

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: ANALISIS ENZIM FENILALANINA AMMONIA LIASE
DALAM ANAK POKOK Vanda helvola

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS, DENGAN KEPUJIAN

SESI PENGAJIAN: 2004 - 2007

Saya NORASHRINA BINTI SU'UDI
 (HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.

4. **Sila tandakan (/)


SULIT

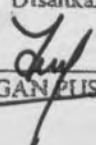
(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD


 (TANDATANGAN PENULIS)

Disahkan oleh

 (TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 790, JLN ADONG 2,
KG. PUJUT ADONG, 98000

DR. JUALANG AZLAN GANSAU
 Nama Penyelia

MIRI, SARAWAK.

Tarikh: 27.4.2007

Tarikh: 27.4.2007

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



ANALISIS ENZIM FENILALANINA AMMONIA LIASE DALAM ANAK
POKOK *Vanda helvola*

NORASHRINA BINTI SU'UDI

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

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

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

APRIL 2007



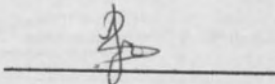
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

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

27 APRIL 2007

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH


NORASHRINA BINTI SU'UDI
HS2004-4438

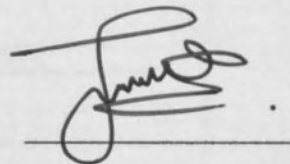


DIPERAKUKAN OLEH

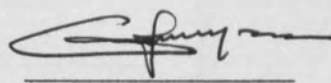
Tandatangan

1. PENYELIA

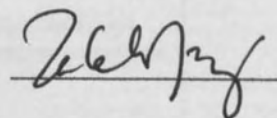
(DR. JUALANG AZLAN GANSAU)

**2. PEMERIKSA 1**

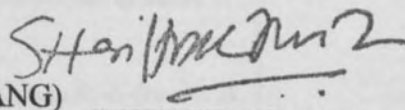
(DR. IVY WONG NYET KUI)

**3. PEMERIKSA 2**

(DR. ZALEHA ABDUL AZIZ)

**4. DEKAN**

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



PENGHARGAAN

Syukur ke hadrat ilahi dengan izin-Nya akhirnya dapatlah saya menyiapkan laporan projek atau disertasi ini dengan sempurna pada masa yang telah ditetapkan. Di kesempatan ini saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada pelbagai pihak yang telah banyak membantu saya untuk menyiapkan projek ini dengan jayanya. Segala dorongan, bantuan, cadangan dan teguran daripada anda sekalian adalah amat saya hargai.

Setinggi-tinggi penghargaan diucapkan kepada penyelia saya, Dr. Jualang di atas segala idea, tunjuk ajar, nasihat dan bantuan yang telah dihulurkan semasa saya menyiapkan projek tahun akhir ini di bawah penyeliaan beliau. Ucapan terima kasih ini juga saya tujukan kepada Kak Devina David yang telah banyak membantu saya sepanjang saya melakukan projek tahun akhir ini. Terima kasih juga kepada Abang Cyril Misong, Kak Hartinie, pembantu-pembantu makmal dan yang lain-lain yang sudi membantu saya di dalam makmal. Tidak lupa juga buat rakan-rakan seperjuangan yang telah banyak membantu dan meluangkan masa bersama-sama untuk menjayakan projek ini, segala jasa dan kenangan bersama akan tetap bersemadi dalam ingatan.

Buat ayah dan ibu yang tersayang, terima kasih kerana sudi bersama anakanda dalam susah dan senang dan juga dorongan yang telah diberikan sehingga anakanda dapat belajar sehingga ke tahap ini. Semoga Allah sahaja yang dapat membalas budi baik kalian selama ini.

NORASHRINA BINTI SU'UDI

HS2004-4438



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRAK

Aktiviti enzim fenilalanina ammonia liase (PAL) yang dijalankan pada daun eksplan anak pokok *in vitro* dan pokok yang sempurna bagi *Vanda helvola* dikaji untuk mengenalpasti variasi klon anak pokok dan pemilihan anak pokok yang elit terhadap penghasilan sebatian pewangi. Anak pokok *in vitro* dikulturkan pada media Vacin dan Went dengan 15% (v/v) air kelapa and 2% (w/v) sukrosa dalam keadaan $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ dan 24 jam pencahayaan fluoresen. Enzim PAL ini diekstrak daripada daun anak pokok dengan penggunaan larutan tris-hidroklorik dan 2-merkaptotanol. Teknik pengemparan pada 10,000 rpm selama 10 minit dilakukan untuk mendapatkan supernatan bagi menguji aktiviti enzim PAL pada bacaan absorban 290 nm. Kaedah Bradford pada bacaan absorban 595 nm menggunakan reagen Coomassie Brilliant Blue G-250. Jumlah sampel anak pokok yang dikaji adalah 100 anak pokok. Anak pokok yang ke-40 mempunyai nilai kepekatan protein 9.040 $\mu\text{g/ml}$ manakala anak pokok yang ke-39 mempunyai nilai kepekatan protein 4.388 $\mu\text{g/ml}$. Anak pokok yang mempunyai nilai kepekatan protein yang paling tinggi ialah anak pokok yang ke-65 dengan nilai kepekatan proteinnya ialah 25.105 $\mu\text{g/ml}$. Sampel anak pokok yang ke-40 mempunyai aktiviti total enzim yang paling tinggi iaitu 5.845 U namun aktiviti khusus enzim PALnya mempunyai nilai rendah iaitu 0.216 U/ μg berbanding sampel anak pokok yang lain. Aktiviti khusus sampel *Helvola* 1 mempunyai nilai aktiviti khusus yang paling tinggi iaitu 0.572 U/ μg dan aktiviti khusus enzim yang tertinggi didapati pada anak pokok ke-39 iaitu dengan nilai 0.352 U/ μg . Pemilihan variasi anak pokok elit yang ke-39 yang dikulturkan adalah yang terbaik. Hasil keputusan yang diperolehi menunjukkan terdapatnya variasi di antara sampel anak pokok yang telah dikulturkan. Kandungan aktiviti khusus enzim PAL yang tinggi pada anak pokok akan mempengaruhi dalam penghasilan sebatian pewangi bagi anak pokok.



ABSTRACT

The activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme on leaf explants of *in vitro* plantlets and intact plant of *Vanda helvola* were studied to identify the variation of clones and selection of elite plantlets related to fragrances production. The *in vitro* plantlets were cultured on Vacin and Went media supplemented with 15% (v/v) coconut water and 2% (w/v) sucrose in the condition of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and 24 hours fluorescence light. Enzyme extraction from plants use the method of tris-hydrochloric and 2-mercaptoethanol solution addition. Centrifugation techniques is been done at 10,000 rpm for 10 minutes to get the supernatants to test for activity PAL enzyme at absorbance of 290 nm. The Bradford method using Coomassie Brilliant Blue G-250 is been done at absorbance of 595 nm. Total number of plantlets that been studied are 100 plants. Plantlet numbered 40 has the protein concentration of value $9.040\ \mu\text{g}/\text{ml}$ meanwhile plantlet numbered 39 has the protein concentration value of $4.388\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Plantlet numbered 65 has the highest value of protein concentration which is $25.105\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Plantlet numbered 40 has the highest enzyme total activity which is 5.845 U but with low enzyme specific activity which is $0.216\ \text{U}/\mu\text{g}$. Enzyme specific activity for Helvola 1 sample have a value of $0.352\ \text{U}/\mu\text{g}$ and the highest value of enzyme specific activity is been found in sample number 39. The elite plant that been chosen that is plantlet numbered 39 show that there is a variation among the plantlet samples which have been cultured. The highest PAL enzyme specific activity will influence the production of the fragrance compound for the plants.



KANDUNGAN

Muka surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL	xiii
SENARAI SINGKATAN DAN UNIT	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	6
2.1 <i>Vanda helvola</i>	6
2.2 Enzim Fenilalanina Ammonia-Liase (PAL)	10
2.3 Aplikasi dan Fungsi Bagi Aktiviti Enzim Fenilalanina Ammonia Liase	12
2.4 Faktor-Faktor Mempengaruhi Keaktifan Fenilalanina Ammonia Liase	14
2.4.1 Cahaya	14
2.4.2 Suhu	15
2.4.3 Antibiotik	16
2.4.4 Faktor-faktor Lain	17
2.5 Laluan Sikimat	18
2.6 Laluan Fenilpropanoid	20



2.6.1	Biosintesis kompaun dalam laluan fenilpropanoid	20
2.6.2	Kepentingan fenilpropanoid terhadap pertanian dan kesihatan manusia	25
2.6.3	Penglibatan PAL dalam laluan fenilpropanoid membentuk sebatian kewangian	26
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH		29
3.1	Sumber Eksplan	29
3.2	Medium dan Rawatan Anak Pokok	30
3.3	Pengekstrakan Enzim	32
3.3.1	Pengekstrakan enzim PAL	32
3.4	Penentuan Kepekatan Protein	33
3.4.1	Kaedah Bradford	34
3.5	Pengujian Aktiviti Enzim	36
3.5.1	Pengujian aktiviti enzim PAL ke atas pengekstrakan daun <i>Vanda helvola</i>	36
BAB 4 KEPUTUSAN		38
4.1	Perkembangan Awal dalam Pengkulturan Anak Pokok	38
4.2	Keputusan Penentuan Bovine Serum Albumin (BSA) Piawai	41
4.3	Keputusan Penentuan Kepekatan Protein Bagi <i>Vanda helvola</i>	43
4.4	Keputusan Analisis Daun Anak Pokok	49
4.5	Penentuan Aktiviti Khusus Enzim Bagi <i>Vanda helvola</i>	57
BAB 5 PERBINCANGAN		64
5.1	Keadaan Pengkulturan Anak Pokok <i>Vanda helvola</i>	64
5.2	Penentuan Kepekatan Protein	66
5.3	Penentuan Aktiviti Total Enzim dan Aktiviti Khusus Enzim Fenilalanina Ammonia Liase daripada Anak Pokok	69
BAB 6 KESIMPULAN		74
RUJUKAN		76
LAMPIRAN		80



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Medium yang digunakan untuk pertumbuhan dan subkultur anak pokok	30
3.2 Ujian piawai (makro) Bradford	35
3.4 Ujian mikro Bradford	35
4.1 Keputusan penentuan BSA piawai	49
4.2 Pengelasan aktiviti khusus enzim PAL mengikut julat bagi anak pokok bermula dari nombor 1 hingga 100	62



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Pertukaran L-fenilalanina kepada asid trans-sinamik oleh enzim PAL	10
2.2 Laluan sikimat bagi biosintesis fenilalanina	19
2.3 Penglibatan enzim PAL dalam biosintesis beberapa sebatian fenolik daripada sikimat dan fenilalanina dalam laluan fenilpropanoid	21
2.4 Penglibatan PAL dalam laluan fenilpropanoid membentuk kompaun kewangian	28
4.1 Graf penentuan BSA piawai	42
4.2 Kandungan kepekatan protein bagi anak pokok bermula dari nombor 1 hingga 20.	44
4.3 Kandungan kepekatan protein bagi anak pokok bermula dari nombor 21 hingga 40.	45
4.4 Kandungan kepekatan protein bagi anak pokok bermula dari nombor 41 hingga 60.	45
4.5 Kandungan kepekatan protein bagi anak pokok bermula dari nombor 61 hingga 80.	46
4.6 Kandungan kepekatan protein bagi anak pokok bermula dari nombor 81 hingga 100.	46
4.7 Kandungan aktiviti total enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 1 hingga 20.	52
4.8 Kandungan aktiviti total enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 21 hingga 40.	52
4.9 Kandungan aktiviti total enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 41 hingga 60	53
4.10 Kandungan aktiviti total enzim bagi anak pokok bermula Dari nombor 61 hingga 80.	53



4.11	Kandungan aktiviti total enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 81 hingga 100	54
4.12	Kandungan aktiviti khusus enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 1 hingga 20.	57
4.13	Kandungan aktiviti khusus enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 21 hingga 40	58
4.14	Kandungan aktiviti khusus enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 41 hingga 60	58
4.15	Kandungan aktiviti khusus enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 61 hingga 80	59
4.16	Kandungan aktiviti khusus enzim bagi anak pokok bermula dari nombor 81 hingga 100	59



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 Bunga <i>Vanda helvola</i> yang sedikit kemerahan dan kekuningan	8
2.2 Pokok <i>Vanda helvola</i> yang berbunga	8
3.1 Spektrofotometer cahaya	80
4.1 Anak-anak pokok dalam piring Petri	39
4.2 Anak-anak pokok dalam kelalang kon	40
4.3 Pengkulturan anak pokok dalam keadaan 24 jam cerah	40
4.4 Larutan biru muda yang terbentuk dalam tiub pengemparan pada anak pokok yang ke-30	43
4.5 (A) Daun anak pokok yang telah dipotong untuk dianalisis	50
(B) Daun anak pokok yang sedang diekstrakkan	50
(C) Larutan ekstrak berwarna hijau dari daun yang telah diekstrakkan	50



SENARAI SIMBOL

$^{\circ}\text{C}$	Darjah Celsius
%	Peratus
x	Kali
=	Sama dengan



SENARAI SINGKATAN DAN UNIT

cm	Sentimeter
ml	Mililiter
g	Gram
mg	Miligram
mM	Milimolar
M	Molar
g/l	Gram per liter
µg/ml	Mikrogram per mililiter
N	Normaliti
UV	Ultraviolet
U	Unit
FeNaEDTA	ferum sodium ethylenediaminetetraasetik asid
HCl	Asid hidroklorik
NaOH	Natrium hidroksida
PAL	Fenilalanina ammonia-liase
OMT	O-methyltransferases
CHS	Chalcone synthase
CHI	Chalcone isomerase
C4H	coumarate hydroxylase



BAB 1

PENDAHULUAN

Orkid yang termasuk dalam golongan keluarga Orchidaceae merupakan keluarga yang terbesar di kalangan tumbuhan berbunga. Orkid merupakan tumbuhan monokotiledon dengan mempunyai antara 22,000 kepada 35,000 spesies di dalam 700 hingga 800 genera di seluruh dunia. Daripada jumlah anggaran di dunia iaitu antara 22,000 kepada 35,000 spesies, kira-kira 6,880 spesies orkid dijumpai di Asia tropika (Lian *et al.*, 2001).

Tumbuhan orkid boleh dijumpai di setiap pelosok dunia kecuali di kawasan kebanyakan gurun dan kawasan artik. Majoriti orkid boleh dijumpai dengan mudah di negara tropika yang sesuai dengan pertumbuhannya yang panas dan lembap dalam hutan tropika, contohnya di Malaysia. Semenanjung Malaysia, termasuk Sabah dan Sarawak adalah tempat kediaman kepada 3,000 spesies orkid yang aromatik dan eksotik yang telah dijumpai hari ini (Fadilah *et al.*, 2001). Kebanyakan spesies orkid adalah sangat cantik, menarik dan sangat diidamkan sehingga dianggap dan dihargai sebagai permata di dalam hutan. Famili Orchidaceae merupakan famili yang mempunyai pelbagai ciri di dunia dari segi warna, saiz, wangian, bentuk dan habitat. Meskipun orkid mempunyai pelbagai ciri



tersebut, orkid boleh dikenal pasti dan dikelaskan melalui perbezaan dari segi struktur dan bahagian pada bunga dan pokok.

Vanda adalah antara genera monopodial yang paling dikenali dan menarik serta boleh dijumpai di kebanyakan kawasan tropika di kawasan tanah rendah dan di kaki bukit. Genera *Vanda* mempunyai kira-kira 40 spesies monopodial orkid berasal daripada Asia tropika. *Vanda* telah banyak dijumpai di Thailand dan Filipina, dan dari lima spesies yang direkodkan dari Borneo, empat spesies telah dijumpai di Sarawak (Beaman *et al.*, 2001). Bagi *Vanda*, corak pertumbuhannya adalah monopodial. Tumbuhan monopodial mempunyai batang tunggal yang mana menghasilkan daun-daun baru pada hujung batang pokok orkid dan mempunyai potensi untuk pertumbuhan yang tidak terhad dan tidak berakhir (Yong, 1990). Tumbuhan monopodial adalah antara jenis tumbuhan yang senang untuk ditanam dan dipelihara memandangkan tumbuhan ini boleh menyesuaikan diri dengan pelbagai keadaan pertumbuhan.

Orkid ini adalah antara genera yang terpenting dalam orkid, memandangkan *Vanda sp.* merupakan genera yang paling banyak dijumpai dalam famili orkid. Oleh kerana itu, orkid ini telah lama menyumbang terhadap perkembangan dalam bidang penghibridan bagi menghasilkan bunga untuk pasaran bunga keratan tropika. Orkid ini menyukai cahaya yang terang untuk pertumbuhan dan dapat menyesuaikan diri dalam keadaan yang panas atau suhu yang sederhana. Wangian daripada bunga orkid mungkin mempunyai bau wangian yang harum dan ada sesetengah yang mempunyai bau yang busuk. Banyak spesies seperti *Dendrobiums* dan *Cymbidiums* menghasilkan wangian

yang sangat wangi, ini termasuklah dari spesies *Vanda*. Sebaliknya, spesies seperti *Bulbophyllums* dan *Oncidium*s menghasilkan bau yang busuk (Hodgson *et al.*, 1991).

Dalam kajian ini, spesies *Vanda helvola* adalah diperlukan sebagai sumber tumbuhan untuk menjalankan kajian ini. Bagi spesies orkid ini, iaitu *Vanda Helvola*, spesies ini telah dinamakan oleh Carl Blume di Rumphia pada 1849. Kebanyakan spesies ini adalah dalam bahaya dan semakin sukar ditemui berikutan pemusnahan habitatnya untuk tujuan pembangunan. Proses pertumbuhan bagi spesies orkid ini adalah sangat lambat menyebabkan spesies orkid ini mengalami kesukaran untuk mengekalkan kemandirian spesies. Gelaran *Vanda helvola* ini berasal dari Latin '*helvus*', yang bermaksud merah pudar atau muda coklat kemerahan. Nama spesifik yang diberikan tersebut merujuk kepada warna bunga berkenaan. Spesies ini tersebar dengan meluas di Semenanjung Malaysia, Sumatra, Jawa, Borneo, New Guinea dan Filipina. Di kepulauan Borneo, iaitu di Sabah, taburan habitat semula jadi bagi spesies orkid ini boleh dijumpai di kawasan gunung Kinabalu dan kawasan Tambunan. Spesies ini boleh tumbuh pada aras ketinggian di antara 400 dan 1,500 meter dari paras laut (Chan *et al.*, 1994).

Dalam projek ini, analisis terhadap sejenis enzim, iaitu fenilalanina ammonia liase (PAL) dijalankan ke atas spesies *Vanda helvola*. Sel-sel tumbuhan bergantung kepada tenaga kimia yang melalui tindak balas kimia di mana beribu-ribu tindak balas berkenaan adalah tetap dalam setiap sel. Tindak balas ini yang berlaku dalam tumbuhan adalah sesuatu yang mengagumkan. Ini melibatkan pembentukan kompaun untuk menghasilkan organel dan struktur yang lain di samping bahan-bahan kompleks yang dipanggil

metabolit sekunder yang berfungsi untuk melindungi tumbuhan daripada bakteria, kulat, serangga dan patogen dan berperanan penting dalam menghasilkan pigmen serta wangian dalam tumbuhan. Sel-sel tumbuhan mengawal laluan metabolisme melalui penghasilan mangkin yang sesuai, iaitu enzim, dalam kuantiti yang cukup apabila diperlukan (Salisbury, 1992).

Enzim sememangnya amat diperlukan dalam tumbuhan untuk menjalankan aktiviti biologinya. Tanpa enzim tidak akan ada hidupan. Enzim terbina daripada protein yang dihasilkan oleh sel hidup. Semua enzim yang telah diketahui sehingga sekarang merupakan protein. Substrat merupakan bahan yang ditindak balas oleh enzim bagi menghasilkan produk tertentu. Enzim adalah mangkin biologi yang terlibat dalam pemangkinan tindak balas benda-benda hidup dan bertindak sebagai mangkin organik yang dapat mengawal atur serta mempercepatkan tindak balas biokimia dalam sel. Hampir kesemua tindak balas yang berlaku dalam tumbuhan adalah lambat tanpa mangkin dan untuk itu, enzim adalah mangkin yang lebih spesifik dan berkuasa dari mana-mana ion logam atau bahan tak organik. Mangkin mempunyai kebolehan untuk mempercepatkan tindak balas jika ditambahkan kepada sistem tindak balas tertentu. Mangkin boleh terbahagi kepada dua iaitu enzim yang merupakan protein, dan mangkin lain yang bukan protein.

Enzim biasanya bertindak untuk mempercepatkan pelaksanaan tindak balas, tetapi penglibatannya berbeza, kerana enzim hanya memangkinkan tindak balas biologi, iaitu tindak balas yang ada hubungannya dengan gejala hidup. Sebaliknya, mangkin lain, yakni



yang bukan enzim, seperti aluminium dan zink, tidak terhad kepada tindak balas yang berkaitan dengan hidup. Sebagai protein, enzim merupakan makromolekul jika dibandingkan dengan mangkin bukan enzim yang merupakan mikromolekul. Tindakan enzim adalah spesifik dan setiap jenis enzim hanya akan bertindak balas dengan substrat yang tertentu sahaja. Enzim diperlukan hanya dalam kuantiti yang kecil sahaja tetapi sedikit enzim akan memungkinkan satu bilangan besar tindak balas biokimia yang sama. Keistimewaan enzim adalah enzim tidak boleh dimusnahkan selepas tindak balas biokimia selesai. Oleh kerana itu, enzim boleh digunakan berulang kali dan suhu optimum bagi tindak balas enzim biasanya ialah pada 37⁰C (Sihotang, 1984). Seperti mangkin lain dan walaupun enzim hanya terbentuk dalam sel yang hidup, enzim boleh diasingkan daripada sumbernya dan terus berfungsi secara in vitro.

Fenilalanina ammonia liase merupakan enzim yang penting dan amat diperlukan dalam sintesis organik. Enzim ini tidak memerlukan penglibatan kofaktor bagi menjalankan tindak balas. Oleh itu, analisis dan uji kaji projek ini melibatkan pengekstrakan enzim fenilalanina ammonia-liase (PAL) dan pengujian aktiviti enzim yang mana mempunyai kepentingan dan mempunyai aktiviti biologi dalam tumbuhan.

Berdasarkan uji kaji yang dijalankan, terdapat objektif yang ingin dicapai daripada uji kaji projek ini iaitu menganalisis aktiviti enzim fenilalanina ammonia liase (PAL) terhadap klon anak pokok *Vanda helvola* dan perkaitan PAL dalam membentuk sebatian wangian dan pigmentasi dalam laluan fenilpropanoid.



BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Vanda helvola*

Terdapat pelbagai penyebaran variasi pada warna orkid *Vanda Helvola*. Warna bagi bunga *Vanda helvola* adalah berubah-ubah mengikut kawasan habitatnya. Bunga bagi spesies ini yang dijumpai di Borneo mempunyai warna yang lebih kemerah-merahan berbanding yang dijumpai di Jawa Barat (Comber, 2001). Bagi orkid spesies ini, enam struktur asas bunga iaitu tiga sepal dan tiga kelopak bunga akan mengelilingi kolum yang mengandungi bahagian reproduktif tumbuhan. Sepal yang terletak di bahagian atas bunga dinamakan sebagai sepal dorsal dan selalunya berbeza dengan sepal lateral. Dorsal sepalnya berukuran 1.3-1.5 x 1.2 cm, manakala sepal lateral berukuran 1.6-1.8 x 1.3-1.5 cm dan petalnya berukuran 1.3-1.5 x 0.8-1.1 cm. Kolumnya pula berukuran 0.7-0.8 cm dan adalah tebal (Chan *et al.*, 1994).

Bahagian kelopak bunga yang bertentangan dengan sepal dorsal dinamakan labellum. Labellum merupakan bahagian kelopak bunga yang selalunya paling cantik dalam bunga orkid. Orkid spesies ini mengeluarkan sejenis aroma kewangian iaitu haruman 'rosy-floral'. Seperti kebanyakan bunga yang lain, spesies ini adalah biseksual



iaitu mempunyai kedua-dua bahagian pembiakan betina dan jantan (stamen, stil dan stigma), tetapi orkid adalah istimewa kerana kedua-dua bahagian pembiakan ini digabungkan dalam satu struktur dipanggil kolum (Yong, 1990). Ciri ini membezakan orkid ini daripada bunga lain. Batang spesies ini memanjang ke atas dengan berukuran lebih dari 100 cm, dan bahagian bawah batang dipenuhi oleh dedaunnya. Daunnya yang lebar adalah bersaiz 15-20 x 3.3-3.5 cm, melengkung dan dekat antara satu sama lain. *Vanda helvola* adalah spesies orkid herba epifit yang mempunyai akar yang kuat serta tebal. Epifit orkid ini tidak mengambil sumber makanan atau air daripada tumbuhan yang menyokongnya (Croix, 2000).

Epifit di sini merujuk kepada tumbuhan yang tumbuh di atas dan melekat pada tumbuhan hidup yang lain untuk sokongan. *Vanda helvola* memperoleh faedah daripada perhubungan ini kerana dengan tumbuh pada tumbuhan lain, spesies ini dapat mencapai kedudukan di mana cahaya pancaran adalah baik dan lazimnya spesies ini mendapat lebih cahaya berbanding jika spesies ini hidup atas tanah dan ini juga dapat mengurangkan persaingan. Spesies jenis monopodial ini tidak mempunyai rizom atau 'pseudobulb', oleh kerana itu spesies ini yang dapat menyesuaikan diri dalam masa keadaan yang kering mempunyai daun yang berisi sukulen (berair). Foto 2.1 dan Foto 2.2 menunjukkan ciri fizikal dan warna bunga *Vanda helvola*.

RUJUKAN

- Agarwal, G. P., Boer, L. D., Brandl, H., Dijkhuizen, L., Fuller, R. C., Gross, R. A., Hoke, H., Laufer, A., Lenz, R. W., Muller, R. & Syldatk, C. 1990. *Microbial Bioproducts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Baharudin Salleh (ptrj.).1987. *Patologi Tumbuhan*. Jil. 1. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Beaman, T. E., Wood, J. J., Beaman, R. S. & Beaman, J. H. 2001. *Orchids of Sarawak*. The Royal Botanic Garden, London.
- Beaudoin-Eagan, L.D. & Thorpe, T. A. 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology* **78**, ms. 438-441.
- Berger, R.G. 1995. *Aroma Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Bijay, K.S. 1999. *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New Jersey.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C. & Dixon, R. A. 2000. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*, **122**, ms. 107-116.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C.M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D. & Dudareva, N. 2004. Understanding in vivo benzenoid metabolism in *Petunia* petal tissue. *Plant Physiology* **135**, ms.1993–2011.
- Burden, D.W. & Whitney, D.B. 1995. *Biotechnology Proteins to PCR: A Course in Strategies and Lab Techniques*. Birkhauser Boston. United States of America.
- Cai, C., Xu, C. J., Li, X., Ferguson, I. & Chen, K. S. 2006. Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignification enzymes in loquat fruit flesh after harvest. *Postharvest Biology and Technology* **40** (2), ms. 163-169.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2003. *Biochemistry 4th edition*. Thomson Learning, United States of America.
- Chan, C. L., Lamb, A., Shim, P. S. & Wood, J. J. 1994. *Orchids of Borneo* Vol. 1. The Sabah Society & The Royal Botanic Gardens, London.



- Chen, C.Q., Belanger, R.R., Benhamou, N., Paulitz, T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**, ms. 13-23.
- Chen, M. J., Kumar, V. V., Lu, B.W. & Li, N. 2005. *Cis*- and *trans*-cinnamic acids have different effects on the catalytic properties of *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyases PAL1, PAL2, and PAL4. *Journal of Integrative Plant Biology* **47** (1), ms. 67-75.
- Collin, H. A. & Edwards, S. 1999. *Plant Cell Culture*. Springer, London.
- Comber, J. B. 2001. *Orchids of Sumatra*. The Royal Botanic Garden, London.
- Davies, K. M. 2004. *Phenylpropanoids*. Marcel Dekker, New Zealand.
- Dennis, D. T., Layzell, D. B., Lefebvre, D. D. & Turpin, D.H. 1997. *Plant Metabolism*. Addison Wesley Longman, England.
- El-Shora, H. M. 2002. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. *Plant Science* **162** (1), ms. 1-7.
- Eggum, O. L. 1970. The protein quality of cassava leaves. *British Journal of Nutrition* **24**, ms. 761-769.
- Fadilah Abdul Aziz, Zaharah Hasan, Rozlaily Zainol, Nuraini Ibrahim, Tan, S. L. & Hamidah Sulaiman. 2001. *Orchids: The Living Jewels of Malaysia*. Mardi, Malaysia.
- Fong, C. H. 1977. *Malaysian Flowers in Colour*. Tropical Press, Singapore.
- Greulach, V. A. & Adams, J. E. 1967. *Plants: An Introduction to Modern Botany*. John Wiley & Sons, London.
- Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, ms. 77-84.
- Hodgson, M., Paine, R. & Anderson, N. 1991. *Lets Guide to: Orchids of the World*. Griffin Press, London.
- Jarvis, A.P., Schaaf, O. & Oldham, N. J. 2000. 3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta* **212**, ms. 119-126.
- Kadiman Sihotang, 1984. *Asas Enzimologi*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.



- Kim, S. H., Kronstad, J. W. & Ellis, B. E. 2001. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry* **58** (6), ms. 849-857.
- Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M. & Dudareva, N. 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell* **13**, ms. 2333-2347.
- Kumar, A. & Ellis, B. E. 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry structure, expression, and evolution. *Plant Physiology* **127**, ms. 230-239.
- Leng, L. J., Hwang, W. M., & Chee Len, L. H. 2003. *Effects of different culture media on the growth of Aranda Barbara Bush*. Singapore.
- Lim, P. E. & Ang, T. T. 1988. *Prinsip dan Eksperimen Enzim*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Lim, P. E. & Ang, T. T. 1989. *Prinsip dan Eksperimen Metabolisme*. Dewan Bahasa dan Pustaka. Kuala Lumpur.
- Meek, C. R. & Bidlack, J. E. 2005. Arthropod population, Phenylalanine Ammonia Lyase activity, and fresh weight of Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) as affected by plant age and *Bacillus thuringiensis* treatment. *Academy Science* **85**, ms. 9-17.
- Nakamura, K., Matsubara, K., Watanabe, H., Kokubun, H., Ueda, Y., Oyama-Okubo, N., Nakayama, M. & Ando, T. 2006. Identification of *Petunia hybrida* cultivars that diurnally emit floral fragrances. *Scientia Horticulturae* **108**, ms. 61-65.
- Nishida, R., Tan, K. H., Wee, S. L., Hee, A.K.W. & Toong, Y. C. 2004. Phenylpropanoids in the fragrance of the fruit fly orchid, *Bulbophyllum cheiri*, and their relationship to the pollinator, *Bactrocera papayae*. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**, ms. 245-252.
- Orlova, I., Marshall-Col, A., Schnepf, J., Wood, B., Varbanova, M., Fridman, E., Blakeslee, J.J., Peer, W. A., Murphy A. S. 2006. Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *Plant Cell* **18** (12), ms. 58-75.
- O'Toole, J. C., Ludford, P.M. & Ozbun, J. L. 1977. Gas Exchange and Enzyme Activity During Leaf Expansion in *Phaseolus vulgaris* L. *New Phytologist* **78** (3), ms. 565-571.
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes*. Prentice Hall. London.



- Podstolski, A. J. & Brown, G. N. 1974. L-Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in *Robinia pseudoacacia* seedlings. *Plant Physiology* **54** (1), ms. 41-43.
- Rasmussen, S. & Dixon, R. A. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *American Society of Plant Physiologists* **11**, ms. 1537-1552.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W. 1992. *Plant Physiology*. Ed. ke-4. Wadsworth, California.
- Sharifah Hasnah Abdullah dan Zahrah Ahmad (ptrj.). 1987. *Pengenalan Anatomi Tumbuhan*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Street, H. E. & Cockburn, W. 1972. *Plant Metabolism*. Ed. ke-2. Pergamon Press, London.
- Tan, S. C. 1990. *Biokimia Tumbuhan Hijau*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Teo, C. K. H. 1985. *Native Orchids of Peninsular Malaysia*. Times Books International, Kuala Lumpur.
- Thompson, P., Bowsher, C. G. & Tobin, A. K. 1998. Heterogeneity of mitochondrial protein biogenesis during primary leaf development in barley. *Plant Physiology* (118) ms. 1089-1099.
- Uritani, I. 1999. Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **40**, ms. 177-183.
- Verdonk, J. C., Verhoeven, H. A., Haring, M. A., Tunen, A. J. V. & Schuurink, R. C. 2003. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* **62**, ms. 997-1008.
- Verdonk, J. C., Haring, M. A., Tunen, A. J. V. & Schuurink, R. C. 2005. Odoranti regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* **17**(5), ms. 1612-1624.
- Wood, J. J., Beaman, R. S. & Beaman, J. H. 1993. *The Plants of Mount Kinabalu 2: Orchids*. Royal Botanic Gardens, London.
- Yong, H. S. 1990. *Orchid Portraits*. Tropical Press, Singapore.
- Zheng, H. Z., Cui, C. L., Zhang, Y. T., Wang, D. & Kim, Y. 2005. Active changes of lignification-related enzymes in peppe *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University Science* **6** (8), ms. 778-786.