a711453 H4

KAJIAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA, MIKROPROPAGASI DAN ANALISA RAPD SPESIES-SPESIES *Curcuma* UBATAN TERPILIH

NOR AZMA BINTI YUSUF

INSTITUT SAINS BIOLOGI
FAKULTI SAINS
UNIVERSITI MALAYA
2005

Perpustakaan Universiti Malaya
A511905147

KAJIAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA, MIKROPROPAGASI DAN ANALISA RAPD SPESIES-SPESIES *Curcuma* UBATAN TERPILIH

Oleh

NOR AZMA BINTI YUSUF

Tesis ini adalah untuk diserahkan kepada Institut Sains Biologi, Fakulti Sains, Universiti Malaya bagi memenuhi keperluan Ijazah Sarjana Sains dalam bidang Bioteknologi Tumbuhan

INSTITUT SAINS BIOLOGI
FAKULTI SAINS
UNIVERSITI MALAYA
2005

PENGHARGAAN

Di kesempatan ini saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada dua penyelia saya Prof Dr Halijah Ibrahim dan Prof Madya Dr Noor zulaani Khalid di atas segala tunjuk ajar, nasihat dan dorongan sepanjang menyiapkan tesis ini.

Penghargaan yang tak terhingga kepada seluruh famili tercinta di atas dorongan yang berterusan sepanjang pengajian.

Sekalung penghargaan juga buat semua rakan-rakan seperjuangan terutama azmi yang banyak membantu, linda, zarina, anum, izie, mas, kyati, klina, kru, seluruh rakan makmal serta ahmad hidayat yang turut memberi dorongan dan semangat.

Buat suami tersayang, ahmad zulfaqur dan cahaya mataku fauzan adzim yang merupakan sumber inspirasi, terima kasih.

Dan kepada semua kenalan yang telah membantu secara langsung ataupun tidak dan yang tidak tersebut disini,, saya mengucapkan jutaan terima kasih.

Ikhlas

Nor Azma Yusuf

12 Jun 2005

ABSTRAK

Ekstrak krud enam spesies *Curcuma* ubatan iaitu *C. aeruginosa, C. mangga, C. rubescens, C. xanthorrhiza, C. zedoaria* dan *C. inodora* aff. telah dikaji untuk melihat kesan aktiviti antibakteria yang dijalankan keatas beberapa bakteria yang patogen terhadap manusia. Di dapati ekstrak-ekstrak tersebut telah berjaya merencatkan pertumbuhan bakteria gram-positif *Staphylococcus aureus* (strain ATCC 24213 dan ATCC 29213), *Micrococcus luteus* dan *Enterococci faecalis* dengan menggunakan kaedah diffusi agar dan tiada aktiviti antibakteria dilihat ke atas pertumbuhan bakteria gram-negatif *Escherishia coli* (strain ATCC 25922 dan ATCC 35213). *C. inodora* aff. menunjukkan spektrum aktiviti antibakteria yang paling luas manakala *C. zedoaria* menunjukkan spektrum antibakteria yang paling sempit di antara spesies *Curcuma* yang dikaji. Penentuan aktiviti antibakteria secara kuantitatif telah dilakukan menggunakan ekstrak *C. inodora* aff. terhadap *M. luteus* yang memberikan nilai MIC (Minimum inhibitory concentration) 25 µg/ml dan nilainya berganda (50 µg/ml) terhadap *S. aureus* ATCC 29213.

Malaysia merupakan salah sebuah Negara tropika yang tidak mampu untuk mengeluarkan benih *Curcuma* yang berkualiti berikutan kekurangan kawasan yang bebas vektor. Oleh itu kaedah mikropropagasi digunakan sebagai kaedah alternatif untuk menghasilkan propagul bebas penyakit. Kajian yang dijalankan ini merangkumi kajian terhadap kesan sitokinin ke atas kadar multiplikasi pucuk untuk penghasilan media optima spesies kajian serta pengamatan tumbuhan *in vitro* berbanding tumbuhan di rumah hijau. Eksplan yang dikultur di atas media pepejal Murashige dan Skoog dengan 3% (b/i) sukrosa berupaya menghasilkan purata 8 pucuk per eksplan dalam masa 4 minggu. Setelah akar terbentuk plantlet telah dipindahkan ke rumah hijau dengan jayanya. Media optima untuk spesies kajian ialah media yang dirawat dengan 3.0 mg/l BAP.

Penghasilan DNA berkualiti tinggi telah tercapai dalam kajian ini menggunakan kaedah yang di modifikasi daripada Doyle & Doyle (1990). Kaedah ini didapati cepat, (hanya beberapa langkah sahaja), murah, senang untuk dikendalikan dan tidak melibatkan penggunaan bahan kimia yang toksik seperti fenol. Satu protokol telah dipilih untuk pengekstrakan 6 sampel *Curcuma* ubatan dan DNA yang terhasil didapati jelas dan tidak berpigmen. Untuk pengekstrakan DNA, hanya daun muda sahaja digunakan kerana kurang kontaminasi dan mengandungi kurang bahan fenolik. Keputusan menunjukkan kaedah RAPD menggunakan OPA 5, OPA 16, OPA 18, OPA 20, OPE 6 dan OPE 9 berupaya untuk menghasilkan amplifikasi yang boleh membezakan profil DNA di antara spesies kajian dan keputusan ini boleh digunakan untuk dokumentasi profil capjari DNA sepsies *Curcuma* ubatan yang dikaji.

ABSTRACT

Crude extracts of six medicinal plants, namely *C. aeruginosa, C. mangga, C. rubescens, C. xanthorrhiza, C. zedoaria* and *C. inodora* aff. were investigated for their antibacterial activities against some human pathogenic bacteria. These extracts significantly inhibited the growth of gram-positive *Staphylococcus aureus* (strains ATCC 24213 and ATCC 29213) and *Micrococcus luteus* and *Enterococci faecalis*, using agar diffusion assay method. None of the plant extracts inhibited the growth of gram-negative *Escherishia coli* (strains ATCC 25922 and ATCC 35213). *C. inodora* aff. showed a pronounced and broad spectrum of activity whereas *C. zedoaria* showed the least activity. Quantitative determination for antibacterial activity of *C. inodora* aff. extract against *M. luteus* gave a minimum inhibitory concentration (MIC) values 25 μg/ml whereas *S. aureus* ATCC 29213 showed a two fold MIC reading (50 μg/ml).

Malaysia is one of the tropical countries that is not able to produce high quality *Curcuma* plants tuber due to lack of vector-free planting areas. The alternative methods of producing disease-free propagules through micropropagation and the field performance of the resultant plants were investigated. Studies that have been carried out included the effect of cytokinin on shoot multiplication rate in order to establish a micropropagation media and comparing the field performance of *in vitro* and *in vivo* plants. An average of 8 shoots per explants were produced within 4 weeks on agar solidified Murashige and Skoog medium supplemented with 3% sucrose, were obtained with various *in vitro* multiplication trials. Plantlets were rooted and were successfully acclimatized to field condition. The optimum concentrations of BAP for *in vitro* multiplications were 3 mg/l for all species studied.

RAPD was performed on the *Curcuma* species to determine their genetic relationship. A modified simple technique for DNA isolation from fresh plant tissue (Doyle & Doyle 1990) successfully yield high quality intact genomic DNA. This method was fast (fewer steps involved), cheap, easy to handle and less toxic then the commonly used method that required phenol extraction steps. A protocol that was used to extract all the 6 samples produces clear, nonpigmented and intact DNA. The quality of the DNA was much more improved when reextraction was carried out. For the *Curcuma* species, only young leaves were used for the DNA extraction as they were free from contaminations and contain less phenolic substances. This study demonstrated that the RAPD method was preferred for discriminating the 6 species. The results indicate that the RAPD methods using OPA 5, OPA 16, OPA 18, OPA 20, OPE 6 and OPE 9 yields amplification products which were species specific for the samples investigated throughout the analysis.

ISI KANDUNGAN

TAJUK	MUKASURAT
PENGHARGAAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
ISI KANDUNGAN	iv-vii
SENARAI JADUAL	viii-ix
SENARAI RAJAH	ix-x
SENARAI PLAT	xi-xii
SENARAI SINGKATAN KATA	xiii-xiv
BAB 1 PENGENALAN	**1**
1.1 Famili Zingiberaceae dan kepentingannya	3
1.2 Genus *Curcuma* Linnaeus	5
1.3 Kepentingan spesies-spesies genus *Curcuma*	7
1.4 Pengenalan am spesies-spesies kajian	9
1.5 Kajian antibakteria	14
1.5.1 Sejarah penggunaan tumbuhan sebagai sumber ubatan	14
1.5.2 Kandungan bahan kimia penting	15
1.5.3 Aktiviti biologi spesies-spesies famili Zingiberaceae	17
1.6 Kajian mikropropagasi	19
1.6.1 Kelebihan menggunakan kaedah kultur tisu	19
1.6.2 Kultur *in vitro* spesies-spesies famili Zingiberaceae	21
1.7 Analisa DNA terhadap kajian pemetaan tumbuhan	26
1.7.1 Teknik-teknik biologi molekul untuk kajian pemetaan DNA tumbuhan	27
1.7.1.1 RFLP	27

TAJUK **MUKASURAT**

1.7.1.2 RAPD 27

1.7.1.3 AFLP 28

1.7.1.4 Mikrosatelit 28

1.7.2 Analisa dan aplikasi RAPD 28

1.7.3 Aplikasi RAPD terhadap spesies-spesies famili Zingiberaceae 32

BAB 2 KAJIAN ANTIBAKTERIA

2.1 Pengenalan 34

2.2 Bahan dan kaedah 40

2.2.1 Sumber sampel kajian 40

2.2.2 Penyediaan sampel ekstrak krud 41

2.2.3 Penyediaan media untuk kultur bakteria 41

2.2.4 Bakteria kajian 43

2.2.5 Inokulum untuk ujian antibakteria 43

2.2.6 Ujian antibakteria semi kuantitatif 44

2.2.6.2 'Paper-disk Diffusion Assay' 44

2.2.7 Ujian aktiviti antibakteria secara kuantitatif 44

2.2.7.1 'Determination of Minimum Inhibitory Concentration' 44

2.2.7.1.1 '2-Fold Broth Dillution Method' 44

2.3 Keputusan 46

2.3.1 Ekstrak tumbuhan 46

2.3.2 Kajian aktiviti antibakteria terhadap ekstrak spesies kajian 46

2.3.3 Ujian kuantitatif aktiviti antibakteria *C. inodora* aff. 52

2.4 Perbincangan 57

2.4.1 Aktiviti antibakteria spesies-spesies *Curcuma* ubatan 57

TAJUK **MUKASURAT**

BAB 3 KAJIAN MIKROPROPAGASI

3.1	Pengenalan	66
	3.1.1 Sejarah penggunaan kaedah kultur tisu	69
3.2	Bahan dan kaedah	71
	3.2.1 Penyediaan eksplan	71
	3.2.2 Teknik aseptik	72
	3.2.3 Pensterilan eksplan	73
	3.2.4 Penyediaan media kultur	77
	3.2.5 Kesan hormon ke atas eksplan	78
	3.2.6 Kultur tunas berganda	79
	3.2.7 Penyediaan media pengakaran dan kajian pembentukan akar	79
	3.2.8 Percambahan plantlet secara *in vivo*	80
	3.2.9 Aklimatisasi dan pemindahan ke rumah hijau	80
3.3	Keputusan	82
	3.3.1 Sumber eksplan	82
	3.3.2 Kaedah pensterilan	83
	3.3.3 Pengkulturan eksplan ke atas media permulaan	85
	3.3.4 Kesan hormon ke atas eksplan	87
	3.3.5 Kultur tunas berganda	90
	3.3.6 Kajian NAA terhadap pembentukan akar	99
	3.3.7 Regenerasi tumbuhan lengkap	100
	3.3.8 Pemindahan plantlet lengkap ke tanah	100
	3.3.9 Aklimatisasi *in vivo*	100
3.4	Perbincangan	112
	3.4.1 Pemilihan sumber eksplan	112
	3.4.2 Langkah pensterilan	115
	3.4.3 Pengkulturan ke atas media	118
	3.4.4 Aklimatisasi dan penanaman ke rumah hijau	125

TAJUK **MUKASURAT**

BAB 4 ANALISA RAPD

4.1 Pengenalan 129

4.2 Bahan dan kaedah 131

4.2.1 Penyediaan sampel 131

4.2.2 Pengekstrakan DNA 131

4.2.3 Elektroforesis gel 133

4.2.4 Spektrofotometer 133

4.2.5 'Random Amplified Polymorphic DNA' (RAPD) 134

4.2.5.1 Parameter 'Polymerase Chain reaction' (PCR) 134

4.2.5.2 Pengskrinan primer-primer 135

4.2.5.3 Analisa data RAPD 137

4.2.5.4 Kelompok spesies menggunakan 'Ward's Method' 137

4.3 Keputusan 138

4.3.1 Ekstrak dan isolasi DNA 138

4.3.2 'Random Amplified Polymorphic DNA' (RAPD) 139

4.3.2.1 Pengskrinan primer 139

4.3.2.2 Profil RAPD 145

4.3.2.3 Analisa data 145

4.4 Perbincangan 150

4.4.1 Ekstrak DNA 150

4.4.2 RAPD 154

4.4.2.1 Parameter optima PCR 154

BAB 5 PERBINCANGAN AM DAN KESIMPULAN

5.1 Perbincangan am 163

5.2 Kesimpulan 169

RUJUKAN **171**

LAMPIRAN **192**

SENARAI JADUAL

TAJUK		MUKASURAT
Jadual 1	Taburan dan kegunaan spesies-spesies kajian secara am	8
Jadual 2	Morfologi rizom yang digunakan di dalam kajian secara am dan ukuran berdasarkan yang ditanam di Rimba Ilmu, universiti Malaya dan MARDI Perak	9
Jadual 3	Ringkasan kandungan komposisi kimia genus *Curcuma*	16
Jadual 4	Sebahagian daripada kajian kultur *in vitro* spesies-spesies famili Zingiberaceae yang telah berjaya menghasilkan tumbuhan lengkap	22
Jadual 5	Tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat Melayu sebagai ubatan tradisional untuk aktiviti antimikrob	37
Jadual 6	Beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteria	40
Jadual 7	Pengenalan am kepada kumpulan bakteria yang digunakan dalam kajian.	42
Jadual 8	Media kultur untuk pertumbuhan bakteria	43
Jadual 9	Ciri-ciri ekstrak krud spesies kajian	46
Jadual 10	Ukuran (mm) diameter perencatan ekstrak spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria kajian	47
Jadual 11	Nilai MIC ekstrak *C. inodora* aff. berbanding kawalan	52
Jadual 12	Genus bakteria yang sering berasosiasi dengan tumbuhan	67
Jadual 13	Faktor-faktor eksplan yang dikaji	71
Jadual 14	Jenis media yang digunakan dalam kajian	78
Jadual 15	Tinggi tunas pucuk yang digunakan sebagai sumber eksplan	82
Jadual 16	Pemerhatian terhadap ciri-ciri eksplan yang dikaji	83
Jadual 17	Purata bilangan pucuk dan akar bagi setiap eksplan di dalam media MSO	85

TAJUK		MUKASURAT
Jadual 18	Kesan hormon terhadap respons kehadiran pucuk berganda	88
Jadual 19	Perbandingan parameter spesies kajian *in vivo* dan *in vitro* selepas berusia 12 bulan di rumah hijau	110
Jadual 20	Parameter yang diuji untuk RAPD-PCR	135
Jadual 21	Jujukan primer yang digunakan dalam kajian	136
Jadual 22	Hasil DNA menggunakan 2 protokol ekstaksi berbeza	138
Jadual 23	Ketulenan DNA spesies-spesies kajian.	139
Jadual 24	Nilai peratus persamaan genetik spesies-spesies kajian	146
Jadual 25	Nilai komponen 1 dan 2 pada analisa plot komponen	119

SENARAI RAJAH

TAJUK		MUKASURAT
Rajah 1	Illustrasi tiub-tiub yang diatur untuk mendapatkan nilai MIC	53
Rajah 2	Peringkat-peringkat pengakaran dan aklimitasi plantlet secara ringkas	81
Rajah 3	Hasil kultur dari 3 kaedah pensterilan yang berbeza	84
Rajah 4	Purata bilangan pucuk, akar, daun dan panjang pucuk spesies kajian yang berusia 6 minggu pada media optima 3.0 mg/l BAP. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	93
Rajah 5	Purata bilangan pucuk, daun dan akar serta tinggi pucuk pada usia 6 minggu untuk *C. aeruginosa* pada kepekatan BAP yang berbeza. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	94

TAJUK		MUKASURAT
Rajah 6	Purata bilangan pucuk, daun, akar dan tinggi pucuk, pada usia 6 minggu untuk *C. mangga* pada kepekatan BAP yang berbeza. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	94
Rajah 7	Purata bilangan pucuk, daun, akar dan tinggi pucuk pada usia 6 minggu untuk *C. rubescens* pada kepekatan BAP yang berbeza. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	95
Rajah 8	Purata bilangan pucuk, daun, akar dan tinggi pucuk, pada usia 6 minggu untuk *C. xanthorrhiza* pada kepekatan BAP yang berbeza. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	95
Rajah 9	Purata bilangan pucuk, daun, akar dan tinggi pucuk pada usia 6 minggu untuk *C. zedoaria* pada kepekatan BAP yang berbeza. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	96
Rajah 10	Purata bilangan pucuk, daun, akar dan tinggi pucuk pada usia 6 minggu untuk *C. inodora* aff. pada kepekatan BAP yang berbeza. Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	96
Rajah 11	Bilangan pucuk dan akar spesies kajian setiap subkultur (1-4). Bar mewakili sisihan piawai, n = 10.	97
Rajah 12	Perbandingan hasil *in vitro* dan *in vivo* spesies kajian yang diukur selepas 12 bulan di tanam di rumah hijau	109
Rajah 13	Keputusan profil RAPD menggunakan primer OPA dan OPE	141
Rajah 14	Dendogram spesies-spesies kajian berdasarkan 'Ward's Methods'	147
Rajah 15	Analisa plot komponen yang dihasilkan melalui kaedah 'Ward's Methods' yang menunjukkan pengasingan kepada 3 kumpulan spesies kajian menerusi ekstrak daripada 2 komponen	148

SENARAI PLAT

TAJUK		MUKASURAT
Plat 1	*Curcuma aeruginosa*	11
Plat 2	*Curcuma mangga*	11
Plat 3	*Curcuma rubescens*	12
Plat 4	*Curcuma xanthorrhiza*	12
Plat 5	*Curcuma zedoaria*	13
Plat 6	*Curcuma inodora* aff.	13
Plat 7	Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *M. luteus*	48
Plat 8	Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *S.aureus* 24213	49
Plat 9	Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *S. aureus* 29213	50
Plat 10	Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *E.faccalis*	51
Plat 11	Nilai MIC untuk *C. inodora* aff. terhadap bakteria *S. aureus* 29213	55
Plat 12	Disk kawalan terhadap bakteria *S. aureus* 29213	55
Plat 13	Nilai MIC untuk *C. inodora* aff. terhadap bakteria *M. luteus*	56
Plat 14	Disk kawalan terhadap bakteria *M. luteus*	56
Plat 15	Penyediaan eksplan spesies kajian	72
Plat 16	Eksplan pada media asas	78
Plat 17	Kadar perkembangan tumbuhan kultur MSO	86
Plat 18	Bilangan penghasilan pucuk berganda bagi MSO dan media yang dirawat dengan BAP	86

TAJUK		MUKASURAT
Plat 19	Dua jenis tunas berusia 2 minggu yang terhasil dari eksplan tunas pucuk	87
Plat 20	Kesan penggunaan hormon terhadap penghasilan pucuk berganda pada usia 4 minggu	89
Plat 21	Bilangan maksimum pucuk berganda *C. mangga* yang terhasil menggunakan media optima	92
Plat 22	Kesan penggunaan hormon NAA yang berbeza keatas pertumbuhan akar	99
Plat 23	Pemindahan plantlet ke rumah hijau	102
Plat 24	Kadar tumbesaran *C. aeruginosa* di rumah hijau	103
Plat 25	Hasil *in vitro C. aeruginosa*	104
Plat 26	Hasil *in vitro C. mangga*	105
Plat 27	Rizom *C. rubescens* yang dihasilkan secara *in vitro* dan *in vivo*	106
Plat 28	Hasil *in vitro C.xanthorrhiza*	107
Plat 29	Tumbuhan lengkap *C. inodora* aff. yang dihasilkan melalui kaedah *in vitro*	108
Plat 30	Hasil profil RAPD menggunakan primer OPA dan OPE	

SENARAI SINGKATAN KATA

:	= nisbah
%	= peratus
°C	= darjah celcius
β	= beta
μg	= mikrogram
μg/tiub	= mikrogram per tiub
μg/μl	= mikrogram per mikroliter
μM	= mikro molar
μl	= mikro liter
b/i	= berat per isipadu
BA	= benzyladenine
BAP	= 6-benzylaminopurine
bp	= pasangan bes
CTAB	= cetyltrimethylammonium bromide
dH_2O	= air suling steril
DNA	= asid deoksiribonukleik
dNTP	= Deoksiribonukleosida trifosfat
EDTA	= asid etilinadiamina tetra-asetik
g	= gram
g/ml	= gram per milliliter
$HgCl_2$	= merkurik klorida
i/i	= isipadu per isipadu
kg	= kilogram
kg/m^2	= kilogram per meter persegi
m	= meter
mA	= mili ampere
mg	= miligram
mg/l	= miligram per liter

mg/ml	= miligram per mililiter
$MgCl_2$	= magnesium klorida
MIC	= Minimum Inhibitory Concentration
ml	= mililiter
mm	= milimeter
mM	= mili molar
MS	= Murashige and Skoog
MSO	= Media MS tanpa hormon
M.W	= berat molekul
NAA	= asid α-naftalenaasetik
NaCl	= natrium klorida
NaOCl	= sodium hipoklorit
ng	= nanogram
O.D	= ketumpatan optic
OPA	= Oligo Polymerase A
OPE	= Oligo Polymerase E
OPX	= Oligo Polymerase X
PCR	= 'Polymerase chain reaction'
pmol	= pikomol
PVP	= polyvinylpyrrolidone
RAPD	= 'Randomly Amplified Polymerase DNA'
rpm	= putaran per minit
sm	= sentimeter
TE	= Tris-EDTA
Tris-HCl	= Tris asid hidroklorik
units/µl	= unit per mikroliter
uv	= ultra ungu/ ultra lembayung
V	= volt