

a711460 HH

**KAJIAN ANALISA RAPD, PENGSKRINAN ANTIBAKTERIA  
DAN MIKROPROPAGASI KE ATAS SPESIES-SPESES HALIA  
UBATAN TERPILIH.**

**MOHD AZMI BIN MUDA**

**UNIVERSITI MALAYA  
(2005)**

②

**KAJIAN ANALISA RAPD, PENGSKRINAN ANTIBAKTERIA DAN  
MIKROPROPAGASI KE ATAS SPESIES-SPESIES HALIA UBATAN  
TERPILIH.**

**OLEH**

**MOHD AZMI BIN MUDA  
INSTITUT SAINS BIOLOGI  
FAKULTI SAINS  
UNIVERSITI MALAYA**

**TESIS INI DISERAHKAN UNTUK  
IJAZAH SARJANA SAINS  
UNIVERSITI MALAYA  
KUALA LUMPUR  
(2005)**

Perpustakaan Universiti Malaya



A511904755

## PENGHARGAAN

*Syukur kehadiran Ilahi kerana limpah kurnia dan rahmatNya akhirnya saya dapat menyempurnakan kajian dan penulisan saya ini.*

*Jutaan terima kasih kepada dua orang penyelia saya yang dikagumi iaitu Profesor Dr. Halijah Ibrahim dan Profesor Madya Dr. Norzulaani Khalid kerana banyak memberikan bantuan, sokongan, nasihat dan tunjuk ajar sepanjang kajian dijalankan serta mendorong saya dalam menyiapkan tesis ini.*

*Sekalung penghargaan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar di atas bantuan kewangan 'National Science Fellowship' (1999-2001) dan kepada Unit Pengurusan R&D di atas bantuan jangka pendek (Vot F 2000&2001).*

*Ucapan terima kasih juga terhadap kesemua ahli makmal bioteknologi tumbuhan terutamanya 'Ginger Group' iaitu Kak Linda dan Azma. Segala tenaga dan sokongan yang dicurahkan daripada kalian semua selama ini amat dihargai. Tidak lupa juga ucapan terima kasih saya kepada rakan-rakan seperjuangan yang lain yang turut membantu pada awal kajian saya iaitu CD, Ayie, Keri, Kak Di, Kak Yan dan Kak Yati serta semua sahabat handai, kakitangan ISB dan semua yang menjayakan penyelidikan ini.*

*Kepada ayahanda dan bonda, Allahyarham Muda bin Chik, Che Hazizah Che Yusof dan keluarga, terima kasih di atas galakan dan sokongan moral kalian semua. Tanpa restu dan doa kalian tidak mungkin saya dapat menyiapkan tesis ini dengan sempurna.*

*Akhir sekali penghargaan yang tak terhingga kepada isteri tercinta, Rosmaniza Mat Rahim yang banyak memberikan galakan sepanjang penyelidikan dan penulisan tesis ini. Tidak lupa kepada tiga orang cahaya mata Nur Faiezatul Husna, Muhammad Adib Al-Wafi dan Muhammad Atif Luqman yang banyak memberikan inspirasi kepada saya.*

## ABSTRAK

Variasi genetik di antara lima spesies dan dua varieti halia ubatan terpilih telah dikaji menggunakan teknik 'Randomly Amplified Polymorphism DNA' (RAPD). Analisa DNA diperolehi daripada profil-profil RAPD yang dihasilkan dengan menggunakan 20 primer rawak di mana profil-profil tersebut dapat menentukan polimorfisme dan hubungan antara spesies-spesies kajian. Sebanyak 16 primer yang digunakan telah berjaya mengesan polimorfisme dan telah digunakan di dalam analisa kelompok dengan menggunakan kaedah "Ward's method" untuk menentukan hubungan genetik antara spesies-spesies kajian tersebut. Sebanyak tiga kumpulan spesies dapat diasingkan melalui analisa ini dan spesies *K. galanga* didapati sebagai spesies 'outgroup'. Kajian antibakteria juga dilakukan dengan menggunakan ekstrak krud daripada bahagian rizom spesies-spesies kajian. Ekstrak krud tersebut didapati dapat menghalang pertumbuhan bakteria gram-positif *Staphylococcus aureus* (strain ATCC24213 dan ATCC29213) dengan menggunakan teknik "Paper disc diffusion assay". Manakala tiada spesies yang didapati mempunyai aktiviti terhadap bakteria gram negatif (*Escherichia coli*; strain ATCC25922 and ATCC35213). Dalam kajian mikropropagasi pula, media MS yang ditambah dengan pelbagai kepekatan hormon BAP digunakan. Purata tiga hingga lima pucuk daripada satu eksplan berjaya dihasilkan untuk kesemua spesies kajian di dalam media MS yang mengandungi 3.0% (b/i) sukros, 0.2% (b/i) fitagel dan kepekatan BAP yang rendah (0.5-3.0 mg/l). Kesemua spesies kajian menunjukkan peningkatan dari segi tinggi pokok, bilangan 'tiller', luas daun, bilangan daun dan berat segar rizom apabila dibandingkan dengan tanaman kawalan yang ditanam di lapangan.

## ABSTRACT

The genetic variation among five species and two varieties of selected medicinal gingers was first studied using Randomly Amplified Polymorphism DNA (RAPD) technique. Analysis was carried out on the RAPD profiles generated by 20 types of arbitrary primer to determine genetic polymorphism and relationships between varieties and species. Sixteen primers were used in the cluster analysis developed by Ward's Method to determine genetic relationships. This study successfully grouped the species investigated into three groups and *K. galanga* Linn. as an outgroup. Crude extracts from rhizomes of all species studied were investigated for antibacterial activities. These extracts significantly inhibited the growth of gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ; strains ATCC24213 dan ATCC29213) using "Paper disc diffusion assay" method. None of the plant extracts inhibited the growth of gram-negative bacteria (*Escherishia coli*; strains ATCC25922 and ATCC35213). Micropropagation study was also carried out using the MS medium with different concentrations of BAP. On the average three to five shoots per explant for all species studied were successfully regenerated on MS medium supplemented with 3.0% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) phytagel and low concentrations of BAP (0.5-3.0 mg/l). Field evaluation showed almost all species studied have increased in shoot length, number of tillers, leaf area, number of leaf and fresh rhizomes weight per plant when compared to the control.

## ISI KANDUNGAN

TAJUK	MUKASURAT
JUDUL	i
PENGHARGAAN	ii
ABSTRACT	iii
ABSTRAK	iv
ISI KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI PLAT	xii
SENARAI RAJAH	xvi
SENARAI LAMPIRAN	xviii
SENARAI SINGKATAN KATA	xx

### BAB 1 PENGENALAN

1.1	Pengenalan am famili Zingiberaceae	1
1.2	Huraian ringkas spesies-spesies kajian	6
1.2.1	<i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> Rosc (halia)	6
1.2.2	<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> Theilade (halia bara)	9
1.2.3	<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> Theilade (halia padi)	11
1.2.4	<i>Z. zerumbet</i> Smith	12
1.2.5	<i>Z. ottensii</i> Valetton	14
1.2.6	<i>Z. montanum</i> (Koenig) Theilade	15
1.2.7	<i>K. galanga</i> Linn	17
1.3	Kepentingan komersil halia biasa ( <i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> )	18
1.4	Penganalisan jalur DNA melalui kaedah RAPD	23
1.5	Kandungan bahan-bahan kimia keluarga halia	30
1.6	Tumbuhan dan ciri-ciri antimikrobial	32
1.7	Kajian kultur tisu dan kepentingannya	39

## ISI KANDUNGAN

TAJUK	MUKASURAT
1.8 Kajian mikropropagasi ke atas famili Zingiberaceae	44
1.9 Strategi kajian	49
1.10 Objektif kajian	49
1.11 Hipotesis kajian	50
1.12 Spesies-spesies kajian	51
<b>BAB 2 ANALISA DNA SPESIES-SPESIES KAJIAN MELALUI RAPD</b>	
2.1 Pengenalan	56
2.2 Bahan dan kaedah	59
2.2.1 Pengekstrakan DNA	59
2.2.2 Analisa penanda RAPD	61
2.2.3 Analisa kelompok	64
2.3 Keputusan	66
2.3.1 Pengekstrakan DNA	66
2.3.2 Analisa penanda RAPD	68
2.3.3 Hubungan genetik melalui analisa kelompok	90
2.4 Perbincangan	97
<b>BAB 3 AKTIVITI ANTIBAKTERIA</b>	
3.1 Pengenalan	107
3.2 Bahan dan kaedah	109
3.2.1 Sumber sampel kajian	109
3.2.2 Penyediaan sampel ekstrak krud	109
3.2.3 Bakteria ujian dan penyediaan media	110
3.2.4 Penyediaan 'assay' bakteria	112
3.2.5 Ujian semi-kuantitatif aktiviti antibakteria	112

## ISI KANDUNGAN

TAJUK	MUKASURAT
3.3 Keputusan	116
3.3.1 Penentuan berat sampel ekstrak	116
3.3.2 Penentuan diameter zon perencatan bakteria	119
3.4 Perbincangan	123

### **BAB 4       PENYEDIAAN PROTOKOL KAJIAN MIKROPROPAGASI**

4.1 Pengenalan	128
4.2 Bahan dan Kaedah	131
4.2.1 Sumber eksplan	131
4.2.2 Teknik pensterilan	132
4.3 Keputusan	133
4.3.1 Sumber eksplan	133
4.3.2 Teknik pensterilan	137
4.4 Perbincangan	142

### **BAB 5       KAJIAN MIKROPROPAGASI KE ATAS SEMUA SPESIES KAJIAN**

5.1 Pengenalan	151
5.2 Bahan dan kaedah	154
5.2.1 Sumber eksplan dan teknik pensterilan	154
5.2.2 Penyediaan media	155
5.2.3 Pengkulturan eksplan ke atas media	156
5.2.4 Penentuan julat kepekatan hormon BAP untuk penggandaan pucuk	157



## ISI KANDUNGAN

TAJUK	MUKASURAT
5.2.5 Pengkulturan ke atas media optima	158
5.2.6 Penyediaan media untuk pengakaran	158
5.2.7 Aklimatisasi plantlet bagi penghasilan rizom di lapangan	159
5.3 Keputusan	161
5.3.1 Penentuan eksplan yang sesuai	161
5.3.2 Pengkulturan eksplan ke atas media permulaan	169
5.3.3 Penentuan media penggandaan pucuk pada kepekatan BAP yang berlainan	171
5.3.4 Penggandaan pucuk dan akar pada media optima	190
5.3.5 Perbandingan hasil antara spesies <i>in vitro</i> dan kawalan di lapangan	192
5.4 Perbincangan	205
<b>BAB 6 PERBINCANGAN KESELURUHAN KAJIAN</b>	220
<b>KESIMPULAN</b>	233
<b>RUJUKAN</b>	235
<b>LAMPIRAN</b>	253

**Senarai Jadual****Mukasurat**

1.1	Keluasan tanaman halia ( <i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> ) dan pengeluaran halia seluruh dunia. [FAO database (Food and Agriculture Organization of the United Nation)]	21
1.2	Kelebihan dan kekurangan teknik penanda molekul yang digunakan pada masa kini	25
2.1	Kit A 20 primer (kit 10-mer primer –Operon Technologies Inc.) yang berjujukan rawak dan mempunyai kandungan G+C antara 60% hingga 70%	63
2.2	Purata bacaan ketulenan dan kepekatan DNA yang diperolehi daripada biofotometer	67
2.3- 2.18	Profil DNA dihasilkan daripada primer OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-16, OPA-18 dan OPA-20 yang diskor mengikut ada (1) dan tiada (0) jalur DNA untuk pencaman spesies-spesies kajian	70-85
2.19	Saiz fragmen jalur-jalur DNA yang dihasilkan dengan menggunakan primer-primer OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-16, OPA-18 dan OPA-20	86

<b>Senarai Jadual</b>	<b>Mukasurat</b>
5.1 Ketinggian tunas pucuk spesies-spesies kajian mengikut umur	165
5.2 Bilangan pucuk dan akar serta panjang maksimum pucuk dan akar yang dikulturkan di dalam media optima bagi setiap spesies kajian	191
5.3 Purata bilangan pucuk dan akar yang dihasilkan pada tiga subkultur di dalam media optima bagi tiap-tiap spesies kajian	191
5.4 Peratusan plantlet yang hidup setelah diaklimatisasikan selama sebulan di rumah hijau	195
5.5 Penilaian dan perbandingan beberapa parameter yang ditentukan (a-f) bagi spesies-spesies daripada kultur <i>in vitro</i> dan kawalan selepas 8 bulan ditanam di lapangan	196

**Senarai Plat****Mukasurat**

1.1	(a): <i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> (halia)	
	(b): Rizom <i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i>	52
1.2	(a): <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia bara)	
	(b): Rizom <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i>	52
1.3	(a): <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> Theilade (halia padi)	
	(b): Rizom <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> Theilade	53
1.4	(a): <i>Z. zerumbet</i>	
	(b): Rizom <i>Z. zerumbet</i>	53
1.5	(a): <i>Z. ottensii</i>	
	(b): Rizom <i>Z. ottensii</i>	54
1.6	(a): <i>Z. montanum</i>	
	(b): Rizom <i>Z. montanum</i>	54
1.7	(a): <i>K. galanga</i>	
	(b): Rizom <i>K. galanga</i>	55
2.1	Jalur-jalur DNA yang dihasilkan dengan menggunakan	
-2.16	primer OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-16, OPA-18 dan OPA-20 menerusi pengasingan melalui elektroforesis 1.5% gel agaros	70-85

- 3.1 Zon perencatan spesies *Z. officinale* var. *officinale* (halia) ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 119
- 3.2 Zon perencatan spesies *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara) ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 119
- 3.3 Zon perencatan spesies *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi) ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 120
- 3.4 Zon perencatan spesies *Z. zerumbet* ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 120
- 3.5 Zon perencatan spesies *Z. ottensii* ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 121
- 3.6 Zon perencatan spesies *Z. montanum* ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 121
- 3.7 Zon perencatan spesies *K. galanga* ke atas  
a) *S. aureus* (ATCC29213) dan  
b) *S. aureus* (ATCC24213) 122

**Senarai Plat****Mukasurat**

4.1	Tunas pucuk <i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> (halia) yang dipilih sebagai eksplan pada awal eksperimen	135
4.2	Jangkitan bakteria (bulatan) pada bahagian eksplan tunas pucuk dalam media kultur	140
4.3	Bakteria yang telah dipencilkan dan dilihat di bawah pembesaran 100X yang berbentuk kokus	140
4.4	Jangkitan kulat (bulatan) pada bahagian eksplan pucuk dalam media kultur	141
4.5	Kulat yang dipencilkan dan dilihat di bawah pembesaran 200X yang menunjukkan struktur hifa (H), sporangiofor (Sf), sporangium (Sm) dan spora (S)	141
5.1	Ketinggian tunas pucuk <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> Theilade (halia padi) yang dicatat	166
5.2	Penghasilan pucuk-pucuk terminal dan pucuk aksilari pada permulaan kultur di dalam media MSO	168
5.3	Penghasilan pucuk tunggal dan akar yang halus pada media kawalan (MSO)	176
5.4	Penghasilan pucuk-pucuk berganda di dalam media berkepekatan BAP yang rendah (0.5 – 3.0 mg/l) ( <i>K. galanga</i> )	177

**Senarai Plat****Mukasurat**

5.5	Penghasilan pucuk berganda pada media optima (2-3 minggu di dalam media)	178
5.6	Penghasilan pucuk berganda pada media optima (4-6 minggu di dalam media)	179
5.7	Penghasilan akar di dalam media pengakaran sebelum plantlet diaklimatisasikan di lapangan	180
5.8	Kesan kepekatan hormon BAP yang berlainan (K0-K7) ke atas pertumbuhan eksplan bagi <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia padi)	181
5.9	Kesan-kesan hormon BAP yang tinggi ke atas pertumbuhan eksplan di dalam media kultur	182
5.10	Spesies-spesies daripada <i>in vitro</i> yang berumur 1 bulan selepas aklimatisasi	198
5.11	Spesies-spesies daripada <i>in vitro</i> yang berumur 2 bulan selepas aklimatisasi yang menunjukkan pengeluaran 'tiller'(pucuk) yang baru	199
5.12	Perbandingan spesies daripada <i>in vitro</i> dan kawalan ( <i>in vivo</i> )	200
5.13	Spesies-spesies daripada <i>in vitro</i> yang baru dituai untuk pengiraan parameter-parameter berkaitan	201
5.14	Perbandingan hasil rizom spesies daripada <i>in vitro</i> dan kawalan	202

2.1	Dendrogram spesies-spesies kajian berdasarkan analisa binari jalur-jalur DNA. Terdapat tiga kumpulan yang berasingan (I,II dan III), berdasarkan daripada jarak 'Single Linkage' dan 'Squared Euclidean'	94
2.2	Analisa Prinsipal Komponen (PCA) menunjukkan kedudukan hubungan spesies-spesies kajian pada pengekstrakan prinsipal komponen pertama dan kedua berdasarkan data binari jalur-jalur DNA yang dihasilkan	95
5.1	Bilangan pucuk terminal dan aksilari yang dihasilkan pada permulaan kultur mengikut umur dan saiz eksplan bagi setiap spesies kajian pada akhir lapan minggu kultur	167
5.2	Purata bilangan pucuk (BP) dan akar (BA) serta nisbah bilangan akar:pucuk yang dihasilkan pada akhir 8 minggu kultur dalam media permulaan (MSO)	171
5.3	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> (halia) pada subkultur S1 hingga S4	183
5.4	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia bara) pada subkultur S1 hingga S4	184



**Senarai Rajah****Mukasurat**

5.5	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia padi) pada subkultur S1 hingga S4	185
5.6	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>Z. zerumbet</i> pada subkultur S1 hingga S4	186
5.7	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>Z. ottensii</i> pada subkultur S1 hingga S4	187
5.8	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>Z. montanum</i> pada subkultur S1 hingga S4	188
5.9	Kesan hormon BAP (kod media) ke atas penghasilan pucuk dan akar spesies <i>K. galanga</i> pada subkultur S1 hingga S4	189

**Senarai Lampiran****Mukasurat**

1	Bahan dan reagen-reagen yang digunakan dalam pengekstrakan DNA	253
2	Bahan-bahan yang digunakan dalam RAPD-PCR	254
3	Penyediaan bahan-bahan untuk pengekstrakan DNA	255
4	Elektroforesis gel agaros	257
5	Penyediaan bahan-bahan untuk elektroforesis	258
6	Pengukuran DNA	259
7	Kaedah penyediaan mini gel agaros	260
8	Penyediaan 'master mix' untuk kajian RAPD	261
9	Elektroforesis sampel DNA di dalam gel agaros	262
10	Komposisi media Murashige & Skoog (MS) (1962)	263
11	Teknik-teknik pensterilan eksplan yang digunakan dalam kajian kultur tisu	264
12	Gambarajah sumber-sumber eksplan yang digunakan pada awal eksperimen	267

13	Bilangan pucuk terminal dan pucuk aksilari yang dihasilkan pada permulaan kultur mengikut umur dan saiz eksplan bagi tiap-tiap spesies kajian	268
14	Purata bilangan pucuk dan akar setiap eksplan serta nisbah bilangan akar:pucuk yang dihasilkan setelah 8 minggu di dalam media permulaan (MSO).	269
15	Purata bilangan pucuk yang dihasilkan mengikut umur dan saiz eksplan yang digunakan	270

## Senarai singkatan kata

:	= nisbah
%	= peratus
°C	= darjah celcius
$\beta$	= beta
$\mu\text{g}$	= mikrogram
$\mu\text{g}/\text{tiub}$	= mikrogram per tiub
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	= mikrogram per mikroliter
$\mu\text{M}$	= mikromolar
$\mu\text{l}$	= mikroliter
b/i	= berat per isipadu
BA	= benzyladenine
BAP	= 6-benzylaminopurine
bp	= pasangan bes
CTAB	= cetyltrimethylammonium bromide
dH <sub>2</sub> O	= air suling steril
DNA	= asid deoksiribonukleik
dNTP	= Deoksiribonukleosida trifosfat
EDTA	= asid etilnadiamina tetra-asetik
g	= gram
g/ml	= gram per mililiter
i/i	= isipadu per isipadu
kg	= kilogram
kg/m <sup>2</sup>	= kilogram per meter persegi
m	= meter
mA	= mili ampere
mg	= miligram
mg/l	= miligram per liter
mg/ml	= miligram per mililiter

## Senarai singkatan kata

MgCl <sub>2</sub>	= magnesium klorida
ml	= mililiter
mm	= milimeter
mM	= mili molar
MS	= Murashige and Skoog
MSO	= Media MS tanpa hormon
M.W	= berat molekul
NAA	= asid $\alpha$ -naftalenaasetik
NaCl	= natrium klorida
NaOCl	= sodium hipoklorit
ng	= nanogram
O.D	= ketumpatan optik
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/ $\mu$ l	= unit per mikroliter
uv	= ultra ungu/ ultra lembayung
V	= volt
var.	= varieti