\text{mM}$
Normaliti	$\text{N}$
Gram	$\text{g}$
World Health Organization	WHO
Thiobarbituric acid test	TBA
Total Triterpenic Fraction <i>Centella asiatica</i>	TFCA
$\alpha$ -Naphthaleneacetic acid	NAA
Indole-3-acetic acid	IAA
6-benzylaminopurine	BAP
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D
6-benzyladenine	BA



## BAB 1

### PENDAHULUAN

Minat terhadap produk farmaseutikal dan ubat-ubatan yang berasal daripada tumbuhan herba telah meningkat dengan hebatnya pada masa kini. Di Malaysia, nilai pasaran herba dianggarkan sebanyak US\$3.8 billion dan meningkat sebanyak 10 hingga 20% setahun (Omar *et al.*, 2004). Tumbuhan yang dikaji dalam kajian ini ialah *Centella asiatica* atau namanya di Malaysia ialah pegaga.

Terdapat banyak kegunaan *C. asiatica* antaranya, di Malaysia, biasanya *C. asiatica* digunakan sebagai ulam oleh orang Melayu, sebagai minuman penyejuk badan oleh orang Cina dan sebagai tonik untuk otak oleh orang India. Daunnya dimakan segar sebagai ulam atau dimasak. Kegunaan utama *C. asiatica* ialah dalam menyembuhkan luka dan menggalakkan kesihatan tisu kulit. Ia digunakan untuk menghalang pembentukan parut pada tisu kulit, juga mengubati ulser kusta, ulser perut dan ulser duodenal, dan bertindak sebagai tonik pelbagai fungsi lebih dikenali sebagai adaptogen (Mat-Salleh *et al.*, 2002).

Sesetengah orang menggunakan air rendaman daun pegaga untuk merawat sakit-sakit badan, atau pegaga yang telah dilumatkan boleh disapu ke seluruh badan apabila demam. Selain itu, daun pegaga juga amat baik untuk ibu-ibu yang baru bersalin dan untuk awet muda. Jus akar pegaga pula digunakan untuk mencuci luka ulser (Mat-Salleh *et al.*, 2002).

Di Malaysia, penjualan pegaga tempatan biasanya dilakukan oleh pengusaha kecil yang memperolehi pegaga ini daripada pekebun atau menanam sendiri tumbuhan ini atau yang dipungut dari hutan. Ia biasanya dijual di pasar tani atau pasar malam dengan harga lebih kurang RM6 per kg untuk berat segar pada tahun 1998 (Jaganath & Ng, 2000). Dengan bertambahnya kepentingan dan permintaan global pegaga, beberapa pengeluar atau pengilang telah mengambil peluang untuk menghasilkan produk herba pegaga tetapi terdapat masalah dalam industri ini kerana kesukaran mendapatkan bahan-bahan mentah yang lebih konsisten dan berkualiti.

Kebanyakan bekalan pada masa kini diimport dari Indonesia dan India. Oleh sebab itu, terdapat banyak permintaan pegaga tempatan bagi mengurangkan kos pengeluaran sesuatu produk pegaga. Beberapa jenis produk pegaga di Malaysia termasuklah teh pegaga, produk makanan kesihatan dan produk kesihatan tambahan. Pengeluaran produk pegaga secara komersial ketika ini hanya terhad di dua negara, iaitu Sri Lanka dan Madagaskar. Madagaskar merupakan pembekal utama pegaga untuk farmaseutikal di pasaran dunia dengan pertambahan eksport tahunan dari 26 ke 96 tan setahun dalam jangka masa 1979 hingga 1988 (Jaganath & Ng, 2000).

Oleh kerana pegaga digunakan untuk menghasilkan produk seperti kecantikan, kesihatan dan sebagainya, maka mutu pegaga harus ditingkatkan.

Kajian yang dilakukan ini dapat meningkatkan kualiti dan mutu pegaga kerana Teknologi protoplas boleh diaplikasikan untuk memajukan tumbuhan bagi memperbaiki agronomi dan perkebunan, dan memperbaiki rintangan penyakit melalui hibrid paraseksual dan kejuruteraan genetik tumbuhan (Schum *et al.*, 2001).

Dengan memencarkan protoplas dan regenerasi tumbuhan daripada protoplas, variasi somaklonal dengan sifat-sifat yang telah diperbaiki dapat diperoleh. Paraseksual atau hibrid somatik boleh diperolehi dengan penggabungan protoplas dari spesies yang tidak bersaudara atau spesies yang jauh hubungan. Melalui kejuruteraan genetik, gen asing boleh dipindahkan ke sel tumbuhan dan tumbuhan yang mempunyai gen baru ini boleh diregenerasikan. Ia boleh dilakukan dengan pelbagai cara seperti elektroporasi, penggeraman dengan bakteria, kejutan haba dan rawatan pH yang tinggi bagi merangsang penggabungan protoplas (Schween *et al.*, 2003).

Tumbuhan yang telah diperbaiki daripada manipulasi protoplas digunakan dalam program pembiakan untuk memperkembangkan pelbagai hasilan tanaman baru yang mempunyai ciri-ciri seperti perubahan morfologi daun dan bunga, tahap kesuburan yang tinggi, rintangan penyakit yang lebih baik dan variasi dalam penghasilan produk sekunder (Schween *et al.*, 2003).

Objektif kajian ini adalah untuk mengkaji kesan kultur media yang berbeza bagi pembentukan protokoloni. Terdapat tiga media yang dikaji untuk melihat apakah media-media yang sesuai untuk penbahagian protoplas bagi tumbuhan pegaga. Media-media tersebut dikombinasikan dengan jenis dan kepekatan hormon yang berbeza. Sumber yang dikaji adalah daripada kalus daun pegaga.

Kultur protoplas dipengaruhi oleh banyak faktor dan sangat memerlukan analisis yang sistematis, empirikal dan kadang-kala tidak juga berjaya (Lorz *et al.*, 1983). Menurut Lorz *et al.* (1983) juga biasanya makro- dan/atau mikronutrien media atau kombinasi dan/atau kepekatan fitohormon diubahsuai untuk perbaiki keefisiensi kultur.

## BAB 2

### ULASAN LITERATUR

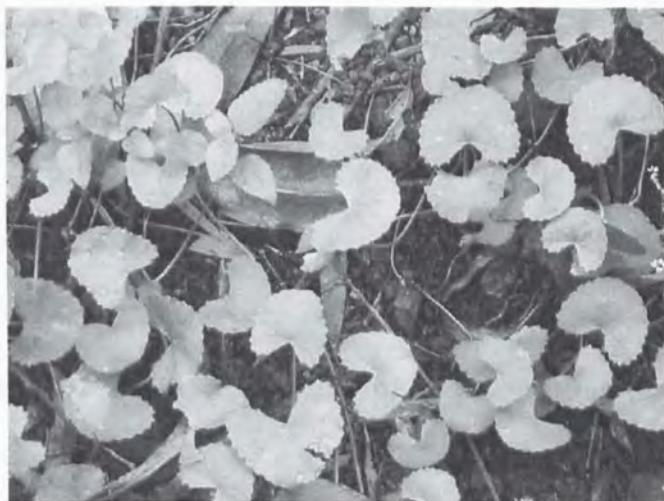
#### 2.1 *Centella asiatica*

Negara asal tumbuhan ini tidak diketahui tetapi dipercayai berasal dari India atau Asia Tenggara (Ismail Saidin, 2000). *Centella asiatica* adalah dari keluarga Umbelliferae/Apiaceae juga dikenali oleh masyarakat Malaysia sebagai daun kaki kuda, pegaga tekukur dan pegaga ular. Nama lain *C. asiatica* ialah *Asiatic Pennywort* dan *Gotu Kola* (Omar *et al.*, 2004).

Tumbuhan ini dan penyediaannya telah berkurun digunakan dalam sistem perubatan *Ayurvedic* di India dan perubatan tradisional Cina dan Madagaskar (Ismail Saidin, 2000). Ia juga telah disyorkan oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) sebagai satu daripada spesies tumbuhan ubat yang paling penting perlu dipulihara dan dibiakkan (Jaganath & Ng, 2000). Bahagian yang digunakan ialah daun, akar dan kesemua bahagian pegaga (Zakaria & Mohamad, 1992). Terdapat tiga subspesies pegaga yang boleh dibezakan iaitu pegaga salad, pegaga kerinting dan pegaga biasa atau pegaga ubi. Pada tahap ini, pegaga ubi dicadangkan untuk penghasilan komersial (Jaganath & Ng, 2000).

## 2.2 Morfologi *Centella asiatica*

*Centella asiatica* merupakan jenis herba kecil yang merayap, semusim, berbatang halus panjang dan daunnya berbentuk ginjal. *C. asiatica* juga merupakan herba menjalar, batang stolon dan berizom pada buku ruas. Daunnya tumbuh roset pada buku ruas, lai daunnya hampir orbikular, bes kordat, tepi daun bergerigi dan daunnya bersaiz 2-5 cm diameter. Petiol 5-10 cm panjang. Daunnya berwarna hijau tua dan beraroma sedikit apabila diramas. Infloresennya pedunkel, kira-kira 1-2 cm panjang dan biasanya terdapat 2-3 kuntum bunga yang kecil berwarna ungu kehitaman. Buahnya halus, ovoid dan berwarna putih kehijauan (Ismail Saidin, 2000).



Sumber: Forest & Kim, 2000.

Foto 2.1 *Centella asiatica* menjalar di atas tanah

### 2.3 Habitat *Centella asiatica*

*Centella asiatica* tumbuh secara liar di kawasan lapang yang luas, sesetengah jenis *C. asiatica* gemarkan tempat teduh daripada cahaya, manakala jenis lain gemarkan kawasan terbuka yang bercahaya. Selain itu ada juga yang tumbuh di celah-celah batu. Di hutan, tumbuhan ini biasanya dijumpai di kawasan yang lembap seperti paya, di sekitar tepi tasik, kolam dan ada juga yang dilihat tumbuh di sawah padi (Jaganath & Ng., 2000). Di Indonesia, tumbuhan ini dijumpai dari dataran rendah hingga ketinggian  $\pm 2500\text{m}$  dari paras laut di mana ia tumbuh setempat dengan jumlah yang besar di kawasan lapang bercahaya atau kawasan lembap (Heyne, 1987).

### 2.4 Kandungan kimia *Centella asiatica*

Terdiri daripada sebatian bioaktif triterpenoids yang merangkumi asid asiatik, *asiaticoside*, asid *madecassic* dan *madecassoside* (Omar *et al.*, 2004). Manakala terdapat sejumlah bahan kimia lain adalah seperti asid askorbik, asid betulik, *bicycloelemene*, asid *brahmic*, *brahminoside*, *brahmoside*, *campesterol*, *camphor*,  $\beta$ -karotene,  $\beta$ -*caryophyllene*, asid *centellic*, *centellose*, centelloside,  $\beta$ -elemene, asid *lignoceric*, asid madasiatik, *madecassol*, niasin, thiamin, riboflavin, alkaloids, asid lemak, myo-inositol, flavonol, mineral, polifenol, gula, tannin, vallerine, *saponins*, *sterols* dan *triterpenes* (Jaganath & Ng, 2000).

## 2.5 Kegunaan *Centella asiatica*

### 2.5.1 Kegunaan tradisional

Bagi kebanyakan masyarakat, *Centella asiatica* digunakan untuk merawat bronkitis, asma, merawat rembesan jus gastrik yang melampau, cirit-birit, *leucorrhoea*, masalah buah pinggang, *urethritis*, dan dropsi. Ekstrak segar tumbuhan ini telah lama digunakan oleh orang Jawa untuk menyembuhkan luka (Abdul Hamid *et al.*, 2002).

Di Malaysia, biasanya *C. asiatica* digunakan sebagai ulam oleh orang Melayu, sebagai minuman penyejuk oleh orang Cina dan sebagai tonik untuk otak oleh orang India. Daunnya dimakan segar sebagai ulam atau dimasak. Orang Melayu menggunakan air rebusan daun untuk merawat penyakit kusta dan sakit sendi. Air seduhan daripada daun yang kering atau jus daun dicampur ke dalam makanan bagi meredakan penyakit berak berdarah yang ringan bagi kanak-kanak. Ada juga yang menggunakan air rendaman daun untuk merawat sakit-sakit badan, atau pupuk *C. asiatica* disapu ke seluruh tubuh apabila demam. Daunnya juga amat baik untuk ibu-ibu yang baru bersalin. Jus akar *C. asiatica* pula digunakan untuk merawat luka ulser (Ismail Saidin, 2000). Ia juga digunakan untuk mengurangkan sakit gigi di mana daunnya dihancurkan dan diletakkan pada gigi yang sakit tersebut (Mat Salleh *et al.*, 2002).

Dalam perubatan China, *C. asiatica* digunakan sebagai *antipyretic*, diuretik dan sebagai antidot dalam rawatan strok haba, cirit-birit, ulcer, ekzema, penyakit trauma, jangkitan saluran kencing dan batu karang, hidung berdarah, selesema biasa, hepatitis, bengkak pada anak tekak, disentri, sakit tekak, bronkitis, faringitis, batuk, akut bengkak usus, akut konjunktivitis, glaukoma, tekanan darah tinggi, beguk, *mastitis*, campak dan *uremia*. Secara luarannya pula, *C. asiatica* digunakan untuk merawat luka berdarah, lebam, bisul, gigitan ular, ruam lampin dan ruam dubur pada bayi dan penyakit kayap (Heyne, 1987).

Di India, daunnya dikeringkan, dijadikan serbuk dan dicampur dengan susu lalu diminum untuk meningkatkan daya ingatan dan sebagai tonik. Tumbuhan ini berguna secara dalaman dan luaran untuk penyakit kulit, ekzema kronik, sifilis peringkat sekunder dan tertier, pembengkakan kelenjar, kusta, bengkak bernanah, rheumatisma kronik dan penyakit *urino-genital* (Patra *et al.*, 1998).

#### 2.5.2 Kegunaan moden

Tumbuhan ini banyak digunakan untuk mejalankan pelbagai kajian mengenai aspek farmakologi. Kajian moden telah menunjukkan bahawa *C. asiatica* memiliki kebolehan sebagai anti-bakteria, anti-malaria dan anti-pembriakan (*proliferative*) (Omar *et al.*, 2004).

Terdapat kajian yang dijalankan ke atas ekstrak *C. asiatica* telah menunjukkan kesan penyembuhan terhadap luka tikus. *Asiaticoside* telah dilaporkan dapat memperbaiki

kesan penyembuhan luka. Ekstrak *C. asiatica* juga menunjukkan kesan sedatif dan anti-tekanan dalam ujian farmakologikal dengan tikus (Jaganath & Ng, 2000).

Abdul Hamid *et al.* (2000) telah menjalankan pencirian anti-oksidatif terhadap pelbagai ekstrak *C. asiatica*. Ekstrak tersebut daripada bahagian *C. asiatica* yang berbeza seperti daun, petiol dan akar dengan menggunakan tiga jenis larutan iaitu etanol, air dan petroleum jernih, yang dinilaikan dengan model sistem asid linolik dan ujian asid thiobarbiturik (TBA). Kedua-dua ujian ini memberikan keputusan yang sama. Keputusan menunjukkan ekstrak semua bahagian *C. asiatica* memberikan aktiviti anti-oksidatif yang tinggi dengan ekstrak etanol berbanding air dan petroleum jernih. Melalui kajian ini didapati bahawa etanol adalah pelarut yang terbaik dalam mengekstrak campuran anti-oksidatif. Bahagian akar pula menunjukkan aktiviti anti-oksidatif yang paling tinggi berbanding bahagian lain.

Terdapat juga ujian klinikal dan kajian kes yang telah membuktikan ekstrak *C. asiatica* banyak manfaat positif dalam menyembuhkan luka kulit, melecur dan penyakit kulit juga merawat ulcer perut dan duodenal. Kajian terhadap jumlah bahagian triterpenik *C. asiatica* (TFCA) menunjukkan ekstrak *C. asiatica* memberi kesan terhadap tahap serum asid uronik dan enzim *lysosomal*, dan juga terlibat dalam metabolisme dinding vaskular. Kajian ini juga menunjukkan *C. asiatica* memperbaiki kitaran mikro dan ketelapan kapilar pesakit yang menghidap hipertensi (Jaganath & Ng, 2000).

**Jadual 2.1** menunjukkan khasiat dan kandungan *Centella asiatica*.

Khasiat	Kandungan
Air	87.78 g
Protein	2.0 g
Lemak	0.2 g
Karbohidrat	6.7 g
Serat	1.6 g
Kalsium	171 mg
Fosforus	32 mg
Ferum	5.6 mg
Natrium	21 mg
Kalium	391 mg
Karotene	2649 µg
Vitamin A	422 µg
Vitamin B1	0.09 mg
Vitamin B2	0.19 mg
Niasin	0.1 mg
Vitamin C	48.5 mg

Sumber: Ismail Saidin, 2000.

## 2.6 Kultur kalus

Kaedah kultur tisu kalus daripada eksplan daun *C. asiatica* telah digunakan untuk mendapatkan sel protoplas. Kalus adalah pertumbuhan jisim sel yang tidak teratur, hampir tiada pembezaan atau tiada perkembangan (KYTE & KLEYN, 1996). Kultur kalus adalah satu teknik kultur tisu tumbuhan, biasanya dikultur di atas medium gel pepejal dengan kehadiran pengawalatur pertumbuhan dan dimulakan dengan inokulasi eksplan

## RUJUKAN

- Abdul Hamid, A., Md. Shah, Z., Musa, R. & Mohamed, S., 2002. Characterization of Antioxidative Activities of Various Extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chemistry*. **77**, 465-469.
- Assani A., 2001. Plant Regeneration from Protoplasts of Dessert Banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Rep.* **20**, 482-488.
- Babaoglu, M., 2000. Protoplast Isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Determination of Optimum Explant Sources and Isolation Conditions. *Turk J Bot.* **24**, 177-185.
- Bajaj, Y.P.S. (pnyt.), 1994. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 29: Plant Protoplasts and Genetic Engineering V*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Bajaj, Y.P.S. (pnyt.), 1995. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 34: Plant Protoplasts and Genetic Engineering VI*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Breganta, M., Gambale, F. & LoShiavo, F., 1996. Ionic Transport in the Plasma Membrane of Carrot Protoplasts from Embryogenic Cell-Suspension Cultures. *FEBS Letters*. **380**, 97-102.
- Cazaux, E. & d'Auzac, J., 1994. Evaluation of Parameters Affecting the Isolation and Culture of Protoplast of *Hevea brasiliensis* (Muell.Arg). *Plant Cell Rep.* **13**, 272-276.

- Endress, R., 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Forest S. & Kim S., 2002. *Centella asiatica (Apiaceae): Plants of Hawaii*. <http://www.hear.org/starr/hiplants/images>.
- Hartmann, H.T. & Kester, D.E., 2002. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Ed. Ke-7. Pearson Education, Inc. New Jersey.
- Heyne, K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia III*. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta.
- Ismail Saidin, 2000. *Sejarah Tradisional Ulam dan Penyedap Rasa*. Universiti Kebangsaan Malaysia. Bangi.
- Jaganath, I.B. & Ng, L.T., 2000. *Herbs: The Green Pharmacy of Malaysia*. Vinpress Sdn. Bhd.
- Kim G.H., Klotchkova, T.A. & Kang, Y.M., 2001. Life Without a Cell Membrane: Regeneration of Protoplasts from Disintegrated Cells of the Marine Green Algae *Bryopsis Plumosa*. **114**, 2009-2014.
- Kyne, L. & Kleyn, J., 1996. *Plant from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*. Ed. Ke-3. Timber Press Inc.
- Loudon P.T., Nelson R.S. & Ingram D.S., 1989. Studies of Protoplast Culture and Plant Regeneration from Commercial and Rapid-Cycling Brassica species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **19**, 213-224.
- Lorz, H., Larkin, P.J., Thomson, J. & Scowcroft W.R., 1983. Improved Protoplast Culture and Agarose Media. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. **2**, 217-226.



Mat-Salleh K., Nahar N. & Ghafi H. (pnyt.), 2002. *Tumbuhan Ubatan Malaysia*. Pusat Pengurusan Penyelidikan. Universiti Kebangsaan Malaysia. Bangi.

Mukerji, K.G. & Bhasin, J., 1986. *Plant Diseases of India: A Sourcebook*. TATA McGraw-Hill Publishing Companies Inc. New Delhi.

Nesius K.K. & Fletcher J.S., 1973. Carbon dioxide and pH Requirements of Non-Photosynthetic Tissue Culture Cells. *Physiol Plant.* **28**, 259.

Patra, A., Rai, B., Rout, G.R. & Das, P., 1998. Succesful Plant Regeneration from Callus Cultures of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. *Plant Growth Regulation.* **24**, 13-16.

Paramageetham, C., Prasad B.G. & Rao, J.V.S., 2004. Somatic Embryogenesis in *Centella asiatica* L. An Important Medicinal and Neutraceutical Plant of India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **79**, 19-24.

Pioneer Enterprise, 2000. *Centella asiatica*. [http://www.pioneerherbs.com/centella\\_asiatica.html](http://www.pioneerherbs.com/centella_asiatica.html).

Prasertsongskun, S., 2004. Isolation and Culture of Suspension Protoplasts of *Vetiver*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**(3), 411-416.

Robinson, H.L. & Deacon J.W., 2001. Protoplast Preparation and Transient Transformation of *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research.* **105**(1), 1295-1303.

Omar, R., Abdullah, M.A., Hasan, M.A. & Marziah, M., 2004. Development of Growth Medium for *Centella asiatica* Cell Culture via Response Surface Methodology. *American Journal of Applied Sciences.* **1**(3), 215-219.



- Schween, G., Hohe, A., Koprivova, A. & Reski, R., 2003. Effects of Nutrients, Cell Density and Culture Techniques on Protoplast Regeneration and Early Protonema Development in a Moss, *Physcomitrella patens*. *J. Plant Physiol.* **160**, 209-212.
- Schum, A., Hofmann, K., Ghalib, N. & Tawfik, A., 2001. Factors Affecting Protoplast Isolation and Plant Regeneration in Rosa spp. *Gartenbauwissenschaft*. **66**(3), 115-122.
- Shigetaka Ishii, 1988. Factors Influencing Protoplast Viability of Suspension-Cultured Rice Cells during Isolation Process. *Plant Physiol.* **88**, 26-29.
- Sutiojono E., Nonhebel H.M. & Kantharajah A.S., 1998. Factors Affecting Protoplast Culture of *Cucumis melo* 'Green Delica'. *Annals of Botany*. **81**, 775-777.
- Trigiano, R.N. & Gray, D.J. (pnyt.), 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Ed. Ke-2. CRC Press LLC. Boca Raton. FL.
- Yong, Z.N., Xu, Z.H. & Wei, Z.M., 1994. Cauliflower Inflorescence Protoplast Culture and Plant Regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ*. **36**, 191-195.
- Zakaria, M. & Mohamad M., 1992. *Tumbuhan dan Perubatan Tradisional*. Fajar Bakti Sdn. Bhd. Petaling Jaya.