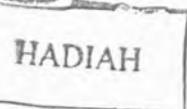


157753 -

4000008860



REGENERASI *CENTELLA ASIATICA* DARIPADA DAUN

NOR ESNITA BINTI MOHD SALLEH

**DISERTASIINI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA SAINS DENGAN
KEPUJIAN**

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

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

Mac 2006

PERPUSTAKAAN UMS



1400008860



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

DUL: REGENERASI CENTELLA ASIATICA DARIPADA DAUNAZAH: SARJANA SAINS DENGAN KEPUJIAN (BIOTEKNOLOGI)YA NOR ESHTIA BT MOHD SALEH SESI PENGAJIAN: 2003/2006
(HURUF BESAR) 2003 - 2006

ngaku 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 (/)

<input type="checkbox"/>	SULIT	(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau Kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)
<input checked="" type="checkbox"/>	TERHAD	(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)
<input type="checkbox"/>	TIDAK TERHAD	

Disahkan Oleh

Zaleha Abd Aziiz

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

amat Tetap: NO. 7, JLN 17C
G- IPAMAN 42000
PRT KLANG.DR ZALEHA ABD A212

Nama Penyelia

Tarikh: 24/04/06Tarikh: 24/04/06

TATAN: - *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).



PENGAKUAN

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

20 Mac 2006



NOR ESNITA MOHD SALLEH
HS 2003-2823



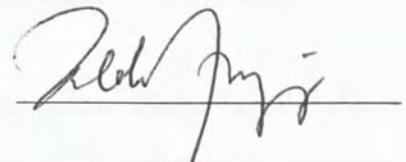
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK

DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

1. PENYELIA

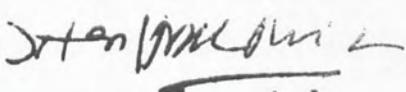
(Dr. Zaleha Abd. Aziz)

**2. PEMERIKSA 1**

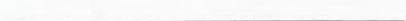
(Dr. Jualang Azlan Gansau)

**3. DEKAN**

(Prof. Madya Dr. Shariff A.Kadir)



S. Omang)

**UMS**
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK

PENGHARGAAN

Syukur alhamdulillah saya panjatkan ke hadrat Ilahi kerana di atas limpah kurnia serta nikmat yang dikurniakan oleh-Nya, saya dapat menyiapkan projek saya yang bertajuk “Regenerasi *Centella asiatica* Daripada Daun” bagi memenuhi sebahagian daripada syarat memperolehi ijazah sarjana muda sains dengan kepujian ini dalam tahun ini.

Buat julung kalinya, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Universiti Malaysia Sabah yang telah memberikan saya peluang untuk meneruskan pengajian di universiti ini serta penyediaan peralatan serta bahan yang diperlukan dalam menjalankan projek ini. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada penyelia saya, Dr. Zaleha Abdul Aziz yang telah banyak memberikan tunjuk ajar serta panduan yang amat bermakna dan berharga bagi menjayakan projek ini. Tanpa tunjuk ajar dari beliau, pastinya projek ini tidak dapat berjalan dengan baik sehingga ke tahap ini. Segala tunjuk ajar dan panduan dari beliau amatlah dihargai dan disanjungi. Tidak lupa juga kepada Puan Radizah selaku pembantu makmal yang turut sama membantu saya sepanjang menjalankan projek ini.

Tidak lupa juga ucapan terima kasih kepada pelajar pasca siswazah, Czelum Wong, Roseline Baun Ajang dan Koo Geck Chin, yang turut memberikan pendapat serta bantuan yang tidak terhingga sepanjang projek ini dijalankan. Terima kasih juga diucapkan kepada ibu bapa saya, Encik Mohd Salleh b. Harun dan Puan Esah bt Mat Som serta keluarga yang tersayang di atas sokongan dan dorongan kepada saya dari bermulanya projek ini sehinggalah ke akhir projek ini dijalankan. Setinggi ucapan terima kasih juga diucapkan kepada Mohd Zuhair Zainal Abidin di atas sokongan serta bantuan beliau dalam menjayakan projek ini. Seterusnya kepada rakan-rakan di atas bantuan yang diberikan. Segala bantuan serta sokongan yang diberikan tidak ternilai harganya dan amat bermakna bagi menjayakan projek ini dan pastinya menjadi ingatan buat selamanya. Sekian terima kasih. Wassalam.

ABSTRAK

Menyedari akan kepentingan *Centella asiatica* yang kaya dengan pelbagai bahan kimia yang terkandung di dalamnya seperti asiatikosida asid, asiatik dan sebagainya, para saintis telah terdorong untuk mencari teknik yang lebih cekap bagi meningkatkan mutu *C. asiatica*. Bioteknologi dapat membantu penghasilan *C. asiatica* dengan kualiti yang tinggi melalui teknik-teknik transformasi genetik. Dalam transformasi genetik, saintis-saintis memerlukan satu sistem yang cekap bagi regenerasi *C. asiatica*, justeru kajian ini dijalankan adalah untuk melihat kesan sumber karbon terhadap regenerasi *C. asiatica*. Media Murashige dan Skoog (MS) telah dipilih bagi meregenerasi daun *C. asiatica*. Proses regenerasi *C. asiatica* dengan menggunakan daun ini didorong dengan penggunaan dua kombinasi hormon yang berbeza iaitu $8.87\mu\text{M}$ benzylaminopurine (BAP) dan $2.85\mu\text{M}$ *indole acetic acid* (IAA) dan $8.87\mu\text{M}$ BAP dan $2.26\mu\text{M}$ *naphtaleneacetic acid* (NAA). Kedua-dua media ini ditambah dengan tiga jenis sumber karbon telah digunakan pada kepekatan yang berbeza; 4% (w/v) sukrosa, 3% (w/v) sukrosa, 3% (w/v) glukosa, 3% (w/v) fruktosa serta campuran 1.5% (w/v) glukosa dan fruktosa. Media dengan kedua-dua kombinasi hormon tanpa sebarang sumber karbon dijadikan sebagai kawalan di dalam kajian ini. Kombinasi $8.87\mu\text{M}$ BAP dan $2.26\mu\text{M}$ NAA memberikan pertumbuhan kalus yang lebih baik berbanding kombinasi $8.87\mu\text{M}$ BAP dan $2.85\mu\text{M}$ IAA. Kalus dapat dihasilkan dengan lebih cepat pada media yang mengandungi campuran 1.5% (w/v) glukosa dan 1.5% (w/v) fruktosa dengan kombinasi $8.87\mu\text{M}$ BAP dan $2.85\mu\text{M}$ IAA iaitu pada minggu ketiga tetapi kuantiti kalus yang banyak terhasil pada eksplan yang dikultur di atas media yang mengandungi 3% (w/v) glukosa dan kombinasi $8.87\mu\text{M}$ BAP dan $2.26\mu\text{M}$ NAA. Kalus berbentuk nodular dan keras dapat dihasilkan daripada eksplan yang dikultur di atas setiap media kecuali pada eksplan yang dikultur pada media kawalan dengan kombinasi $8.87\mu\text{M}$ BAP dan $2.85\mu\text{M}$ IAA. Namun begitu, pertumbuhan kalus tidak dapat menghasilkan pucuk mahupun akar kerana kontaminasi serta keperangan yang disebabkan oleh faktor-faktor tertentu seperti suhu, cahaya dan jenis media yang digunakan.

ABSTRACT

Realizing the importance of *Centella asiatica* which is rich with therapeutic chemicals, scientists are driven to improve the quality of *C. asiatica*. Biotechnology can genetically improve *C. asiatica* through genetic transformation technique. A good regeneration system for *C. asiatica* is perquisite for transformation of the species. Hence, this study was carried out to evaluate the effect of different carbon sources on regeneration of *C. asiatica* leaf segments. Two hormone combinations; 8.87 μ M benzylaminopurine (BAP) and 2.85 μ M indole acetic acid (IAA) and 8.87 μ M BAP and 2.26 μ M naphtaleneacetic acid (NAA) were used for *C. asiatica* regeneration supplemented with three types of carbon sources at different concentrations were used; 4% (w/v) sucrose, 3% (w/v) sucrose, 3% (w/v) glucose, 3% (w/v) fructose and a mix of 1.5% (w/v) glucose and fructose. Media with these hormone combinations and without any carbon sources were used as the control media in this experiment. Hormone combination with 8.87 μ M BAP combination and 2.26 μ M NAA induced callus better on explants than the combination of 8.87 μ M BAP and 2.85 μ M IAA. Nodular and solid callus formation was also effected by the carbon sources, media containing 1.5% (w/v) fructose and glucose with 8.87 μ M BAP and 2.85 μ M IAA produced callus faster (3 weeks) than the other media but explants on media with 3% (w/v) sucrose and 8.87 μ M BAP and 2.26 μ M NAA produced more callus. However, no embryo or organ was observed on any of the explants.



KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI FOTO	xi
SENARAI SIMBOL	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	
2.1 <i>Centella asiatica</i>	4
2.1.1 Ciri-ciri tumbuhan <i>Centella asiatica</i>	5
2.1.2 Kompaun-kompaun yang terdapat di dalam <i>Centella Asiatica</i>	6
2.1.3 Kegunaan <i>Centella asiatica</i>	6
2.2 Regenerasi	9
2.2.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi regenerasi	9
2.2.2 Organogenesis	14
2.2.3 Embriogenesis	15
2.3 Gula atau Sumber Karbon	17
2.3.1 Sukrosa	18
2.3.2 Glukosa	19
2.3.3 Fruktosa	19



BAB 3	METODOLOGI	21
BAB 4	KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA	34
BAB 5	PERBINCANGAN	54
BAB 6	KESIMPULAN	65
RUJUKAN		67
LAMPIRAN A		74
LAMPIRAN B		75
LAMPIRAN C		76



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Muka surat
3.1	Senarai bahan kimia yang terkandung di dalam larutan stok media MS.	22
3.2	Fungsi setiap komponen dan kesan kekurangannya terhadap pertumbuhan eksplan.	23
3.3	Kombinasi hormon dan sumber karbon pada kepekatan yang berbeza di dalam setiap set media MS.	30
4.1	Kesan media terhadap eksplan yang dikulturkan.	37
4.2	Kontaminasi yang berlaku ke atas eksplan dari hari keempat eksplan dikultur sehingga minggu ketujuh.	51



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka surat
3.1 Langkah penyediaan media MS.	29
4.1 Tindakbalas eksplan terhadap media dengan kombinasi 8.87 μ M BAP dan 2.85 μ M IAA.	38
4.2 Tindakbalas eksplan terhadap media dengan kombinasi 8.87 μ M BAP dan 2.26 μ M NAA.	38
4.3 Peratus tindakbalas keseluruhan eksplan terhadap media setelah tujuh minggu dikultur di dalam media.	52



SENARAI FOTO

No. Foto		Muka surat
2.1	<i>Centella asiatica.</i>	5
4.1	Kesan media yang mengandungi 4% (w/v) sukrosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.85 μM IAA terhadap eksplan.	39
4.2	Kesan media yang mengandungi 4% (w/v) sukrosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.26 μM NAA terhadap eksplan.	40
4.3	Kesan media yang mengandungi 3% (w/v) sukrosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.85 μM IAA terhadap eksplan.	41
4.4	Kesan media yang mengandungi 3% (w/v) sukrosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.26 μM NAA terhadap eksplan.	42
4.5	Kesan media yang mengandungi 3% (w/v) glukosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.85 μM IAA terhadap eksplan.	43
4.6	Kesan media yang mengandungi 3% (w/v) glukosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.26 μM NAA terhadap eksplan.	44
4.7	Kesan media yang mengandungi 3% (w/v) fruktosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.85 μM IAA terhadap media.	45
4.8	Kesan media yang mengandungi 3% (w/v) fruktosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.26 μM NAA terhadap eksplan.	46
4.9	Kesan media yang mengandungi 1.5% (w/v) fruktosa dan 1.5% (w/v) glukosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.85 μM IAA terhadap eksplan.	47
4.10	Kesan media yang mengandungi 1.5% (w/v) fruktosa dan 1.5% (w/v) glukosa dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.26 μM NAA terhadap eksplan.	48
4.11	Kesan media kawalan dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.85 μM IAA terhadap eksplan.	49
4.12	Kesan media kawalan dengan kombinasi hormon 8.87 μM BAP dan 2.26 μM NAA terhadap eksplan.	49



4.13 Kontaminasi yang berlaku ke atas eksplan.	51
4.14 Eksplan yang menjadi perang.	53



SENARAI SIMBOL

cm	sentimeter
μM	mikromolar
M	molar
ml	mililiter
g	gram
L	liter
mg l^{-1}	miligram per liter
mg ml^{-1}	miligram per mililiter
g l^{-1}	gram per liter
$^{\circ}\text{C}$	darjah selsius
v/v	isipadu/isipadu
w/v	berat/isipadu
v	isipadu
BAP	benzylaminopurine
NAA	naphtaleneacetic acid
IAA	indole acetic acid
%	peratus
N	normaliti
SD	sisihan piawai
JMR	jisim molekul relatif



BAB 1

PENDAHULUAN

Centella asiatica adalah merupakan salah satu daripada tumbuhan herba yang kaya dengan khasiat semulajadinya. Ia adalah merupakan salah satu tumbuhan dari famili Umbelliferae atau dikenali juga sebagai famili Apiaceae. Di Malaysia, *C. asiatica* juga dikenali sebagai pegaga. Ia mengandungi pelbagai khasiat yang boleh merawat pelbagai jenis penyakit. Kini, ia terdapat di dalam pelbagai bentuk di pasaran iaitu dalam bentuk serbuk, minyak sapi dan di dalam krim atau kosmetik (Li, 2000).

Centella asiatica dipercayai berasal dari negara India dengan nama Mandukaparni. Namun begitu, *C. asiatica* juga terdapat di negara-negara yang beriklim tropika dan sub-tropika seperti Afrika, Amerika Selatan dan negara-negara asia seperti China dan Malaysia. Ia tumbuh menjalar di atas tanah yang lembap. Terdapat juga *C.*



asiatica yang tumbuh di kawasan paya. Pokok *C. asiatica* terbahagi kepada beberapa segmen iaitu daun, petiol, internod, stolon dan akar. Kesemua bahagian pada pokok *C. asiatica* ini mengandungi kompaun-kompaun yang sering digunakan bagi tujuan perubatan seperti asid asiatik, asiatikosida, karotenoid, vitamin B dan vitamin C.

Permintaan yang tinggi terhadap *C. asiatica* menyebabkan teknik penanaman yang biasa digunakan untuk menanam *C. asiatica* tidak dapat menampung permintaan yang tinggi terhadap *C. asiatica*. Ini disebabkan beberapa faktor seperti kekurangan kawasan penanaman (Altman, 1998) dan serangan serangga perosak yang menghalang penghasilan *C. asiatica* dalam kuantiti yang banyak. Tambahan pula, masa yang diperlukan untuk menghasilkan pokok *C. asiatica* dengan menggunakan teknik penanaman yang biasa adalah lebih panjang berbanding teknik pengkulturan yang dilakukan di dalam makmal. Selain itu, teknik penanaman yang biasa digunakan memerlukan tenaga buruh yang tinggi bagi memastikan tanaman berada dalam keadaan baik bagi memperolehi *C. asiatica* yang berkualiti tinggi.

Kaedah regenerasi *in vitro* dapat membantu penghasilan *C. asiatica* yang berkualiti tinggi di samping mengurangkan risiko serangan mikroorganisma ke atas *C. asiatica*. Selain itu, ia juga merupakan salah satu cara yang dapat diaplikasikan bagi meningkatkan hasil tanaman dengan lebih cekap (Altman, 1998). Ia tidak memerlukan kawasan penanaman yang luas di samping dapat mengelakkan tumbuhan dari serangan



serangga perosak tanpa menggunakan tenaga buruh yang ramai bagi mengawal serangan serangga ke atas *C. asiatica*. Regenerasi *C. asiatica* dilakukan melalui organogenesis atau embriogenesis. Eksplan yang biasa digunakan dalam regenerasi *C. asiatica* ialah dari bahagian daun, batang, petiol dan internod. Regenerasi secara *in vitro* dapat menghasilkan *C. asiatica* dengan banyak dalam masa yang singkat dan berupaya menampung permintaan yang tinggi terhadap tumbuhan ini untuk tujuan komersial.

Kajian ini dijalankan untuk mencari sistem regenerasi *C. asiatica* yang lebih cekap bagi menghasilkan *C. asiatica* dalam jumlah yang tinggi di samping membantu penyelidik-penyalidik dalam usaha mentransformasi *C. asiatica*. Tiga sumber karbon yang berbeza iaitu sukrosa, glukosa dan fruktosa telah digunakan untuk mengkaji kesan ketiga-tiga sumber karbon terhadap regenerasi *C. asiatica* menggunakan daun. Penghasilan *C. asiatica* adalah berbeza bagi setiap jenis sumber karbon yang digunakan. Sumber karbon adalah perlu dalam penghasilan *C. asiatica* yang optimum di mana sumber karbon ini memberikan tenaga kepada eksplan untuk membesar dan membentuk tumbuhan yang baru di samping dapat membantu pertumbuhan yang lebih cekap. Ia memberikan kesan yang berbeza regenerasi *C. asiatica*.



BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Centella asiatica*

Centella asiatica juga dikenali dengan nama saintifik yang lain, iaitu *Hydrocotyle asiatica*. Negara asal bagi tumbuhan ini tidak diketahui tetapi ia dipercayai berasal dari negara India atau negara-negara Asia Tengggara (Ismail Saidin, 2000). Ia juga terdapat di negara-negara lain dengan pelbagai nama seperti gotu kolu, *Indian pennywort*, *Mandukaparni*, pegaga, daun kaki kuda, *Di Chien Tsao*, *Man Tien Hsing* dan *Zhi Xue Cao*. *Centella asiatica* adalah tumbuhan dari famili Umbelliferae atau lebih dikenali sebagai famili Apiaceae. Tumbuhan ini hidup merata di kawasan yang lembap dan kawasan berpaya secara menjalar dengan stolon yang panjang. Ia merupakan tanaman menutup bumi yang dapat menghalang hakisan tanah berlaku (Goh *et al.*, 1995).



2.1.1 Ciri-ciri tumbuhan *Centella asiatica*.

Centella asiatica tumbuh menjalar di kawasan tanah lembap dan berpaya. (Daunnya yang berwarna hijau tua berbentuk hampir obikular dengan gerigi-gerigi di tepi daun (Ismail Saidin, 2000). Setiap daun ini tumbuh dari rizom yang terdapat pada setiap internod dengan ukuran 2 hingga 5 cm diameter. Internod adalah bahagian yang menyambungkan stolon-stolon panjang pada tumbuhan ini. Setiap daun dipegang oleh petiol yang berukuran antara 5 hingga 10 cm panjang. Setiap bahagian yang terdapat pada *C. asiatica* boleh digunakan sebagai eksplan dalam tisu kultur. Foto 2.1 menunjukkan sebahagian daripada pokok *C. asiatica* yang terdapat di kawasan tanah lembap.



Foto 2.1 *Centella asiatica*

2.1.2 Kompaun-kompaun yang terdapat di dalam *Centella asiatica*

Kompaun utama yang menjadi tumpuan utama terhadap *C. asiatica* adalah asiatikosida yang berupaya merawat penyakit yang disebabkan oleh leprosy dan tuberculosis (Tiwari *et al.*, 2000). Daun *C. asiatica* kaya dengan karotenoids, vitamin B dan juga Vitamin C. Kompaun-kompaun lain yang terdapat di dalam pegaga ialah asid asiatik, saponins, *centelloside*, asid brahmik, brahminosida asid madecassic, meso-inositol oksiasiatikosida dan saponin (Goh *et al.*, 1995). Selain daripada itu, *C. asiatica* mengandungi kompaunkompaun lain yang lebih banyak daripada tumbuhan herba yang lain.

2.1.3 Kegunaan *Centella asiatica*

Centella asiatica digunakan dalam pelbagai kegunaan oleh masyarakat dahulu dan kini. Ia boleh didapati dengan mudah, sama ada dalam bentuk daun *C. asiatica* yang terdapat di pasaran atau dalam bentuk jus *C. asiatica* yang mula dikomersialkan di pasaran berdasarkan kepada kompaun dan khasiat yang terdapat di dalam *C. asiatica*. Daun *C. asiatica* boleh dimakan begitu sahaja sebagai ulam atau dimakan bersama sambal kelapa dan udang kering sebagai penambah selera. Ia sering diamalkan oleh masyarakat Melayu yang menggemari daun *C. asiatica* atau pegaga ini. Selain daripada itu, daunnya juga boleh dibuat kerabu atau sebagai salah satu isi ramuan nasi ulam (Ismail Saidin, 2000).



Daun *C. asiatica* ini boleh dimakan dengan pelbagai cara mengikut selera dan cita rasa individu. *C. asiatica* kini menjadi tumpuan dan mendapat permintaan yang tinggi bagi tujuan perubatan. Menyedari akan khasiat yang terdapat pada *C. asiatica*, ramai orang yang mula menggemari jus *C. asiatica* yang semakin banyak dikomersialkan.

a. **Perubatan tradisional.**

Centella asiatica digunakan sebagai penguat daya ingatan dan awet muda di India dengan mencampurkan daun *C. asiatica* yang segar ataupun yang kering ke dalam teh atau dijadikan sebagai salad (Duke, 1997). Khasiat yang terkandung di dalam *C. asiatica* dapat diperolehi dari tumbuhan *C. asiatica* dalam pelbagai cara sama ada dimakan mentah ataupun dicampurkan ke dalam makanan atau minuman tertentu. Di Malaysia, air perahan *C. asiatica* dipercayai dapat mengurangkan cirit-birit dan ulser (Ismail Saidin, 2000). Daun *C. asiatica* yang diramas dapat merawat luka dengan meletakkan ia pada tempat yang terluka (Duke, 1997).

Selain daripada itu, ia juga digunakan sebagai tonik dan diuretik bagi mengimbangi cecair di dalam badan. Oleh itu, ia juga sesuai digunakan untuk mengurangkan tekanan darah tinggi dan kencing manis. Dalam perubatan tradisional di India pula, *C. asiatica* amat terkenal dengan tonik yang berkesan ke atas saraf dan



digunakan dalam merawat beberapa jenis penyakit seperti asma, dopsi, bronkitis, leucorrhoea, gastrik, masalah buah pinggang, penyakit kulit dan urethritis (Kakkar, 1988).

c. Perubatan moden

Beberapa penemuan terbaru ke atas kompaun yang terkandung di dalam *C. asiatica* terhadap beberapa penyakit telah dikenalpasti. Tumbuhan *C. asiatica* kini diekstrak bagi merawat beberapa jenis penyakit yang telah dikenalpasti ini. Salah satu dari penemuan yang dibuat ialah penggunaan *C. asiatica* bagi tujuan rawatan penyakit-penyakit kulit seperti merawat ekzema, kesan luka dan terbakar pada kulit. Penggunaan *C. asiatica* dengan makanan yang mengandungi kandungan vitamin C yang tinggi dapat merangsang pembentukan kolagen yang memperbaiki tisu kulit yang telah rosak hasil daripada tindakbalas yang berlaku di antara vitamin C dan tiga kompaun di dalam *C. asiatica* iaitu asid asiatik, asiatikosida dan asid medecassic (Duke, 1997). Selain daripada itu, ia juga digunakan sebagai bahan anti-kanser, anti-bakteria, anti-kulat dan anti-alergik. Ekstrak *C. asiatica* juga dicampurkan ke dalam beberapa produk kosmetik seperti krim kecantikan bagi meningkatkan penghasilan kolagen dan melembutkan kulit (Li, 2000).



2.2 Regenerasi Tumbuhan

Regenerasi adalah kebolehan yang ada pada suatu organisma untuk menumbuhkan semula bahagian yang telah musnah atau bahagian yang tiada daripada awal (Bajaj, 1991). Ia juga dipanggil sebagai totipotensi. Regenerasi tumbuhan secara *in vitro* adalah suatu proses yang dilakukan di dalam makmal bagi menghasilkan satu pokok atau organ yang baru daripada bahagian-bahagian tertentu pada pokok seperti daun, petiol, embrio dan batang. Regenerasi secara *in vitro* berlaku dengan dua cara iaitu secara organogenesis dan embriogenesis. Regenerasi secara *in vitro* ini dapat menghasilkan tumbuhan yang baru dalam tempoh yang singkat dalam jumlah yang banyak. Oleh itu, ia merupakan teknik yang sesuai diaplikasikan bagi meningkatkan jumlah penghasilan tumbuhan seperti *C. asiatica* yang merupakan salah satu tanaman yang mula mendapat permintaan yang tinggi di pasaran pada masa kini.

2.2.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi regenerasi.

Terdapat pelbagai faktor yang mempengaruhi regenerasi sesuatu spesis tumbuhan. Faktor-faktor ini merangkumi faktor dalaman dan faktor luaran. Faktor dalaman yang terlibat adalah berpunca daripada eksplan yang dikultur manakala faktor luaran yang mempengaruhi regenerasi adalah bergantung kepada persekitaran atau keadaan di mana



regenerasi itu dilakukan. Kecekapan regenerasi sesuatu tumbuhan amat bergantung kepada faktor-faktor ini. Pertumbuhan eksplan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pemilihan eksplan dan media yang sesuai, penggunaan hormon yang sesuai dan suhu yang optimum untuk pertumbuhan eksplan yang lebih cekap.

a. Hormon

Hormon ialah merupakan bahan kimia yang dihasilkan oleh sel di dalam amau yang sedikit (Payne *et al.*, 1992). Dalam teknik pengkulturan, hormon dibekalkan bersama nutrien-nutrien lain di dalam media kultur dengan kepekatan tertentu bergantung kepada objektif dan spesis eksplan yang digunakan. Ia digunakan untuk merangsang pertumbuhan eksplan sama ada dalam pembentukan pucuk maupun akar pada eksplan. Terdapat 4 kelas utama hormon yang digunakan di dalam tisu kultur iaitu auksin, sitokinin, gibberellin dan asid absisik.

Terdapat dua jenis auksin yang digunakan dalam tisu kultur iaitu auksin asli dan auksin tiruan. Auksin asli yang sering digunakan ialah *indole acetic acid* (IAA), *phenylacetic acid* dan *indoleacetonitrile*. Manakala auksin tiruan yang sering digunakan ialah *naphtaleneacetic acid* (NAA), *indole butyric acid* (IBA) dan *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D). Penggunaan auksin di dalam media akan



RUJUKAN

- Altman, A., 1998. *Agricultural Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.
- Bajaj, Y.P.S., 1986. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 1 Trees I*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Bajaj, Y.P.S., 1991. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 17 High-Tech and Micropagation I*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Bajaj, Y.P.S., 1992. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 19 High-Tech and Micropagation III*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Baker, B.S. dan Bhatia, S.K., 1993. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35, 273-277.
- Bhojwani, S.S. dan Razdan, M.K., 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B.V., Netherlands.
- Bonga, J.M. dan Aderkas, P.V., 1992. *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.

Campbell, M.K. dan Farrell, S.O., 2003. *Biochemistry*. Thomson Learning, United State of America.

Chen, Y., Lin, S., Duguid, S., Dribnenki, P. dan Kenaschuk, 2003. Effect of sucrose concentration on elongation of shoots from flax anther culture. . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72, 181-183.

Cooper, E.L., 1997. *Agriscience Fundamentals and Applications*. Ed. ke-2. Delmar Publishers, United State of America.

Dodds, J.D. dan Roberts, L.W., 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Ed. Ke-3. Cambridge University Press.

Duke, J.A., 2003. *The Green Pharmacy Herbal Remedies for Common Diseases and Conditions from the World's Foremost Authority on Healing Herbs*. Rodale Ltd., United Kingdom.

Gamborg, O.L. dan Philips, G.L., 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Goh, S.H., Chuah, C.H., Mok, J.S.L. dan Soepadmo, E., 1995. *Malaysia Medicinal Plants for The Treatment of Cardiovascular Disease*. Pelanduk Publications Sdn. Bhd., Selangor.

Gollagunta, V., Adelberg, J.W., Rieck, J. dan Rajapakse, N., 2005. Sucrose in storage media and cultivar affects post-storage regrowth of *in vitro* Hosta propagules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80, 191-199.

Hdider, C. dan Desjardins, Y., 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36, 27-33.

Herren, R.V., 1997. *The Science of Agriculture A Biological Approach*. Delmar Publishers, United State of America.

Ibraki, Y., Matsushima, R. dan Kurata, K., 2000. Analysis of morphological changes in carrot somatic embryogenesis by serial observation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61, 9-14.

Ismail Saidin, 2000. *Sayuran Tradisional Ulam dan Penyedap Rasa*. Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.

Kakkar, K.K., 1988. Mandukaparni-medicinal uses and therapeutic efficacy. *Journal of Indian Drugs* 26, 92-97.

Kumar, U., 2003. *Methods in Plant Tissue Culture*. Agrobios. India.

- Kumar, H.G.A. dan Murthy, H.N., 2004. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78, 201-208.
- Li, T.S.C., 2000. *Medicinal Plants Culture, Utilization and Phytopharmacology*. CRC Press LLC.
- Marino,G., Bertazza, G., Magnanini, E. dan Altan, A.D., 1993. Comparative effects of sorbitol and sucroses as main carbon energy sources in micropropagation of apricot, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34, 235-244.
- Morini, S., Sciutti, R. dan Fortuna, P., 1992. *In vitro* growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28, 245-248.
- Mukherjee, S.K., Rathinasabapathi, B. dan Gupta, N., 1991. Low sugar and osmotic requirement for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25, 13-16.
- Murashige, T. dan Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- Narayanaswamy, S., 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. Tata Mc Graw-Hill, Madras.



Paramageetham, C., Prasad Babu, G. dan Rao, J.V.S., 2004. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. important medicinal and neutraceutical plant of India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79, 19-24.

Parker, R., 2000. *Introduction to Plant Science*. Delmar Publishers, New York.

Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C.L. dan Shuler M.L., 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*. John Wiley and Sons. Canada.

Raghavendra, A.S., 1998. *Photosynthesis A Comprehensive Treatise*. Cambridge University Press, United Kingdom.

Rutherford, M., 1975. *A Pattern of Herbs: herbs for goodness, food, health and how to identify and grow them*. George Allen and Unwin Ltd., London.

Sahrawat, A.K. dan Chand, S., 2001. Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant. *Current Science* 81(10),1328-1331.

Salisbury, F.B. dan Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Ed. Ke-4. Wadsworth Publishing Company, California.



Sangwan, R.S. dan Sangwan-Norreel, B.S., 1990. *The Impact of Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Ślesak, H., Skoczowski, A. dan Pryzwara, L., 2004. Exogenous carbohydrate utilization by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79, 45-51.

Thériou, K.D. dan Bosabalidis, A.M., 1997. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47, 127-134.

Thorpe, T.A. dan Vasil, I.K., 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Tiwari, K.N., Sharma, N.C., Tiwari, V. dan Singh, B.D., 2000. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63, 179-185.

Trembly, L. dan Trembly, F.M., 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27, 95-103.

Trigiano, R.N. dan Gray, D.J., 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press LLC, United State of America.

Vij, S.P. dan Pathak, P., 1990. Micropropagation of orchids through leaf segments. *Journal Orchid Soc., India* 4 (1, 2): 69-88.