

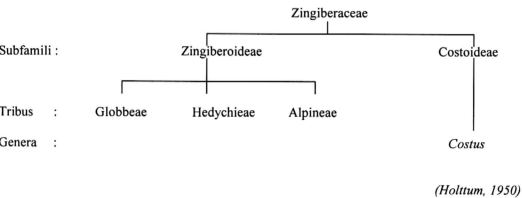
# **BAB 1**

## **PENGENALAN**

**BAB 1            PENGENALAN**

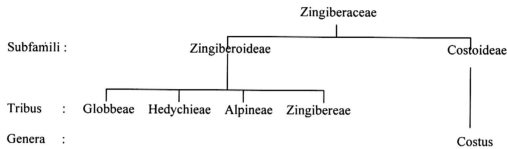
**1.1    PENGENALAN AM FAMILI ZINGIBERACEAE**

Zingiberaceae adalah merupakan salah satu famili di bawah order Zingiberales yang diletakkan di dalam kumpulan monokotiledon (Larsen *et al.*,1999). Holtum (1950) mengklasifikasikan famili Zingiberaceae kepada dua subfamili iaitu Costoideae dan Zingiberoideae. Terdapat tiga tribus di dalam subfamili Zingiberoideae iaitu seperti berikut :



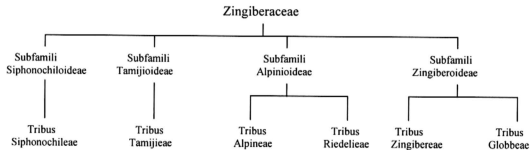
Tomlinson (1961) pula melaporkan bahawa subfamili Costoideae diletakkan sebagai satu famili berasingan daripada Zingiberaceae iaitu famili Costaceae. Namun begitu, Burt dan Smith (1972) meletakkan semula Costoideae sebagai satu subfamili di bawah famili Zingiberaceae. Genus *Zingiber* pula diletakkan di dalam tribus Zingibereae, berbeza daripada laporan sebelum ini (Holtum, 1950) yang meletakkan *Zingiber* di dalam tribus Hedychieae. Burt dan Smith (1972) turut melaporkan bahawa terdapat empat tribus di bawah subfamili Zingiberoideae iaitu Globbeae, Hedychieae, Alpineae dan Zingibereae. Mengikut Larsen *et al.* (1999),

subfamily Costoideae ini berasal daripada famili Costaceae tetapi diklasifikasikan di dalam famili Zingiberaceae kerana adanya hubungan rapat di antara kedua-dua famili tersebut.



(Burt dan Smith, 1972)

Daripada analisa filogenetik oleh Kress *et al.* (2002) yang berdasarkan jujukan DNA pula iaitu dengan menggunakan ‘nuclear internal transcribed spacer’ (ITS) dan kawasan plastid *matK*, mereka memperoleh klasifikasi terkini untuk famili Zingiberaceae iaitu seperti berikut :



(Kress *et al.*, 2002)

Daripada keputusan filogenetik tersebut, terdapat empat subfamili dan enam tribus dilaporkan dan terdapat penyusunan semula genus-genus di dalam tribus Hedychieae (Burt dan Smith, 1972) yang kini diletakkan di dalam tribus Zingibereae.

Secara amnya, mengikut Larsen *et al.* (1999) famili Zingiberaceae di Semenanjung Malaysia dan Singapura diklasifikasikan kepada beberapa genera yang berlainan di mana setiap satunya mengandungi beberapa atau banyak spesies di dalamnya dan genera-genera tersebut mempunyai pertalian dan diasingkan di bawah empat tribus. Sebagai contohnya, genus *Zingiber* diletakkan di dalam tribus Zingibereae, genus *Globba* diletakkan di dalam tribus Globbeae, genus *Curcuma*, *Hedychium*, *Camptandra*, *Haniffa*, *Kaempferia*, *Boesenbergia* dan *Scaphochlamys* diletakkan di dalam tribus Hedychieae dan genus *Alpinia*, *Etilingera*, *Amomum*, *Elettaria*, *Elettariopsis*, *Elettariopsis triloba*, *Plagiostachys*, *Geostachys* dan *Geocharis* diletakkan di dalam tribus Alpinieae. Di Semenanjung Malaysia, direkodkan bahawa tribus Alpinieae mempunyai diversiti yang paling tinggi iaitu 9 genera dan 84 spesies. Diikuti oleh Hedychieae (7 genera, 52 spesies). Dua tribus, Globbeae dan Zingibereae hanya mempunyai 1 genus dan merupakan diversiti yang paling sedikit iaitu 15 spesies dan 19 spesies masing-masing. Daripada 20 genera yang didokumentasikan di Semenanjung Malaysia, hanya genus *Haniffa* adalah genus endemik. Walaupun Semenanjung Malaysia mempunyai diversiti yang luas, namun hanya 10% sahaja yang dikenali oleh masyarakat tempatan sebagai spesies yang ditanam secara meluas untuk pelbagai kegunaan (Larsen, *et al.* 1999).

Zingiberaceae adalah famili yang penting dari segi biodiversiti, produk ekonominya dan juga pertanian. Produk-produk penting daripada famili ini ialah seperti kunyit (*Curcuma domestica*), buah pelaga (*Elettaria cardamomum*), halia (*Zingiber officinale*), temu kuning (*Curcuma zedoaria*), lengkuas (*Alpinia galanga*),



cekur (*Kaempferia galanga*) dan kantan (*Etlingera elatior*). Genus-genus lain yang juga penting dalam famili Zingiberaceae ini adalah *Amomum*, *Elettariopsis*, *Elettaria* dan *Hedychium*. Sekurang-kurangnya 20 atau lebih spesies-spesies famili halia telah ditanam di Semenanjung Malaysia dan Singapura untuk digunakan sebagai perasa, rempah, pewarna, ulam, ubat-ubatan dan hiasan (Larsen *et al.*, 1999).

Bahagian rizom daripada famili Zingiberaceae selalunya berada di paras atau sedikit di bawah permukaan tanah. Rizom biasanya berbentuk simpodial, di mana tiap-tiap hujung cabang rizom mempunyai tunas pucuk yang tegak membentuk daun atau bunga atau kedua-duanya (Holtum, 1950). Bahagian rizom yang baru sentiasa terbentuk oleh tunas-tunas baru di bahagian hujung rizom. Bahagian rizom yang terjadi tersebut terdiri daripada siri-siri cabangan yang terpisah antara satu sama lain di mana setiapnya adalah berasal daripada bahagian pangkal satu tunas pucuk permulaan yang sama. Bahagian-bahagian cabangan rizom yang terjadi ini dipanggil elemen rizom (Holtum, 1950). Fungsi rizom pada kebanyakan spesies adalah sebagai organ rehat, dorman di bawah tanah ketika musim yang tidak sesuai untuk percambahan di mana ketika selepas daun-daunnya sudah layu. Di Malaysia, walaubagaimanapun tiada musim yang tidak sesuai untuk rizom bercambah. Percambahan ataupun pertumbuhan tetap berlaku pada bila-bila masa di sepanjang tahun kecuali ketika musim hujan (Holtum, 1950), atau kemarau yang berpanjangan.

Genus yang dipilih dalam kajian ini ialah genus *Zingiber* dan *Kaempferia galanga* sebagai satu spesies 'outgroup'. *Zingiber* adalah satu genus yang besar dan

kompleks di mana terdapat kira-kira 100 spesies (Theilade, 1996) yang tersebar di seluruh kawasan tropika, Asia Tenggara dan Malaysia dan ada juga yang tersebar di Queensland dan Jepun (Holtum, 1950). Tumbuh-tumbuhan dalam genus ini adalah jenis herba sepanjang musim dan tumbuh terutamanya di kawasan lembap tetapi juga kerap kali dijumpai di kawasan hutan sekunder dan kawasan yang telah diganggu seperti penempatan manusia. Spesies-spesies di dalam genus *Zingiber* ini mempunyai saiz yang sederhana besar, merayap dan mempunyai rizom yang bercabang. Bahagian bunganya keluar berasingan iaitu secara langsung daripada bahagian rizom, bahagian pedunkelnya (tangkai bunga) adalah panjang dan ada yang pendek. Spesies *Z. officinale* yang lebih dikenali sebagai halia di Malaysia, mempunyai dua ras (race) yang tumbuh di Semenanjung Malaysia iaitu halia bara dan halia padi. Halia bara dan halia padi berbeza dengan halia biasa dari segi saiz rizomnya yang lebih kecil dan berwarna merah dan juga mempunyai bau yang lebih kuat. Spesies-spesies halia tersebut adalah sangat jarang berbunga di Malaysia (Larsen *et. al.*, 1999).

Genus *Kaempferia* pula mempunyai rizom yang berisi, kebiasaannya elemen rizomnya adalah pendek di mana setiapnya membawa satu hingga beberapa daun dengan bunga di bahagian terminal atau di dalam beberapa kes daun dan bunga tumbuh pada pucuk yang berlainan dan tidak serentak. Genus *Kaempferia* menyesuaikan kehidupannya di kawasan yang terbuka dan tersebar melalui kawasan Afrika (Holtum, 1950). Hanya dua spesies di dalam genus ini yang asli di Malaysia manakala yang lain adalah dibawa masuk. Spesies *K. galanga* diperkenalkan dari

negara India dan masih digunakan di dalam perubatan tradisional (Larsen, 1999). Di Malaysia ia dikenali sebagai cekur dan ditanam sebagai tanaman kampung untuk digunakan sebagai perasa makanan, perubatan dan juga untuk dijual di pasaran domestik (Holttum, 1950). Spesies-spesies lain di dalam genus ini yang terdapat di Semenanjung Malaysia adalah *K. rotunda*, *K. pulchra* dan *K. elegans*.

## 1.2 HURAIAN RINGKAS SPESIES-SPESIES KAJIAN

Sebanyak lima spesies dan dua varieti dipilih untuk kajian ini iaitu *Zingiber officinale* var. *officinale* (halia), *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara), *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi), *Z. zerumbet*, *Z. ottensii*, *Z. montanum* dan *Kaempferia galanga*. Kesemua spesies kajian merupakan spesies yang telah dikenalpasti mempunyai kepentingan ekonomi samada sebagai makanan, minuman, perasa masakan, jamu, tonik dan juga sebagai tumbuh-tumbuhan ubatan.

### 1.2.1 *Z. officinale* var. *officinale* Rosc.

(Sinonim : *Amomum zingiber* Linn., *Curcuma longifolia* WALL.)

**Nama tempatan :** Halia, halia biasa, halia betul

**Morfologi am :**

Bahagian rizomnya adalah agak besar dan keras serta isinya berwarna kuning pucat. Tinggi pokok ini adalah di antara 0.5-1.0 m. Daun-daunnya adalah jenis linear iaitu mempunyai panjang 15-23 sm dan lebar 1.5-1.8 sm. Panjang petiol adalah lebih kurang 2 mm (Theilade, 1996). Panjang jambak

bunga adalah 4.5 sm dan berdiameter 1.5 sm. Mempunyai braktea yang berwarna hijau dan sedikit pucat di bahagian tengah serta lutcahaya di bahagian tepi. Kaliks bersama ovari mempunyai panjang 12 mm, tiub korola pula 2.5 sm dan lip mempunyai bentuk hampir bulat, lebar, berwarna ungu pudar dan berbintik krim.

**Asal dan taburan :**

Pada satu ketika dahulu ianya banyak ditanam di kawasan tropika Asia dan pada masa sekarang ianya didapati ditanam di seluruh kawasan tropika. (Theilade,1996). Negara asalnya masih belum diketahui tetapi mengikut Purseglove (1972) spesies ini berkemungkinan berasal dari India dan tidak menolak kemungkinan ia juga berasal dari negara China.

**Kepentingan :**

Rizom digunakan sebagai perasa dalam masakan dan juga sebagai ubatan tradisional. Bahagian rizomnya yang wangi itu digunakan secara meluasnya di dalam masakan. Ada juga rizom yang muda dimakan mentah sebagai ulam. Ia juga di rebus, dikeringkan dan dijadikan serbuk dan kemudiannya digunakan sebagai bahan perasa di dalam pelbagai jenis kek dan kuih dan juga air minuman. Di dalam perubatan tradisional, bahagian rizom digunakan untuk merawat batuk dan sakit di bahagian dada. Jus daripada rizom digunakan untuk mengubati pening kepala, membuang angin di dalam badan, melegakan kekejangan ketika haid dan juga cirit-birit. Selain daripada itu, bahagian rizom juga digunakan sebagai posyen yang disapu di bahagian perut bagi wanita selepas bersalin dan disapu juga pada bahagian bengkak

dan lebam. Ia juga digunakan untuk sakit-sakit sendi atau sengal-sengal badan dan digunakan ketika mandi untuk mengurangkan demam. Di negara China ia digunakan sebagai penawar untuk racun sengatan ikan dan ketam (Theilade, 1996). Masyarakat Afrika mempercayai bahawa dengan memakan halia setiap hari dapat mengelakkan tubuh badan daripada gigitan nyamuk (Duke dan Ayensu, 1985). Manakala dalam perubatan Arab pula halia digunakan sebagai ubat meningkatkan tenaga batin (Qureshi *et al.*, 1989). Di dalam rawatan Ayurvedic, halia digunakan sebagai anti-radang untuk mengubati lenguh-lenguh sendi dan sakit kepala (Verma *et al.*, 1993). Daripada data *in vitro*, ekstrak halia dapat menghalang pembentukan sebatian-sebatian radang seperti tromboksin, leukotrienes dan prostaglandins (Kiuchi *et al.*, 1982 ; Flynn *et al.*, 1986). Di dalam ujian yang dilakukan terhadap tikus yang mempunyai penyakit radang sendi yang kronik, minyak halia didapati dapat mengurangkan bengkak tersebut (Sharma *et al.*, 1994). Mustafa dan Srivastava (1990) melaporkan seorang wanita yang berusia 42 tahun yang mengidapi penyakit migrain selama 16 tahun didapati sembuh apabila mengamalkan diet bersama-sama dengan 1.5 hingga 2 g halia kering sehari. Srivastava (1989) juga telah melaporkan di dalam kajiannya bahawa seorang dewasa sukarela yang mengamalkan memakan 5 g halia sehari didapati dapat mengurangkan sebanyak 25% kepekatan darah beku di dalam saluran darahnya. Selain daripada itu, halia juga dilaporkan mempunyai kesan antioksidan yang penting (Pearson *et al.*, 1997; Zhou dan Xu, 1992; Sujatha dan Srinivas, 1995; Guo *et al.*, 1997; Jeyakumar *et al.*, 1999).

Terdapat juga kajian yang membuktikan halia boleh menambahkan suhu badan seperti data yang diperolehi oleh Eldershaw *et al.* (1992), di mana mendapati sebatian gingerol yang ada dalam halia dapat meningkatkan suhu badan dan penggunaan oksigen di dalam badan tikus dan ini menunjukkan adanya peningkatan kadar metabolisme tikus. Sebatian kimia yang diasingkan daripada spesies *Zingiber* menunjukkan adanya aktiviti farmakologi yang penting. Antara bahan-bahan kimia yang penting di dalam ekstrak rizom adalah seperti gingerol, shogaol (Suekawa *et al.*, 1984, Shoji *et al.*, 1982, Hikino *et al.*, 1985), gingerdione dan dehydrogingerdiones (Kiuchi, 1982).

### 1.2.2 *Z. officinale* var. *rubrum* Theilade

**Nama tempatan :** Halia bara, halia merah.

**Morfologi am :**

Halia bara mempunyai bentuk keseluruhan yang hampir sama dengan halia biasa. Perbezaan hanya dilihat melalui saiz pokok dan rizomnya yang lebih kecil serta daunnya yang lebih runcing. Bahagian luar rizom adalah berwarna merah dan bahagian dalamnya berwarna kuning dan mempunyai bau yang kuat. Dikenali dengan nama tempatan “Halia bara” (bara yang bermaksud arang batu yang panas), “Halia udang” (bentuk seperti udang), “Halia padi” (kecil) (Valeton, 1918 ; Holttum, 1950). Varieti halia yang berwarna merah ini juga dikenali sebagai “Halia merah” oleh masyarakat Melayu. Kelainan ini tidaklah penting tetapi kesemuanya digunakan dalam

perubatan tradisional seperti “halia padi” (Theilade, 1996). Ridley (1912) menganggap “Halia bara” adalah sinonim dengan “Halia padi”. Tinggi pokok adalah lebih kurang 0.5-1.25 m dan bahagian pangkal batangnya berwarna merah. Panjang bahagian petiol adalah 2.0 mm dan kebanyakannya berwarna merah. Daunnya berbentuk ‘linear’, 25-32 sm panjang dan 1.5-1.8 sm lebar. Spesies ini jarang berbunga (Theilade, 1996).

**Asal dan taburan :**

Spesies ini ditanam di bahagian Asia Tenggara untuk kegunaan perubatan dan perasa masakan. Kerap kali didapati dijual di pasar tani atau pekan sehari melalui penjual ubat herba tradisional atau sayur-sayuran kampung.

**Kepentingan :**

Halia bara dipercayai mempunyai kepentingan yang sama dengan *Z. officinale* var. *officinale* (halia biasa). Dalam perubatan tradisional, masyarakat Melayu menggunakannya untuk membuang angin dalam badan, sebagai posyen untuk mengurut wanita selepas bersalin dan juga jusnya yang digunakan untuk mengurangkan kekejangan ketika haid (Theilade, 1996). Selain itu ia digunakan sebagai ubat batuk, sakit peranakan dan pemanas badan. Ia juga digunakan untuk menghilangkan kesakitan pada gusi selepas menampal gigi. Daunnya pula dimakan untuk menghilangkan sakit perut dan sengal-sengal sendi atau dipupuk untuk sakit kepala. Muda (1996) melaporkan bahawa bahagian rizom halia bara digunakan untuk melicinkan pengaliran darah, merawat sesak nafas dan juga sebagai ubat sakit perut. Vimala *et al.* (1999) melaporkan spesies ini yang dikenali sebagai *Z.*

*officinale* ('red variety') mengandungi bahan aktif yang boleh merencat aktiviti EBV (virus Epstein Barr) yang menyebabkan kanser.

### 1.2.3 *Z. officinale* var. *rubrum* Theilade (halia padi)

**Nama tempatan :** Halia padi

**Morfologi am :**

Halia padi boleh dibezakan dengan rizom yang lebih kecil daripada halia dan halia bara. Namun bahagian rizomnya ada sedikit berwarna merah terutamanya di bahagian pangkal tunas pucuk ataupun di bahagian petiol. Mengikut Burkill (1966), "Halia padi" adalah tergolong di dalam *Zingiber minus* di mana pokoknya adalah lebih kecil berbanding dengan satu golongan lagi iaitu *Zingiber majus* yang pokoknya adalah lebih besar iaitu *Zingiber officinale* var. *officinale*. Valetton (1918) pula mengatakan bahawa "Halia padi" atau "sunti" dari Jawa berbeza daripada halia biasa dari segi rizomnya dan staminod berbentuk ovat dengan bahagian basalnya bulat.

**Asal dan taburan :**

Belum didokumentasikan. Di Malaysia ia banyak terdapat di kawasan selatan Semenanjung Malaysia.

**Kepentingan :**

Dalam perubatan tradisional, masyarakat Melayu menggunakannya untuk membuang angin dalam badan, sebagai posyen untuk mengurut wanita selepas bersalin dan juga jusnya yang digunakan untuk mengurangkan kekejangan ketika haid (Theilade, 1996). Pendapat beberapa orang



responden di pasar Muar, Johor mengatakan bahawa spesies ini mempunyai kesan perubatan yang lebih kuat dan mujarab berbanding dengan halia bara dan halia. Begitu juga kuantiti bahagian rizom yang digunakan untuk perubatan adalah lebih sedikit tetapi mempunyai kesan yang sama dengan halia bara.

#### 1.2.4 *Z. zerumbet* Smith

(Sinonim : *Amomum zerumbet* L., *Zingiber spurium* Koenig, *Z. aromaticum* Valetton, *Z. amaricans* Blume, *Z. oroideum* Noronha, *Z. spectabile* Griffith, *Z. truncatum* STOKES, *Z. blancoi* Hassk., *A. silvestre* Poirer, *A. zingiber* Blanco, *Zerumbet zingiber* Lestib.).

**Nama tempatan** : Lempoyang

##### **Morfologi am :**

Sejenis halia yang sederhana besar dari segi pohonnya. Bahagian dalam rizom berwarna kuning pucat, tidak banyak cabang, besar dan keras, bau kuat dan pahit rasanya. Mempunyai ketinggian antara 1 hingga 2 m termasuk bahagian daun. Daunnya nipis dan berbulu di bahagian bawah. Saiz daunnya agak besar dan mempunyai pelepah yang melekat ke batang. Bahagian tunas pucuk biasanya berwarna hijau ketika muda dan bertukar ungu apabila tua. Panjang daun 25-35 sm dan lebarnya 5-8 sm, bahagian apeks berbentuk akuminat (Holtum, 1950; Theilade, 1996). Jambak bunga mempunyai panjang 6 hingga 12 sm dan lebar 4.5 sm. Berbentuk ovoid ke elipsoid, meruncing ke bahagian apeks, berwarna hijau ketika muda dan merah ketika tua.

**Asal dan taburan :**

Spesies ini dikatakan berkemungkinan berasal dari India. Kebanyakan ditanam di India, China dan seluruh Asia Tenggara. Di Malaysia ia banyak ditanam di Kedah, Perak, Selangor dan Johor. Kebiasaannya ditanam atau tumbuh semulajadi di kawasan sempadan antara hutan atau tanah pamah yang lazimnya berhampiran kampung (Theilade, 1996).

**Kepentingan :**

Digunakan sebagai ubat lelah, batuk, cacing, kusta dan penyakit kulit. Di Madagascar, rizom yang dimasak digunakan untuk mengubati jangkitan paru-paru (Kirtikar dan Basu, 1975). Rizomnya juga menjadi campuran dalam rumusan tonik dan ubat jamu. Bahagian rizom biasanya direbus dan diminum untuk memanaskan badan dan membuang angin. Pucuk muda digunakan sebagai campuran bagi mengeluarkan aroma atau perasa makanan. Jus daripada bahagian rizom juga digunakan oleh ibu-ibu selepas bersalin untuk memperbanyakkan susu badan (Muda, 1996). Akira *et al.* (2002) dan Vimala *et al.* (1999) melaporkan bahan aktif zerumbone yang terdapat dalam spesies ini dapat menghalang agen penggalak tumor iaitu 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) yang dirangsang oleh aktiviti virus Epstein-Barr. Beliau juga melaporkan zerumbone juga bersifat anti-radang dan mempunyai potensi penghalang tindakbalas kimia di dalam eksperimen kultur sel.

### 1.2.5 *Z. ottensii* Valetton

**Nama tempatan :** Lempoyang hitam, bonglai hitam

**Morfologi am :**

Rizomnya keras, bahagian dalam rizom apabila dipotong berwarna ungu dan berbau sedikit busuk. Bahagian batangnya berwarna ungu kemerahan dan tumbuh rapat antara satu sama lain dan mempunyai ketinggian sehingga 1.5 m dan mempunyai banyak daun yang lazimnya lebih besar saiznya berbanding dengan *Z. zerumbet*. Panjang daun biasanya antara 35 hingga 40 sm dan lebarnya antara 6 hingga 8 sm dan berambut di bahagian bawah. Bahagian hujung daun berbentuk akuminat dan pangkal daun berbentuk kuneat ke bulat. Panjang petiol kurang 5 mm dan berbulu halus (Holttum, 1950). Panjang jambak bunga ialah 10 sm dan lebarnya ialah 4.5 sm. Berbentuk elipsoid dan apeks yang lebih lebar. Panjang braktea ialah 4 sm., berwarna merah pucat ketika muda dan kemudian bertukar warna ke merah terang ketika tua. Labelum berwarna seakan kuning dan berbintik merah jambu. Panjangnya 2.5 sm dan lebar 1.5 sm.

**Asal dan taburan :**

Taburan spesies ini didapati di Thailand, Malaysia, Jawa dan Sumatra. Di Malaysia kebanyakan dijumpai di Pulau Pinang, Kedah, Selangor dan Terengganu (Theilade, 1996).

**Kepentingan :**

Bahagian rizom digunakan di dalam perubatan tradisional masyarakat kampung. Kebanyakannya digunakan sebagai ubat selepas bersalin di mana bahagian rizom dihancurkan dan digunakan sebagai tuam (Theilade, 1996).

**1.2.6 *Z. montanum* (Koenig) Theilade**

(Sinonim : *Amomum montanum* Koenig, *Z. purpureum* Rosc., *Z. cassumunar* Roxb.).

**Nama tempatan :** Bonglai, bolai

**Morfologi am :**

Bahagian dalam rizom berwarna oren kekuningan dan beraroma yang kuat. Mempunyai rasa seperti rempah ratus, panas dan pahit. Tinggi pokok antara 1.2-1.8 m. Daun linear, panjang 23-35 sm dan lebar 2.0-3.2 sm. Daunnya mempunyai pelepah panjang seperti halia, tumbuh terus dari rizom yang agak besar. Panjang jambak bunga ialah 10 hingga 16 sm dan lebar 3 hingga 4.5 sm. Berbentuk ovat bulat dan tajam (acute) di hujung. Braktea berwarna hijau coklat dan berwarna pucat di bahagian tepi, berambut pada bahagian yang terdedah. Labelum berwarna kuning pucat, 2 hingga 3 sm panjang dan 1.8 hingga 2.5 sm lebar.

**Asal dan taburan :**

Spesies ini dipercayai berasal dari India. Dalam bahasa Sanskrit ia dipanggil “vanaardraka”, bahasa hindi “banada” dan di Kannada dipanggil “kadu shunti”. Nama-nama tersebut menunjukkan bahawa ia adalah “wild ginger”.

Dijumpai meluasnya di Asia Tenggara sebagai tumbuhan kampung (Theilade, 1996). Mengikut Holttum (1950), spesies ini tidaklah terdapat banyak di Malaysia. Di Malaysia banyak ditanam di Pahang dan Perak (Theilade, 1996). Tumbuhan ini mudah tumbuh di tanah gembur berpasir.

**Kepentingan :**

Digunakan secara meluasnya di negara tropika Asia sebagai tanaman ubatan. Rizom dijadikan ubat untuk merawat sakit perut dan cirit birit. Di Malaysia, rizom yang ditumbuk halus disapu ke bahagian badan untuk mengurangkan demam panas dan juga dipercayai dapat memulihkan seseorang yang dirasuk hantu (Theilade, 1996). Rizom bonglai ini lazimnya digunakan bersama jerangau, lengkuas, cekur ataupun temu. Rizomnya juga digunakan sebagai ramuan ubat sembelit dan ubat selepas bersalin. Spesies ini juga dikatakan mempunyai sifat anti tumor di mana Murakami *et al.* (1994) mendapati bahan aktif di dalam rizom bonglai iaitu curcumin dikenalpasti sebagai bahan aktif yang kuat di dalam ujian antitumor terhadap EBV (Epstein-Barr Virus) melalui ekstrak metanolnya. Malah curcumin juga didapati mempunyai potensi sebagai antitumor yang kuat selain daripada promoter-promoter lain seperti  $\beta$ -carotene atau quercetin. Nishino *et al.* (1987) dan Huang *et al.* (1988) masing-masing melaporkan adanya aktiviti anti-tumor oleh sebatian curcumin ke atas kulit tikus. Di Thailand, bonglai digunakan sebagai minyak angin untuk sakit perut, dan dilaporkan juga mempunyai kesan anti-radang (Ponglux *et al.*, 1987).

### 1.2.7 *Kaempferia galanga* Linn.

**Nama tempatan :** Cekur

**Morfologi am :**

Mempunyai daun yang lebar dengan urat daun yang selari, melebar secara horizontal di atas tanah. Bilangan daun yang sedikit iaitu antara dua hingga tiga helai. Panjang dan lebar daun lebih kurang 15 dan 10 sm. Petiol dan kelopak daun panjangnya lebih kurang 3 sm (Theilade, 1996). Bahagian rizom berisi, putih dan aromatik. Akar berisi dan berfiber, berbentuk selinder dan tidak aromatik (Kirtikar dan Basu, 1975). Panjang braktea lebih kurang 4 sm, lebar 1 sm (bahagian paling luar) dan mengecil di bahagian tengah iaitu 2.5 sm, berwarna hijau, pendek dan berbentuk lanseolat.. Terdapat dua brakteol untuk setiap bunga, sempit, menghadap braktea dan mempunyai panjang lebih kurang 3.5 sm.

**Asal dan taburan :**

Spesies ini dikatakan berasal dari India (Larsen *et al.*, 1999). Ditanam menyeluruh di seluruh kawasan Asia Tenggara untuk digunakan sebagai perasa makanan dan perubatan (Theilade, 1996). Di Malaysia spesies ini ditanam oleh penduduk tempatan di kampung-kampung.

**Kepentingan :**

Mencegah keguguran dengan menyapu perahan air cekur yang dicampur dengan daun dedap dan minyak gandapura ('Methyl Salicylate') di perut. Ia juga digunakan untuk wanita lepas bersalin dengan meminum air rebusan cekur. Manakala daun pula digiling dan dijadikan demahan pada bahagian

badan yang bengkak. Kegunaan cekur yang lain ialah untuk merawat batuk, sakit dada, cirit-birit, malaria, dan selsema (Kirtikar dan Basu, 1975 ; Arambewela, 1999). Rizom cekur juga digunakan dalam sistem perubatan ayurvedic untuk rawatan pelbagai penyakit radang, diabetes mellitus dan obesiti (Achutan *et al.*, 1997).

### **1.3 KEPENTINGAN KOMERSIL HALIA BIASA (*Z. officinale* var. *officinale*).**

Negara India merupakan negara pengeluar dan mengeksport halia yang terbesar dan merupakan penyumbang sebanyak 50% daripada pengeluaran dunia. Negara pengeluar utama yang lain adalah China, Nigeria, Taiwan, Jamaica, Thailand dan Australia. Negara pengimport terbesar ialah United Kingdom, Amerika Syarikat dan Arab Saudi. Mengikut FAO sehingga tahun 2001 (Jadual 1.1), perkembangan pesat bagi pengeluaran halia dapat dilihat dengan perkembangan kawasan penanaman semenjak tahun 1999 dan dijangkakan akan terus berkembang sehingga tahun 2002. Keluasan kawasan penanaman halia di seluruh dunia adalah 310,100, 319,751 dan 321,732 hektar untuk tahun 1999, 2000 dan 2001 masing-masing. Pengeluaran halia keseluruhannya juga didapati meningkat di seluruh dunia. Pengeluaran adalah sebanyak 835,173 tan dalam tahun 2001 berbanding 812,732 tan dalam tahun 2000 dan 775,717 tan dalam tahun 1999. Nigeria adalah pengeluar halia terbesar iaitu dalam tahun 1999, terdapat 166,800 hektar kawasan halia seluruh negara dan kawasannya bertambah kepada 174,000 hektar dalam tahun 2000 dan

2001. Ini adalah kerana permintaan yang tinggi daripada pasaran tempatan dan luar negara. India juga merupakan pengeluar halia yang penting. Kawasan penanaman seluruh India kekal 80,000 hektar dari tahun 1999 hingga 2001. Kawasan pengeluaran halia di China juga berkembang setiap tahun iaitu 20,700 hektar pada tahun 2001 berbanding 17,750 dan 19,170 hektar pada tahun 1999 dan 2000 masing-masing.

Walaupun statistik menunjukkan bahawa kawasan penanaman adalah terbesar di negara Nigeria, tetapi pengeluaran tertinggi didapati dari negara India. Jumlah penghasilan halia Nigeria pada tahun 2001 adalah 90,000 juta tan, tidak berubah dari tahun 1999. Manakala, keseluruhan penghasilan halia di India bertambah daripada 270,000 juta tan pada tahun 1999 dan 2000 kepada 275,000 juta tan pada tahun 2001, dan dijangkakan meningkat pada tahun berikutnya. Walaubagaimanapun kawasan penanaman halia di China tidaklah sebesar seperti di Nigeria, tetapi penghasilannya adalah tinggi. Jumlah halia yang dihasilkan dari China adalah didapati meningkat secara perlahan setiap tahun. Jumlah penghasilan halia di China adalah 201,128 juta tan pada tahun 1999, 228,056 juta tan pada tahun 2000 dan meningkat kepada 240,000 juta tan pada tahun 2001. Manakala di Malaysia pula, keluasan tanaman halia hanyalah 1,000 hektar sahaja dan tidak berubah sepanjang tahun 1999 hingga 2001. Begitu juga penghasilan halia dilihat tidak berkembang iaitu hanya sebanyak 2,500 juta tan pada tahun 1999 hingga 2001 iaitu kurang daripada 1% pengeluaran dunia. Mengikut Jabatan Kastam Thailand, Malaysia mengimport halia dari negara tersebut sebanyak 177,790 kg pada tahun



2000 dan terus meningkat kepada 227,700 kg pada tahun 2001 dan 270,800 kg pada tahun 2002. Namun begitu, kepentingan yang dinyatakan di atas merupakan kepentingan ekonomi bagi spesies halia biasa yang banyak digunakan di seluruh dunia.

Jadual 1.1 Keluasan tanaman halia (*Z. officinale* var. *officinale*) dan pengeluaran halia seluruh dunia. [Sumber : FAO database (Food and Agriculture Organization of the United Nation)](<http://www.foodmarketexchange.com>).

| Luas Kawasan Tanaman<br>(hektar) | Tahun   |         |         |
|----------------------------------|---------|---------|---------|
|                                  | 1999    | 2000    | 2001    |
| China                            | 17,750  | 19,170  | 20,700  |
| Dunia                            | 310,100 | 319,751 | 321,732 |
| Bangladesh                       | 6,879   | 6,879   | 7,290   |
| Bhutan                           | 350     | 350     | 350     |
| Cameroon                         | 1,370   | 1,370   | 1,370   |
| Costa Rica                       | 110     | 361     | 361     |
| Dominica                         | 45      | 45      | 45      |
| Republik Dominican               | 400     | 400     | 400     |
| Ethiopia                         | 150     | 150     | 150     |
| Kepulauan Fiji                   | 65      | 65      | 65      |
| India                            | 80,000  | 80,000  | 80,000  |
| Indonesia                        | 10,200  | 10,600  | 10,600  |
| Jamaica                          | 180     | 180     | 180     |
| Kenya                            | 65      | 55      | 55      |
| Republik Korea                   | 4,255   | 4,255   | 4,255   |
| Madagascar                       | 8       | 8       | 8       |
| Malaysia                         | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Mauritius                        | 50      | 170     | 170     |
| Nepal                            | 1,400   | 1,400   | 1,400   |
| Nigeria                          | 166,800 | 174,000 | 174,000 |
| Pakistan                         | 78      | 78      | 78      |
| Filipina                         | 4,700   | 5,000   | 5,000   |
| Réunion                          | 30      | 30      | 30      |
| Sri Lanka                        | 2,000   | 2,000   | 2,000   |
| Thailand                         | 12,000  | 12,000  | 12,000  |
| Uganda                           | 50      | 50      | 50      |
| Amerika Syarikat                 | 140     | 110     | 150     |

*Sambungan jadual 1.1*

| Hasil pengeluaran halia (Juta tan) | Tahun   |         |         |
|------------------------------------|---------|---------|---------|
|                                    | 1999    | 2000    | 2001    |
| China                              | 201,128 | 228,056 | 240,000 |
| Dunia                              | 775,717 | 812,372 | 835,173 |
| Bangladesh                         | 38,000  | 38,000  | 42,000  |
| Bhutan                             | 3,100   | 3,100   | 3,100   |
| Cameroon                           | 7,430   | 7,500   | 7,500   |
| Costa Rica                         | 1,225   | 4,375   | 4,400   |
| Dominica                           | 100     | 100     | 100     |
| Republik Dominican                 | 1,500   | 1,500   | 1,500   |
| Ethiopia                           | 450     | 400     | 400     |
| Fiji Islands                       | 2,500   | 2,500   | 2,500   |
| Ghana                              | 60      | 65      | 65      |
| India                              | 270,000 | 275,000 | 275,000 |
| Indonesia                          | 70,100  | 71,900  | 77,500  |
| Jamaica                            | 620     | 620     | 620     |
| Kenya                              | 200     | 150     | 150     |
| Republik Korea                     | 7,950   | 7,950   | 7,950   |
| Madagascar                         | 30      | 30      | 30      |
| Malaysia                           | 2,500   | 2,500   | 2,500   |
| Mauritius                          | 116     | 498     | 500     |
| Nepal                              | 4,200   | 4,200   | 4,200   |
| Nigeria                            | 90,000  | 90,000  | 90,000  |
| Pakistan                           | 28      | 28      | 28      |
| Filipina                           | 28,000  | 29,000  | 29,000  |
| Réunion                            | 900     | 500     | 500     |
| Saint Lucia                        | 60      | 60      | 60      |
| Sri Lanka                          | 8,000   | 8,000   | 8,000   |
| Thailand                           | 30,000  | 30,000  | 30,000  |
| Uganda                             | 120     | 120     | 120     |
| Amerika Syarikat                   | 7,300   | 6,120   | 7,350   |
| Zambia                             | 100     | 100     | 100     |

#### 1.4 PENGANALISAAN JALUR DNA MELALUI KAEDAH 'RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA' (RAPD).

Daripada huraian ringkas spesies-spesies kajian dalam bab 1.2, didapati spesies-spesies daripada genus *Zingiber* mempunyai pertalian atau hubungan yang sangat rapat di antara satu sama lain. Ini boleh dilihat pada ketiga-tiga varieti daripada spesies *Z. officinale* iaitu halia, halia bara dan halia padi. Ketiga-tiga varieti tersebut serta *Z. montanum* amat susah untuk dibezakan melalui morfologi pokoknya semasa peringkat muda. Begitu juga dengan spesies-spesies *Z. zerumbet* dan *Z. ottensii* yang sukar dibezakan ketika pokok tersebut pada usia yang muda. Pencirian melalui morfologi ke atas spesies-spesies kajian memungkinkan berlakunya kesilapan dalam penamaan spesies. Dengan itu, satu teknik yang sesuai adalah diperlukan untuk membezakan di antara spesies-spesies kajian iaitu dengan menggunakan kaedah penanda molekul. Kaedah penanda molekul menjadi satu kaedah yang amat meluas digunakan oleh penyelidik-penyelidik pada masa kini untuk pelbagai tujuan termasuklah dalam pengcaman spesies dan hubungan genetik antara spesies-spesies tumbuhan. Selain daripada itu, profil DNA yang didapati boleh digunakan sebagai rujukan untuk kajian yang akan dilakukan pada masa depan.

Penanda molekul sebenarnya telah menjadi satu kaedah asas kepada ahli-ahli biologi tumbuhan dan haiwan. Kaedah ini sangat berguna untuk pencapaian varieti-varieti tumbuhan, pengelasan filogenetik, melabel gen-gen yang dikehendaki,

menentukan kesamaan antara baka-baka tumbuhan dan juga untuk pemetaan genom tumbuhan (Yu *et al.*, 1993). Terdapat banyak teknik molekular yang digunakan pada masa sekarang di mana ianya dapat membantu para penyelidik yang berkenaan untuk menentukan senibina varieti genetik yang amat luas di antara individu-individu yang mempunyai hubungan yang rapat. Penanda DNA juga turut digunakan untuk pengklonan gen, pengcaman pelbagai jenis penyakit di dalam bidang perubatan dan juga pembiakan haiwan ternakan dan tumbuh-tumbuhan.

Terdapat beberapa kaedah terkini untuk membandingkan tumbuh-tumbuhan pada tahap molekul, telah dijalankan termasuklah pengcaman melalui isoenzim, 'Restriction fragment length polymorphism' (RFLP) ataupun 'Random-amplified polymorphic DNA' (RAPD) dengan menggunakan 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) (Mulcahy *et. al.*,1993). Kaedah-kaedah molekular terkini yang lain ialah seperti mikrosatelit ataupun 'simple sequence repeats' (SSR), 'Amplified Fragment Length Polymorphisms' (AFLP), 'Single nucleotide polymorphisms' (SNP) dan 'expressed sequence tags' (EST). Kaedah-kaedah yang tersebut di atas masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan tertentu seperti yang dinyatakan di dalam jadual 1.2.

Jadual 1.2. Antara kelebihan dan kekurangan teknik penanda molekul yang digunakan pada masa kini.

| Teknik | Kebaikan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Keburukan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RAPD   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Senang dan cepat serta kos yang rendah</li> <li>• Lebih polimorfik berbanding RFLP</li> <li>• DNA yang kurang kualitinya boleh digunakan</li> <li>• Jalur-jalur DNA yang banyak boleh dihasilkan daripada satu primer</li> <li>• Primer-primer yang telah tersedia boleh didapati</li> </ul>                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pengesanan polimorfisme masih terhad (sama dengan RFLP)</li> <li>• Keputusan yang tidak konsisten</li> <li>• Profil RAPD yang kurang baik dilihat pada gel agaros yang menghasilkan jalur-jalur DNA yang sedikit</li> <li>• Hanya dapat mengesan penanda yang dominan</li> </ul>                                                                              |
| AFLP   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Banyak lokus dapat dihasilkan daripada satu pencerakinan atau ujian</li> <li>• Peringkat penghasilan polimorfisme adalah tinggi</li> <li>• Kit ujian boleh dibeli dan senang digunakan</li> <li>• Keputusan ujian adalah stabil pada setiap masa</li> <li>• Kos adalah sederhana berbanding di antara kos untuk RAPD dan RFLP</li> <li>• Kaedah adalah cepat (lebih kurang 5 hari)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA yang sangat tulen dan mempunyai berat molekul yang tinggi diperlukan</li> <li>• Saiz fragmen yang sama kemungkinan bukan homologus</li> <li>• Alel dominan</li> <li>• Profil jalur DNA tidak boleh menafsirkan lokus dan alel</li> <li>• Penanda molekul adalah diperlukan, walau bagaimanapun penggunaan radio isotop mungkin boleh dielakkan</li> </ul> |
| RFLP   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasilkan penanda yang semi-dominan, membenarkan penentuan</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kaedah yang mengambil masa yang lama sebelum keputusan diperolehi</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|     |                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <div>homozigot ataupun heterozigot</div> <ul style="list-style-type: none"><li>• Menghasilkan keputusan yang senang diperolehi dan stabil pada setiap masa dan tempat yang berlainan</li></ul>                              | <ul style="list-style-type: none"><li>• Kos yang sangat tinggi diperlukan</li><li>• DNA yang berkualiti tinggi dan kuantiti yang banyak diperlukan</li><li>• Mesti kerap berhadapan dengan radio isotop</li></ul>                                           |
| SSR | <ul style="list-style-type: none"><li>• Lokus-spesifik yang tinggi</li><li>• Kemungkinan peluang untuk mendapat bilangan polimorfisme adalah tinggi</li></ul>                                                               | <ul style="list-style-type: none"><li>• Mungkin hanya boleh digunakan untuk analisa intraspesifik dan intra genomik</li><li>• Tidak boleh digunakan untuk analisa perbandingan</li></ul>                                                                    |
| EST | <ul style="list-style-type: none"><li>• Memberi maklumat tambahan daripada pemetaan QTL</li><li>• Boleh memperkenalkan gen kepada tisu yang spesifik</li><li>• Menghasilkan bilangan urutan yang banyak dan cepat</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Kurangnya primer yang spesifik</li><li>• Penghasilan mengambil masa yang lama dan kos yang tinggi</li><li>• Kecenderungan untuk mendapat kesilapan adalah tinggi daripada menggunakan kaedah konvensional</li></ul> |

Pengcaman kultivar secara tradisional iaitu melalui ciri morfologi dan fenologi memerlukan pemerhatian tumbuhan yang matang secara rapi dan tepat dan mengambil masa beberapa tahun untuk tumbuhan yang berbuah. Lagipun, ciri morfologi mungkin berbeza mengikut keadaan faktor persekitaran, dan dengan itu penggunaannya sebagai penanda adalah tidak tepat (Liu dan Furnier, 1993). Ciri-ciri kimia tumbuhan pula telah terkenal dan digunakan oleh ahli taksonomi sejak berabad-abad lamanya. Contohnya ialah ciri minyak pati dalam genus Labiatae

seperti thyme, catmint, pudina dan turpentine. Dua bahagian besar Compositae iaitu Asteroideae dan Cichorioideae dibezakan dengan kehadiran atau ketiadaan sejenis bahan kimia iaitu lateks (Heywood, 1976). Walaupun kajian isoenzim adalah sumber maklumat yang mudah diperolehi, namun kaedah tersebut tidak selalunya dapat menunjukkan polimorfisme yang amat diperlukan untuk menentukan variasi di antara kumpulan atau kelompok individu yang mempunyai persamaan genetik yang sangat rapat (Heywood, 1976).

Teknik RAPD mempunyai kelebihan berbanding dengan teknik yang lain di dalam dokumentasi genetik kerana ia menggunakan set-set primer yang universal, tidak memerlukan kerja-kerja permulaan seperti pengasingan probe, penyediaan penurasan ataupun penyusunan nukleotid (Williams *et. al.*, 1990). Teknik RAPD menjadi satu teknik yang penting disebabkan oleh kaedahnya yang mudah, berkesan dan tidak memerlukan maklumat jujukan genomik terlebih dahulu (Karp, *et.al.*, 1997). Dengan kemudahan teknik RAPD ini, secara tidak langsung ia menjadi satu kaedah yang sesuai digunakan untuk pemetaan genetik, program pembiakan tumbuhan dan haiwan dan pencapjarian DNA. Sebagai contohnya, hanya sedikit primer diperlukan untuk mengcam polimorfisme di antara spesies-spesies yang dikaji (Williams *et. al.*, 1990). Mulcahy *et. al.* (1995) melaporkan, kadangkala hanya satu primer sahaja boleh digunakan untuk mengcamkan kesemua sampel-sampel varieti yang dikaji. Para penyelidik dapat memperolehi bilangan penanda molekul DNA yang banyak dengan menggunakan teknik ini melalui PCR untuk tujuan pengcaman spesies kajian. Sistem ini telah terbukti berjaya digunakan di dalam kebanyakan



spesies untuk kajian pencapjarian dan ujian keturunan ataupun asal-usul individu (Dettori dan Palombi, 2000).

Di dalam teknik RAPD, keupayaan asid nukleik membentuk 'hibrid molekul' dengan cara pemasangan telah menjadi asas dan membuka satu bidang baru yang sangat besar dan menarik yang membolehkan ahli-ahli biologi tumbuhan membuat anggaran langsung tentang persamaan genetik keseluruhan. Bebenang DNA yang diekstrak daripada organisma dilaraikan dan kemudian dibiarkan menghibrid secara *in vitro* dengan DNA atau RNA yang diekstrak daripada organisma lain, dan homolog antara kedua-duanya boleh diekspresi secara kuantitatif dengan mengukur penyerapan masing-masing dalam cahaya ultra ungu (Heywood, 1976).

Teknik penghibridan DNA pada mulanya digunakan pada haiwan dan mikroorganisma, dan hanya sedikit eksperimen yang menggunakan tumbuhan dilakukan (Heywood, 1976). Kaedah dengan penanda RAPD kini telah ditemui sangat berguna untuk mengetahui ciri-ciri dan juga mempelajari diversiti pelbagai jenis tanam-tanaman (Kumar, *et al.* 1998). Analisa RAPD telah banyak digunakan antaranya untuk menentukan diversiti genetik kentang (Demeke *et al.*, 1996), mengesan variasi somaklon tebu (Munthali *et al.*, 1996), pencaman cultivar *Feijoa sellowiana* Berg (Dettori, 2000), variasi genetik di dalam kultivar-kultivar *Brassica campestris* (Das *et al.*, 1999) dan analisa genetik spesies *Heliconia* dan kultivarnya (Kumar *et al.*, 1998). Vicario *et al.* (1995) menggunakan teknik RAPD untuk menganalisis hubungan genetik antara populasi *Abies nebrodensis* dan *Abies alba*.

Mereka mendapati teknik RAPD adalah lebih baik dalam menentukan perbandingan genetik berbanding dengan analisa allozim yang turut dilakukan. Keputusan analisa RAPD yang diperolehi menunjukkan ketepatan di dalam membezakan hubungan genetik di antara populasi yang mengesahkan hipotesis mereka bahawa dua kumpulan spesies tersebut adalah jelas berbeza dari segi taksonomi.

Dalam kaedah RAPD, jalur-jalur DNA adalah diperolehi daripada PCR iaitu daripada amplifikasi segmen-segmen DNA rawak daripada satu primer yang dipilih secara rambang (Yu *et al.*, 1993). Williams *et al.* (1990) adalah orang pertama yang menggunakan prosedur ini ke atas sampel tumbuhan dan mencadangkan ianya dipanggil RAPD. Primer rambang yang digunakan selalunya mempunyai saiz 9 atau 10 bp dan kandungan GC adalah antara 50-80%. Primer ini tidak seharusnya mengandungi jujukan yang berkomplimentari sesama sendiri ('self-complimentary'). Bilangan fragmen DNA yang diamplifikasikan bergantung kepada primer dan DNA templat yang digunakan (Yu *et al.*, 1993). Primer RAPD akan terikat kepada beberapa kawasan di sepanjang genom hanya jika ianya mengandungi target jujukan yang komplimentari. Pengikatan ini dikenalpasti oleh DNA polymerase yang sangat stabil pada suhu tinggi yang didapati daripada *Thermus aquaticus* iaitu Taq polymerase sebagai kodon pemula. DNA akan dipotong mengikut panjang yang spesifik di mana akan dilihat dan dikira dengan menggunakan elektroforesis gel agaros. Persamaan dan perbezaan dari segi corak atau jalur DNA yang dihasilkan pada gel agaros boleh digunakan untuk mengira jarak genetik di antara individu-individu atau populasi kajian mengikut kaedah-kaedah tertentu seperti kaedah

‘Ward’s Method’, ‘Average Linkage Clustering’, ‘Complete Linkage Clustering’, ‘Single Linkage Clustering’ dan ‘Within Groups Clustering’ daripada program SPSS, ‘Jaccard Similarity Index’, kaedah ‘UPGMA’(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) dan ‘Phylip Neighbour-Joining’ dan sebagainya.

## 1.5 KANDUNGAN BAHAN-BAHAN KIMIA FAMILI HALIA

Secara kasar, komposisi di dalam rizom segar adalah air (80.8%), protein (2.3%), lemak (1.0%), karbohidrat (12.3%), fiber (2.4%) dan abu (1.2%) (Purseglove, 1972). Rizom dilaporkan mengandungi 1-3% minyak pati, iaitu yang paling banyak ialah sesquiterpene, zingiberene,  $C_{15}H_{14}$  manakala bau rizom yang kuat adalah zingerone,  $C_{11}H_{14}O_3$  yang terdapat dalam oleoresin (Purseglove, 1972). Kebanyakan bahan-bahan kimia yang terdapat dalam rizom bagi sebahagian besar famili halia mempunyai aktiviti biologi dan sangat penting dalam kajian farmakologi.

Kepentingan famili halia adalah merujuk kepada rasa dan baunya. Kandungan halia yang terutamanya adalah minyak pati, resin dan kanji. Baunya yang tajam adalah daripada kandungan resinnya, manakala bau aroma dan rasanya adalah daripada minyak pati (Brown, 1954). Bahan-bahan aktif yang paling penting di dalam minyak pati adalah sesquiterpenes: bisapolene, zingiberene dan zingiberol (Connell dan Sutherland, 1969; Yoshikawa *et al.*, 1993).

Ujian fitokimia yang telah dijalankan terhadap beberapa spesies Zingiberaceae di Malaysia menunjukkan bahawa terpenoid adalah yang terbanyak antara bahan-bahan sebatian kimia yang lain di dalam kesemua spesies yang diuji. Bahan ini dikesan di dalam setiap bahagian tumbuhan dari spesies *Zingiber* terutamanya dalam bentuk minyak pati (Zakaria dan Ibrahim, 1986). Alkaloid dikesan di dalam spesies *Z. cassumunar* (*Z. montanum*) dan *Z. officinale* dalam kuantiti yang sedikit dan dijumpai hanya di bahagian rizom. Penemuan ini adalah yang pertama kali dilaporkan di dalam spesies *Zingiber*. Penemuan alkaloid ini adalah satu perkara yang menarik di mana kebiasaan alkaloid didapati di dalam tumbuhan dikotiledon berbanding monokotiledon. Alkaloid juga didapati dalam tiga spesies daripada genus *Alpinia* dan *Hedychium*. Flavanoid pula dikesan dalam *Z. cassumunar*, *Z. griffithii* dan *Z. officinale* (Zakaria dan Ibrahim, 1986). Merh *et al.* (1986) pula menemui adanya saponin di dalam pelbagai genera dalam keluarga Zingiberaceae seperti *Globba*, *Curcuma*, *Hedychium*, *Zingiber* dan *Alpinia*.

Bahan-bahan kimia yang lain didapati di dalam famili Zingiberaceae adalah seperti gingerol (Tang dan Eisenbrand, 1992), zingerone (Connell dan Sutherland, 1969 ; Govindarajan dan Govindarajan, 1979), shogoal (Nomura dan Tsurumi, 1926), gingerdiols, methylgingerdiols dan asetatnya (Masada *et al.*, 1973), hexahydrocurcumin dan analog demetilnya (Mutara *et al.*, 1972), Capsaicin yang merupakan bahan kimia yang berbau di dalam *Capsicum* juga ditemui di dalam *Z. officinale* (Baghya, 1977).

Penyumbang utama kepada aroma halia yang ditemui ialah neral, geranial, bornyl asetat,  $\beta$ -zingiberene,  $\beta$ -eudesmol dan trans- $\beta$ -sesquiphellandrol (MacLeod dan Pieris, 1984). Bau aroma halia mungkin berlainan bergantung kepada perbezaan dari segi kimotaksanomi antara kultivar, kawasan yang dihasilkan, iklim dan persekitaran pertumbuhan (MacLeod dan Pieris, 1984). Gingerenone A didapati mempunyai kesan antifungal terhadap fungi *Pyricularia oryzae* (Endo *et al.*, 1990). 6-gingerol didapati sangat berkesan sebagai ubat batuk (Suekawa *et al.*, 1984). Arambewela *et al.* (1999) melaporkan bahagian akar dan rizom *K. galanga* mempunyai aktiviti antibakteria ke atas bakteria *Staphylococcus aureus* (NCTC6511) dan *Escherichia coli* (NCTC10418). *K. galanga* dilaporkan juga mengandungi derivatif asid sinamik, monoterpenoides dan hidrokarbon (Arambewela *et al.*, 1999).

## 1.6 TUMBUHAN DAN CIRI-CIRI ANTIMIKROBIAL

Di dalam kehidupan yang serba moden ini, pelbagai jenis ubat-ubatan adalah satu kemestian untuk mengubati penyakit. Oleh sebab itu kerajaan telah memberi lesen kepada perusahaan-perusahaan farmasi untuk membekalkan ubat kepada masyarakat. Dengan itu, ubat-ubatan yang dihasilkan adalah lebih terjamin keselamatannya. Jenis-jenis ubat yang dihasilkan dan sering dilihat di pasaran adalah berbentuk pil, tablet, krim atau salap, minyak sapu dan jenis cecair yang diminum.

Sementara itu, minat masyarakat terhadap ubat-ubatan tradisional tidak pernah pupus. Peniaga atau pengusaha ubat-ubatan tradisional ataupun jamu dilihat semakin berkembang di negara ini. Malah kerajaan sekarang lebih menggalakkan kepada perusahaan ubatan tradisional setelah disedari ubat-ubatan tradisional tidak mempunyai kesan sampingan jika digunakan dengan cara yang betul dan ia juga tidak dicampurkan dengan bahan-bahan kimia. Ramuan ubat-ubatan tradisional sebahagian besarnya adalah berasal daripada tumbuh-tumbuhan.

Tumbuh-tumbuhan dan produknya telah digunakan dalam rawatan pelbagai penyakit semenjak zaman dahulu lagi sebelum kajian saintifik dilakukan. Ini berdasarkan ilmu-ilmu yang diturunkan oleh nenek moyang terdahulu. Dalam perubatan yang melibatkan mikroorganisma patogen, ia dilihat kesan penggunaan tumbuh-tumbuhan tertentu yang dapat membunuh dan menghalang pertumbuhannya. Tumbuh-tumbuhan yang digunakan secara tradisional adalah mengikut kaedah-kaedah tertentu sebagai ubat-ubatan untuk merawat penyakit akibat jangkitan mikrob tersebut. Pada masa dahulu masyarakat hanya menggunakan bahagian-bahagian tertentu tumbuhan sebagai antibiotik tanpa mengetahui sifat tumbuhan tersebut iaitu apakah bahan aktif yang terlibat dan bagaimana ia berfungsi. Tetapi sekarang saintis telah menguji secara saintifik kesan antibakteria dan juga dapat mengasingkan bahan aktif di dalam tumbuhan untuk mengenalpasti ianya aktif sebagai bahan antibiotik mengikut kaedah tertentu dengan alatan yang serba canggih. Sebelum dilakukan kajian saintifik, biasanya maklumat tentang penggunaan tumbuhan sebagai ubatan diperolehi terlebih dahulu. Sekarang banyak maklumat dibukukan seperti

dokumentasi maklumat daripada literatur oleh Burkill (1966), Perry (1980), Zakaria dan Mustafa (1992), Indu Bala dan Ng (1999) dan lain-lain. Daripada maklumat yang diperolehi, kajian saintifik dilakukan untuk mengesahkan kegunaan tumbuhan ubatan tertentu. Contohnya kajian yang dilakukan adalah oleh Ray dan Majumdar (1976), yang menguji aktiviti antikulat daripada ekstrak rizom *Alpinia officinarum* Hance melalui teknik yang didapati daripada Chandra dan Banerjee (1967). Melalui kaedah daripada spektrofotometer dan kromatografi, mereka mendapati sebatian aktif yang ditemui adalah flavanoid di mana menunjukkan aktiviti antikulat yang sangat kuat ke atas kulat patogen seperti *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* dan *Epidermophyton floccosum* yang mengakibatkan penyakit kulit di bahagian timur India. Sebatian aktif tersebut juga didapati mempunyai kesan positif ke atas beberapa bakteria gram-positif dan gram-negatif dan mereka juga mendapati bahawa sebatian tersebut adalah tidak beracun apabila diuji pada tikus. Terdapat banyak lagi penyelidikan saintifik sedemikian yang telah dan sedang dilakukan untuk memperolehi bukti saintifik tumbuhan ubatan seperti yang dilakukan oleh Martinez *et al.*(1996) yang menguji kesan antimikrob ke atas 12 spesies tumbuhan di Cuba terhadap empat jenis bakteria dan satu jenis yis. Dengan kesedaran ini, World Health Organisation (WHO) telah menekankan kepentingan penyelidikan-penyelidikan saintifik ke atas tumbuh-tumbuhan ubatan tradisional (Farnsworth dan Soejarto, 1991).

Osborn (1943), telah melaporkan berjaya menguji lebih daripada 2,300 spesies tumbuhan untuk kesan antibakteria. Nickell (1959) juga telah membuat ujian

antibakteria terhadap beberapa tumbuhan vaskular. Begitu juga dengan Farnsworth (1966) yang menjalankan ujian antibakteria terhadap tumbuh-tumbuhan yang ditinjaunya. Sehingga kini ramai ahli-ahli farmakologi di merata dunia terus membuat ujian antibakteria terhadap pelbagai spesies-spesies tumbuhan di negara masing-masing. Contohnya, Djipa *et al.* (2000) yang menjalankan kajian aktiviti antibakteria terhadap ekstrak kulit kayu *Syzygium jambos* (L.) Alston dari famili Myrtaceae. Omar *et al.* (2000) juga menguji kesan antimikrobial terhadap 14 ekstrak pokok kayu keras di kawasan timur Amerika Utara. Begitu juga di India yang dilakukan oleh Samy dan Ignacimuthu (2000) terhadap 30 jenis tumbuhan ubatan yang belum diuji secara saintifik tetapi telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat di Ghats. Beliau mendapati hanya 10 spesies daripadanya tidak menunjukkan aktiviti antibakteria.

Ekstrak krud daripada daun dan bunga *Mitracarpus villosus* telah diuji kesan antibakterianya secara *in vitro* dengan menggunakan kaedah peyerapan agar dan pencairan tiub. Zon-zon perencatan bakteria telah diperolehi (8-23 mm) ke atas bakteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Basillus subtilis* dan *Streptococcus faecalis* (Irobi dan Daramola, 1994). Dalam kajian fitokimia oleh Irobi dan Daramola (1994), bahan aktif daripada ekstrak *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae) iaitu fenol dan tanin didapati mempunyai kesan antibakteria ke atas bakteria yang diuji antaranya seperti *S. aureus* dan *E. coli*. Begitu juga kajian yang dijalankan oleh Paulo (1994), yang mendapati alkaloid jenis cryptolepine dan cryptoheptine yang diekstrak daripada spesies tumbuhan *Cryptolepis sanguinolenta* mempunyai aktiviti



antibakteria ke atas strain bakteria *E.coli* ATCC 25922, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Salmonella typhimurium* ATCC 43971, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis* ATCC 10541 dan *Vibrio cholerae* ATCC 11623.

Penyelidikan farmakologi terus dilakukan untuk mendapatkan bahan-bahan aktif daripada tumbuhan yang mempunyai kesan antibakteria serta memperoleh penemuan ubat-ubatan terbaru dan seterusnya ahli-ahli kimia dapat membuat kajian ke atas struktur bahan aktif tersebut dengan membentuk struktur kimia bahan aktif itu dalam penghasilan ubat-ubatan secara sintesis. Penyelidikan-penyelidikan yang dijalankan ini dapat menyokong sepenuhnya terhadap perubatan tradisional di mana ianya sebagai sumber yang berharga di dalam potensi untuk penemuan terbaru bagi produk farmaseutikal yang semulajadi. Strategi-strategi baru seperti yang melibatkan kerjasama daripada dukun atau pengamal ubat-ubatan tradisional dan juga rujukan daripada catitan buku-buku perubatan lama adalah perlu untuk mengenal pasti sumber tumbuh-tumbuhan yang mempunyai nilai perubatan. Penemuan tumbuh-tumbuhan yang baru dikenal pasti mempunyai kesan rawatan ke atas jangkitan mikroorganisma patogen mungkin boleh membantu bidang farmaseutikal sebagai alternatif untuk menghasilkan ubat.

Bagi famili Zingiberaceae pula, terdapat banyak kajian yang telah dilakukan berkaitan dengan perubatan. Famili halia telah terkenal sebagai tumbuhan yang selalu digunakan dalam rawatan tradisional oleh masyarakat kampung terutamanya rawatan kepada wanita selepas bersalin. Purseglove (1972) melaporkan bahawa

rizom daripada famili Zingiberaceae mempunyai nilai-nilai komersil yang penting. Banyak spesies daripada famili ini digunakan sebagai ubatan tradisional di seluruh Asia Tenggara dan menurut beliau antara spesies yang terpenting ialah *Z. cassumunar* Roxb. (*Z. montanum*) dan *Z. zerumbet* (L.) Sm., di mana spesies tersebut di tanam secara meluas sebagai tanaman kampung. Kegunaannya sebagai tumbuhan ubatan telah dinyatakan di dalam bab 1.2. Kandungan bahan-bahan aktif di dalam tumbuhan ini adalah seperti yang telah diuraikan di dalam bab 1.5 yang menunjukkan kepentingannya di dalam rawatan pelbagai penyakit. Beberapa kajian telah dilakukan ke atas famili halia seperti yang dilakukan oleh Onyenekwe dan Hashimoto (1999) yang mengasingkan komposisi minyak pati daripada *Z. officinale* Roscoe dan Mascolo *et al.* (1989) yang menjalankan ujian anti-radang dan antimikrob ke atas *Z. officinale*. Endo *et al.* (1990) berjaya mengasingkan beberapa sebatian kimia daripada rizom *Z. officinale* dan mendapati bahawa gingerenone A mempunyai aktiviti antikulat yang sangat kuat ke atas *Pyricularia oryzae*. Ficker *et al.* (2003) telah mengekstrak 11 spesies daripada famili Zingiberaceae untuk ujian antikulat dengan menggunakan teknik penyerapan agar. Mereka mendapati ekstrak rizom terutamanya daripada *Alpinia galanga*, *Curcuma zedoaria* dan *Zingiber purpureum* (*Z. montanum*) didapati menunjukkan aktiviti yang sangat kuat terhadap beberapa jenis kulat yang patogen kepada manusia termasuklah kulat yang resistan terhadap antikulat jenis amfoterisin B dan ketoconazol. Habsah *et al.* (2000) pula menjalankan pengskrinan ekstrak daripada 13 spesies daripada genus-genus *Alpinia*, *Costus* dan *Zingiber* untuk kesan aktiviti antimikrob. Mereka mendapati hampir ke semua ekstrak diklorometana daripada spesies-spesies tersebut mempunyai kesan

antibakteria dan hanya satu ekstrak daripada metanol iaitu ekstrak *Costus discolor* menunjukkan aktiviti yang positif ke atas *Aspergillus ochraceous*. Kajian-kajian lain adalah seperti ujian antikulat oleh Apisariyakul *et al.* (1995) ke atas *Curcuma longa* (Zingiberaceae) dan kajian aktiviti antibakteria ekstrak xanthorrhizol daripada *Curcuma xanthorrhiza* ke atas bakteria patogen di dalam rongga mulut (Hwang *et al.*, 2000).

Namun begitu, kajian pengskrinan antibakteria didapati masih perlu dilakukan ke atas spesies-spesies lain daripada famili Zingiberaceae khususnya terhadap spesies-spesies yang dikaji di dalam kajian ini seperti *Z. officinale* var. *rubrum*, *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi), *Z. montanum*, *Z. ottensii*, *Z. zerumbet* dan *K. galanga*. Kajian seterusnya yang perlu dilakukan adalah untuk memperolehi dan memperbanyakkan maklumat saintifik tentang spesies-spesies tumbuhan terutamanya daripada famili Zingiberaceae yang banyak tumbuh atau ditanam di Malaysia.

## 1.7 KAJIAN KULTUR TISU DAN KEPENTINGANNYA

### Kajian kultur tisu

Asas kultur tisu dikaitkan dengan teori sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden pada tahun 1838. Mereka mengatakan setiap sel ialah unit hidup yang bebas dan sel-sel yang telah membeza pada organisma multisel masih mengandungi maklumat yang wujud dalam sel tunggal yang pertama, iaitu sel telur yang tersenyawa. Kenyataan ini memberi asas bahawa sel-sel yang telah membeza adalah berpotensi dan teori ini membawa kepada perkembangan kultur tisu sehingga hari ini (Teo, 1992).

Biasanya di dalam kajian kultur tisu setiap eksplan atau bahagian tanaman seperti pucuk, daun, akar, batang, petiol dan sebagainya mempunyai keupayaan untuk membentuk satu individu tumbuhan yang lengkap berdasarkan teori totipotensi (Staba, 1980). Sel-sel dari tisu yang berlainan di dalam tumbuhan seperti sel mesofil daun, sel epidermis daun, sel floem sekunder, sel dari tisu batang, kambium, petal, ovul dan nuselus yang masih ada nukleus adalah bersifat totipoten (Lyndon, 1990).

Keperluan asas kultur tisu secara *in vitro* ialah medium yang sesuai. Komponen asas kebanyakan medium ialah sumber karbon, garam bukan organik, vitamin, hormon dan bahan-bahan organik lain. Sumber karbon diperlukan dalam semua medium kultur sebagai sumber tenaga. Karbohidrat dalam bentuk gula

sukrosa atau glukosa selalunya digunakan. Sumber karbohidrat lain ialah D-glukosa, D-fruktosa dan sebagainya.

Garam inorganik seperti garam klorida, nitrat, sulfat, fosfat dan iodida daripada unsur-unsur besi, boron, kalium, kalsium, magnesium, mangan dan natrium biasanya digunakan. Bahan bukan organik ini diperlukan berterusan dalam medium kultur. Unsur yang diperlukan dengan banyak dipanggil makronutrien dan yang diperlukan sedikit dipanggil mikronutrien.

Vitamin diperlukan dalam medium sebagai mangkin dalam tidakbalas enzim. Biasanya vitamin diperlukan sedikit sahaja. Tiamina (vitamin B1) ialah vitamin yang penting untuk kultur semua tisu pokok. Niasin (asid nikotinik) dan piridoksin biasanya digunakan untuk menggalakkan pertumbuhan.

Bahan-bahan organik seperti asid amino dan pepton kadang-kadang digunakan dalam sesetengah medium. Penggunaannya terhad hanya untuk menggalakkan gerakbalas fisiologi tertentu. Asid amino yang sering digunakan ialah glisin (asid aminoasetik). Bahan-bahan organik lain yang digunakan dalam sesetengah medium ialah urea, arginin, glutamin, asparagin dan ammonia. Bahan organik semula jadi seperti jus buah-buahan dan air kelapa juga digunakan sebagai tambahan.

Hormon atau pengawalatur tumbesaran tumbuhan yang selalu digunakan ialah auksin, sitokinin, giberalin, etilena, brasinosteroid, asid absisik, paclobutrazol, ansimidol dan polyamina. Sitokinin berfungsi untuk menggalakkan pembahagian sel, pembentukan pucuk luarbiasa, merencat pembentukan akar, merangsangkan pembentukan dan tumbesaran tunas aksilari, merencatkan pemanjangan pucuk, merencat peluruhan daun dan mengawal pertumbuhan. Contoh-contoh sitokinin yang biasa digunakan ialah 6-benzylaminopurine (BAP), 6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethylallylaminopurine (2iP), kinetin, thidiazuron (TDZ), N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea, zeatin dan zeatin riboside.

Auksin digunakan untuk pertumbuhan akar (kepekatan tinggi), pembentukan pucuk luarbiasa (kepekatan rendah), merangsangkan pembentukan embrio somatik, pembahagian sel, pembentukan kalus dan tumbesarannya, merencatkan tunas aksilari dan merencat pemanjangan akar. Contoh-contoh hormon auksin yang digunakan ialah IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid), NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), picloram dan dicamba. Hormon giberalin yang digunakan ialah asid giberalik yang berfungsi sebagai perangsang pemanjangan pucuk, pemecah dormansi biji benih, embrio dan tunas apikal dan merencat pembentukan pucuk luarbiasa. Hormon asid absisik digunakan untuk merangsangkan pembentukan umbisi dan tuber, merangsangkan kematangan embrio dan menggalakkan pemecahan dormansi. Hormon polyamina pula digunakan untuk menggalakkan pembentukan akar luarbiasa, embriogenesis somatik dan pembentukan pucuk. Contoh-contoh hormon polyamina ialah putrescin

dan spermidin. Manakala pengawalatur tumbesaran seperti paclobutrazol dan ansimidol menghalang sintesis gibberalin yang menyebabkan penghasilan pucuk yang pendek dan menggalakkan pembentukan tuber, umbisi dan bebawang.

Jenis tanaman dan tisu pokok yang berlainan mungkin memerlukan medium asas yang berlainan seperti medium White's (1963), MS (Murashige and Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), Nitsch's (Nitsch and Nitsch, 1969), N6 (Chu, 1978) dan E1 (Gamborg *et al.*, 1983). Walau bagaimanapun, medium MS (Lampiran 8) boleh digunakan sebagai medium asas untuk mengkultur kebanyakan tisu tanaman. Perubahan mungkin dilakukan ke atas medium MS ini untuk memperolehi keputusan yang lebih baik.

### **Kepentingan**

Pembiakan tumbuhan melalui kaedah kultur tisu mempunyai banyak kelebihan berbanding dengan kaedah pembiakan secara konvensional. Kelebihan yang paling penting ialah untuk menghasilkan kadar pembiakan yang cepat dalam masa yang singkat. Ini adalah amat perlu sekiranya terlalu banyak anak tumbuhan yang diperlukan. Nadgauda *et al.* (1977), mendapati dalam kajian kultur tisunya ke atas *Curcuma longa*, sebanyak 188,000 anak pokok boleh dihasilkan daripada satu eksplan dalam masa setahun. Selain daripada itu, kaedah ini juga boleh menghasilkan sumber tanaman yang bebas daripada penyakit. Mengikut De Lange *et al.* (1987), kaedah kultur tisu dapat menghasilkan anak-anak pokok halia (*Z. officinale*) yang bebas daripada patogen jenis nematoda setelah mengkulturkan

eksplan tunas pucuk yang berasal daripada rizom yang disimpan dalam keadaan yang dijangkiti patogen tersebut (sebelum kultur).

Teknik kultur tisu juga boleh menghasilkan pengeluaran tanaman dalam keadaan yang terkawal dan boleh dijalankan sepanjang tahun. Tanaman-tanaman ini boleh juga disimpan serta digunakan pada bila-bila masa yang dikehendaki. Melalui kultur tisu, klon-klon yang dikehendaki juga boleh diperolehi selain daripada menghasilkan klon-klon baru.

Bagi tanaman yang sukar didapati dan sukar dibiakkan seperti pokok-pokok hutan yang mempunyai banyak kepentingannya dan juga pokok yang diancam kepupusan, teknik kultur tisu adalah satu cara penyelesaian yang boleh digunakan setelah pembiakan cara biasa atau biji benih adalah sukar atau tidak berkesan. Bagi tanaman yang mempunyai rizom seperti famili halia di mana rizomnya itu terdapat di dalam tanah, pembiakan secara konvensional iaitu dengan keratan bahagian rizom mempunyai risiko yang tinggi untuk dijangkiti pelbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteria dan kulat. Tetapi melalui teknik kultur tisu, jangkitan-jangkitan penyakit boleh dikurangkan atau dihapuskan sama sekali. Ini adalah berdasarkan kajian oleh Sharma dan Singh (1997), di mana beliau telah mengklonkan spesies-spesies *Z. officinale* yang telah dijangkiti oleh *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* melalui kaedah kultur tisu dan beliau mendapati apabila klon-klon spesies tersebut ditanam semula untuk mendapatkan rizom dan rizom tersebut diuji kehadiran



patogen tersebut, didapati rizom itu adalah bebas daripada penyakit yang disebabkan oleh patogen itu.

## **1.8 KAJIAN KULTUR TISU KE ATAS FAMILI ZINGIBERACEAE**

Pembiakan tumbuhan melalui teknik kultur tisru telah menjadi satu teknik yang sangat penting dan popular untuk menghasilkan tanaman di mana ianya sukar dibiakkan secara konvensional seperti biji benih ataupun secara vegetatif. Sel-sel tertentu digunakan untuk menghasilkan banyak klon-klon baru yang berasal daripada induknya di bawah keadaan persekitaran aseptik (Govil dan Gupta, 1997). Adalah sukar untuk menghasilkan regenerasi tumbuhan yang lengkap yang memenuhi ketepatan dari segi ciri-ciri genetik atau genotipnya, di mana ia perlu mengelakkan daripada pembentukan kalus (Gonzalez-Benito *et al.*, 1996).

Memandangkan spesies dari famili Zingiberaceae mempunyai banyak kepentingan terutamanya dari segi perubatan, maka kajian kultur tisru perlu dilakukan demi untuk memelihara dan menghasilkan kuantiti rizom yang banyak dan berkualiti sebagai sumber untuk agensi-agensi perusahaan perubatan tradisional. Spesies-spesies daripada famili halia adalah ditanam menerusi pembiakan secara vegetatif iaitu melalui keratan bahagian rizomnya dan risiko untuk dijangkiti penyakit sistemik adalah sangat tinggi. Walaupun penyakit ini boleh dikawal dengan semburan antikulat, penggunaan bahan kimia mungkin mempunyai kesan

sampingan. Keratan rizom biasanya dirosakkan oleh *Pseudomonas solanaceurum* (wilt disease), *Fusarium oxysporum f. zingiberi* (fusarium yellow disease) dan *Phyitium* sp. (soft rot). Jangkitan ini jika dikawal secara efektif seperti pembiakan secara kultur tisu dijangkakan dapat meningkatkan pengeluaran hasil sebanyak tiga kali ganda (Bhagyalakshmi, 1988).

Di dalam kajian kultur tisu ke atas famili Zingiberaceae, didapati kebanyakan penyelidikan yang dilakukan sebelum ini hanya menggunakan spesies halia biasa iaitu *Z. officinale*. Spesies-spesies lain yang turut dibuat kajian berkaitan kultur tisu ini ialah seperti kunyit (*Curcuma longa.*), lengkuas (*Alpinia galanga.*) dan cekur (*Kaempferia galanga*). Di antara perintis-perintis dalam kajian kultur tisu untuk keluarga Zingiberaceae adalah Hosoki dan Sagawa (1977) yang melakukan kajian terhadap *Z. officinale*, diikuti pula oleh Nadgauda *et al.* (1978) yang menjalankan kajian ke atas spesies *Curcuma longa* Linn. (kunyit). Dari situ bermulalah kajian-kajian seterusnya oleh penyelidik-penyelidik lain sehingga ke hari ini. Kajian-kajian tersebut menggunakan pelbagai jenis eksplan samada dari segi saiz ataupun umur fisiologi digunakan untuk memulakan kajian kultur tisu antaranya kajian oleh Sharma dan Singh (1997) yang menggunakan tunas pucuk yang kecil dan aktif dan dipotong sehingga saiz 0.5 sm. Faria dan Illg (1995) pula menggunakan eksplan tunas aksilari yang mempunyai kepanjangan 5-6 mm dan dipotong sehingga diameter 2-3 mm sebelum dikultur ke dalam media. Manakala Sakamura dan Suga (1989) pula menggunakan eksplan tunas pucuk yang berumur lima minggu untuk dikulturkan. Penyelidik-penyelidik lain juga didapati menggunakan pelbagai saiz

eksplan dan umur yang berbeza-beza seperti yang dijalankan oleh Vincent *et al.* (1992), Nirmal Babu *et al.* (1992), Balacandran *et al.* (1990), Bhagyalakshmi dan Singh (1988) dan Nadgauda *et al.* (1978). Selain daripada itu berbagai jenis formulasi media, hormon, teknik pensterilan dan juga keadaan persekitaran kultur termasuk kalacahaya dan suhu telah digunakan.

Nadgauda *et al.* (1978) telah menggunakan eksplan tunas pucuk muda daripada bahagian rizom kunyit dan mendapati eksplan tersebut memanjang apabila dikulturkannya ke dalam media Murashige & Skoog (1962) yang mengandungi air kelapa, hormon kinetin dan BAP dan juga pada media Smith's (Kassanis, 1967) yang mengandungi air kelapa, kinetin, BAP dan inositol. Pucuk-pucuk berganda didapati pada media yang sama setelah dilakukan subkultur beberapa kali.

Ilahi dan Jabeen (1987), menggunakan 4 jenis bahagian eksplan *Z. officinale* L. iaitu keratan batang yang berumur tiga bulan, tunas muda, keratan rizom dan pucuk juvenil. Beliau mendapati eksplan yang paling sesuai ialah tunas pucuk muda yang menghasilkan kalus di mana seterusnya membentuk pucuk berganda. Manakala media yang digunakannya ialah media MS berkepekatan separuh yang mengandungi kombinasi hormon-hormon yang berbeza-beza.

Di dalam kajian kultur tisu terhadap famili Zingiberaceae, didapati pelbagai jenis hormon auksin dan sitokinin digunakan. Morfogenesis secara *in vitro* bagi sesuatu eksplan adalah dipengaruhi oleh hormon pengawalaturan tumbesaran auksin

dan sitokinin yang dibekalkan ke dalam media atau yang terhasil secara semulajadi (endogenous) di dalam sel yang dikultur. Kadar hormon yang diperlukan bagi sesuatu spesies tumbuhan adalah berbeza-beza (George dan Sherrington, 1984). Di samping penggunaan hormon-hormon tersebut dalam formulasi media, vitamin, kesan kalcahaya, intensiti cahaya, kepekatan agar dan penambahan kompleks organik juga banyak mempengaruhi proses organogenesis (Miller dan Skoog, 1953).

Dalam kajian Balacandran *et al.* (1990), beliau menggunakan hanya hormon sitokinin iaitu BAP dan kinetin untuk mengklonkan *Curcuma* spp. dan *Zingiber officinale* Rosc. dan mendapati media yang terbaik untuk mendapatkan pucuk berganda bagi spesies-spesies tersebut ialah media MS yang mengandungi 3.0 mg/l BAP. Berbeza pula dengan kajian yang dilakukan ke atas spesies lain daripada famili yang sama iaitu *Kaempferia galanga* yang dilakukan oleh Vincent *et al.* (1992). Bilangan pucuk yang terbanyak didapati pada media MS yang mengandungi kepekatan kinetin sebanyak 13.9  $\mu\text{M}$  dan BA (benzyladenine) sebanyak 2.2  $\mu\text{M}$ . Dalam kajian tersebut, didapati juga pengeluaran akar yang sihat tanpa penggunaan auksin pada media optima tersebut. Apabila auksin (NAA) digunakan dalam media, didapati penambahan pengeluaran akar adalah tidak signifikan malah jumlahnya adalah lebih sedikit daripada media tanpa penggunaan auksin.

Faria dan Illg (1995) pula memperolehi penggandaan pucuk *Zingiber spectabile* Griff. dengan menggunakan eksplan tunas pucuk aksilari pada media MS yang ditambah dengan 10  $\mu\text{M}$  BA dan 5  $\mu\text{M}$  IAA. Pengakaran didapati pada media

MS berkepekatan separuh ataupun air sahaja yang mengandungi 5  $\mu$ M NAA atau IAA. Pengakaran seratus peratus juga didapati tanpa penggunaan auksin di dalam media cecair ataupun media agar gelrite. Illg dan Faria (1995) juga dalam kajian kultur tisunya ke atas *Alpinia purpurata* mendapati 10  $\mu$ M BA dengan 5  $\mu$ M NAA dalam media MS berjaya menghasilkan bilangan pucuk yang banyak. Sharma dan Singh (1997) pula mendapati di dalam kajiannya terhadap *Z. officinale* melaporkan penggunaan kinetin adalah lebih efektif daripada BAP untuk menginduksikan pucuk. Begitu juga dengan kajian oleh Borthakur *et al.* (1999), yang melaporkan bahawa penggunaan kinetin adalah lebih baik daripada BAP dari segi pengeluaran pucuk berganda. Keadaan ini adalah berbeza dengan kajian Wang dan Hu (1980) yang mendapati BAP adalah sitokinin yang paling efektif untuk kultur meristem, pucuk muda dan tunas untuk kebanyakan spesies dan diikuti oleh hormon kinetin.

## **1.9 STRATEGI KAJIAN**

- Menyediakan sampel-sampel genomik DNA setiap spesies kajian melalui kaedah pengekstrakan DNA yang diperolehi daripada kaedah CTAB (Doyle dan Doyle, 1987) untuk analisa RAPD.
- Menyediakan ekstrak krud spesies-spesies kajian untuk diuji aktiviti antibakteria
- Melakukan kajian mikropropagasi untuk melihat respon tumbuhan pada kepekatan hormon BAP yang berbeza dalam penghasilan bilangan serta panjang pucuk dan akar bagi setiap spesies kajian.
- Pemindahan tumbuhan *in vitro* ke lapangan untuk membuat perbandingan dengan tumbuhan kawalan.

## **1.10 OBJEKTIF KAJIAN**

- Untuk mendapatkan satu teknik RAPD-PCR yang optima bagi menghasilkan produk-produk RAPD yang boleh digunakan untuk analisa jarak hubungan genetik antara spesies-spesies kajian.
- Penanda RAPD bagi setiap primer akan digunakan dalam pengcaman setiap spesies kajian dan boleh digunakan sebagai rujukan untuk kajian akan datang.
- Menguji aktiviti antibakteria terhadap ekstrak krud setiap spesies kajian ke atas bakteria-bakteria gram positif dan gram-negatif yang dipilih melalui kaedah "Paper-disc diffusion-assay".

- Mencari protokol yang sesuai untuk kajian mikropropagasi dan menghasilkan kualiti yang lebih baik berbanding dengan tanaman *in vivo*.

### 1.11 HIPOTESIS KAJIAN

Kajian analisa genetik dengan menggunakan kaedah RAPD adalah untuk tujuan kawalan kualiti dan pengesahan (authentication) sesuatu spesies yang dikaji untuk penyelidikan yang berkaitan di masa hadapan. Keputusan RAPD yang diperolehi dapat digunakan sebagai rujukan sekiranya sampel spesies diambil dari kawasan yang lain. Melalui pencapjarian DNA, spesies yang diambil tersebut boleh dikenalpasti terlebih dahulu sebelum dilakukan ujian antibakteria. Sekiranya tiada variasi genetik atau polimorfisme yang dilihat daripada capjari yang dihasilkan maka boleh diandaikan bahawa spesies tersebut akan memberi kesan yang sama dengan spesies yang telah diuji. Manakala kajian mikropropagasi pula dilakukan untuk mendapatkan satu protokol yang sesuai dengan menggunakan kaedah kultur tisu khususnya spesies-spesies yang memberikan keputusan positif dalam ujian antibakteria di dalam kajian ini. Secara tidak langsung, tumbuh-tumbuhan ubatan terutamanya dari keluarga halia ini dapat dibiakkan dengan cepat dan diharap dapat membantu pengusaha-pengusaha tanaman ubatan untuk menghadapi permintaan daripada industri-industri perubatan tradisional dan farmaseutikal. Selain daripada itu kajian ini dilakukan untuk mendapatkan capjari DNA yang boleh menunjukkan hubungan di antara spesies yang berkaitan secara genetik. Hubungan di antara spesies-spesies yang sangat rapat adalah penting kerana berasaskan dari segi teori,

spesies-spesies yang berkaitan rapat dari segi genetik biasanya menunjukkan respon atau aktiviti biologi yang juga serupa terutama sekiranya melibatkan lintasan biokimia iaitu dalam penghasilan kod-kod genetik ataupun enzim yang berkaitan. Terdapat kajian yang menunjukkan hubungan ciri-ciri kimia dan genetik tumbuhan yang berkaitan iaitu kajian oleh Fico *et al* (2003) di mana di dalam kajian tersebut ke atas spesies-spesies daripada genus *Aconitum*, mereka mendapati bahawa profil-profil kimia yang diperolehi adalah berkaitan dengan ciri-ciri genetik melalui analisa RAPD yang dilakukan. Mereka juga menyimpulkan bahawa jika spesies-spesies yang dikaji adalah sukar untuk dicamkan terutamanya yang menunjukkan morfologi yang berbeza, penggunaan penanda profil kimia dan genetik dipercayai boleh mengatasi masalah tersebut. Dengan itu kajian ini adalah amat penting untuk mengetahui spesies mana yang berkaitan rapat dengan spesies yang lain supaya dapat digunakan sebagai alternatif sekiranya salah satu spesies yang berkaitan tersebut gagal ditemui disebabkan oleh kepupusan ataupun sebagainya kerana dipercayai dari segi teori spesies yang rapat dari segi genetik mungkin mempunyai aktiviti biologi yang serupa tetapi mungkin keberkesanan aktiviti yang berbeza.

#### **1.12 SPESIES-SPESIES KAJIAN**

Spesies-spesies yang digunakan di dalam kajian ini adalah seperti yang ditunjukkan di dalam plat 1.1-1.7, di mana menunjukkan gambar keseluruhan pokok dan bahagian rizom serta keratan rentasnya. Morfologi am, asal dan taburan spesies serta kepentingannya telah diuraikan di dalam bab 1.2.



Plat 1.1

(a) : *Zingiber officinale* var. *officinale* (halia biasa)

(b) : Rizom *Z. officinale* var. *officinale* (halia biasa)



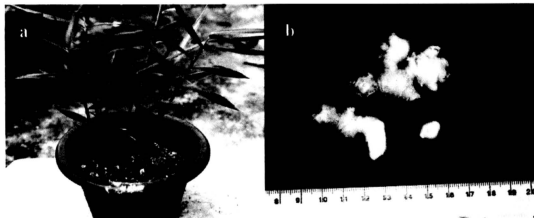
Plat 1.2

(a) : *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara)

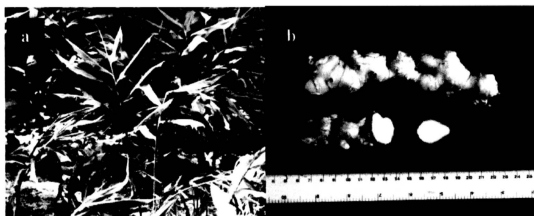
(b) : Rizom *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara)



Plat 1.3      (a) : *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi)  
                   (b) : Rizom *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi)



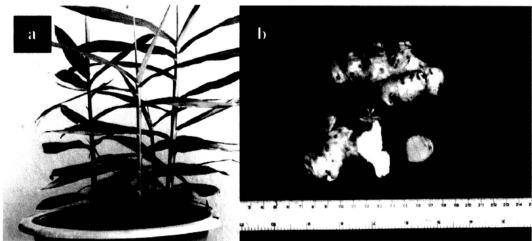
Plat 1.4      (a) : *Z. zerumbet*  
                   (b) : Rizom *Z. zerumbet*



Plat 1.5      (a) : *Z. ottensii*  
                  (b) : Rizom *Z. ottensii*



Plat 1.6      (a) : *Z. montanum*  
                  (b) : Rizom *Z. montanum*



Plat 1.7 (a) : *Kaempferia galanga* (cekur)

(b) : Rizom *K. galanga*.

