

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: ANALISIS ENZIM FENILALANINA AMMONIA LIASE

DALAM ANAK POKOK Vanda dearei

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

SESI PENGAJIAN: 2004-2007

Saya ELDA NURAFNIE BINTI IBNU RASID

(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

Disahkan oleh

  
(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: Lot-96, Friendship Garden 3,  
Petagas, Putatan, 88200,

DR. JUALANG AZLAN GANSAU

Nama Penyelia

Kota Kinabalu, Sabah.

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 dearei*

ELDA NURAFNIE BINTI IBNU RASID

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

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

APRIL 2007

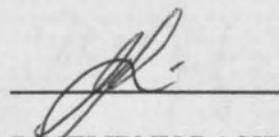


UMS  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**PENGAKUAN**

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

**27 APRIL 2007**



**ELDA NURAFNIE BINTI IBNU RASID**

**HS2004-3186**

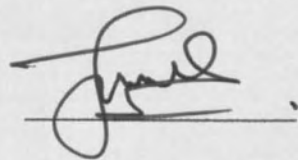


**DIPERAKUKAN OLEH**

## Tandatangan

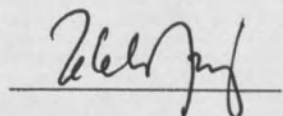
1. PENYELIA

(DR. JUALANG @ AZLAN GANSAU)



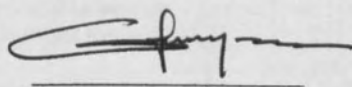
2. PEMERIKSA 1

(DR. ZALEHA ABDUL AZIZ)



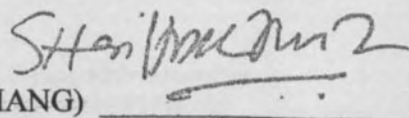
3. PEMERIKSA 2

(DR. IVY WONG NYET KUI)



4. DEKAN

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



## PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang maha pemurah lagi maha mengasihi. Alhamdulillah syukur ke Hadrat Ilahi yang memberikan petunjuk, kekuatan, kesabaran dan kesihatan sepanjang berjalannya Projek Tahun Akhir ini.

Setinggi-tinggi penghargaan kepada pihak Universiti Malaysia Sabah (UMS), khususnya Sekolah Sains dan Teknologi (SST) kerana telah memberikan peluang bagi menjalankan penyelidikan untuk Projek Tahun Akhir sebagai memenuhi sebahagian syarat untuk memperoleh segulung Ijazah Sarjana Muda Sains dalam bidang Bioteknologi. Ucapan terima kasih buat kedua ibu-bapa yang dikasihi, Rosneh Marie dan Ibnu Rasid Epit dan adik-adik yang tersayang Mohd Shahrul Ehsyan dan Mohd Zul Fauzan yang senantiasa memberikan dorongan dan sokongan serta mendoakan kejayaan saya selama ini.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada penyelia Projek saya iaitu Dr. Jualang Azlan Gansau di atas dedikasi dan segala tunjuk ajar yang diberikan oleh beliau. Terima kasih juga kepada beliau atas dorongan, idea, nasihat, serta bantuan yang telah dihulurkan sepanjang projek ini berjalan. Jutaan terima kasih buat semua pensyarah kursus khasnya Prof. Ho Choy Choke, Prof. Kamaruzzaman Ampon, Dr. Zaleha Abdul Aziz, Dr. Roziah Hj Kambol, Dr. Vijay Kumar, Dr Micheal Wong, Dr. Ivy Wong Nyet Kui dan Dr Lee Ping Chin yang menjadi tulang belakang ke atas kejayaan pelajar-pelajar yang mengambil kursus ini.

Ucapan penghargaan ini juga ditujukan kepada Kak Devina David, Abang Cyril Misong, Kak Roslina Jawan, Kak Hartinie Mabawi, pembantu makmal dan pelajar-pelajar Pasca yang lain yang tidak jemu menghulurkan bantuan dan memberikan tunjuk ajar kepada saya sepanjang menduduki tahun akhir di universiti ini. Terima kasih dan syukur ke hadrat Illahi kerana telah menganugerahkan rakan-rakan yang telah banyak



membantu dan memberi dorongan selama tiga tahun saya berada di sini terutama sekali kepada Norashrina Su'udi, Razleen Raihan serta rakan-rakan seperjuangan yang telah mencerikan makmal tisu kultur khususnya Aslinda Kamal, Haza Hazri, Farrah Hatta, Nursyamimi, Keng Ah Wei, dan juga Yvonne. Juga tidak dilupakan Aizati Azlin, Norazila Saniman, Cheong Leng San, Michelle Udah dan rakan-rakan yang lain yang terlalu ramai untuk disebut di sini. Akhir sekali saya memohon semoga Allah S.W.T melimpahkan rahmatNya kepada kita semua. Amin.



## ABSTRAK

Analisis enzim PAL dilakukan dengan mengekstrak daun *Vanda dearei* bagi menentukan variasi elit klon anak pokok. Media Knudson dengan 20% (v/v) air kelapa dijadikan sebagai medium pengkulturan dalam persekitaran 24 jam cerah, pada suhu  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Ekstrak daun *V. dearei* dianalisa dengan menguji aktiviti enzim dan kepekatan protein ditentukan dengan menggunakan kaedah Bradford. Penyediaan ekstrak dilakukan melalui penghomogenan daun dengan 0.5M Tris-Hidroklorik dan 0.01 M 2-Merkaptoetanol. Ujian aktiviti enzim dan penentuan kepekatan protein dilakukan ke atas supernatan yang diperolehi. Penentuan kepekatan enzim dilakukan dengan menggunakan Reagen Bradford dan absorbans dicatatkan pada jarak gelombang 595nm. Kepekatan diperolehi dengan merujuk kepada lengkung piawai BSA. Sebanyak 100 sampel anak pokok *V. dearei* yang dianalisa. Aktiviti spesifik ditentukan setelah kepekatan dan aktiviti total enzim diperolehi. Daripada 100 sampel tersebut, didapati aktiviti spesifik enzim adalah maksimum pada anak pokok ke-55, 0.2314 U/ $\mu\text{g}$  diikuti dengan anak pokok ke-5, 0.21242 U/ $\mu\text{g}$ , ke-41, 0.22602 U/ $\mu\text{g}$  dan seterusnya ke-34, 0.20335 U/ $\mu\text{g}$ . Aktiviti ini dipengaruhi oleh faktor persekitaran dan faktor genetik. Data yang diperolehi menunjukkan ada variasi pada aktiviti enzim bagi setiap sampel yang diuji. Variasi klon anak pokok melalui analisis enzim dapat dikenalpasti yang berupaya dalam menghubungkan aktiviti enzim dengan laluan sebatian pewangi sekaligus menentukan anak pokok yang menghasilkan bunga yang wangi bagi kajian seterusnya.



## ABSTRACT

In order to identify variation of elite clones, analysis on PAL enzyme activity was carried out on *Vanda dearei* leaves. Sample was cultured in Knudson media in the condition of 24 hours of bright day illumination (fluorescence light) at a constant temperature of  $25\pm 2$  °C. The extract leaves was analyzed by enzyme assay and protein estimation which referred to Bradford method. The leaves of *V. dearei* were initially homogenized with 0.5M Tris-Hydrochloric and 0.01 M 2-Mercapethanol. Enzyme assay and protein estimation was tested on supernatant. About 100mM Tris and 50mM L-phenylalanine added for enzyme assay. Coomassie Blue Reagent was used to efficiently estimate the protein. The absorbance was taken at 595nm wavelength which then compared to the BSA standard curve. The specific activity was determined within the 100 chosen samples as the value of protein concentration and its total activity obtained. The identified best clones with maximum specific activity were found in sample 55, 0.2314 U/ $\mu$ g followed by sample 5, 0.21242 U/ $\mu$ g, sample 41, 0.22602 U/ $\mu$ g and sample 34, 0.20335 U/ $\mu$ g. This activity greatly influenced by the environment and genetic factor. The variation of clone can be determined by enzyme analysis in order to relate it with fragrance pathway which consequently enables the selection of the best samples with fragrance for further research.





## KANDUNGAN

|                                      | Muka Surat |
|--------------------------------------|------------|
| PENGAKUAN                            | ii         |
| PENGESAHAN                           | iii        |
| PENGHARGAAN                          | iv         |
| ABSTRAK                              | vi         |
| ABSTRACT                             | vii        |
| KANDUNGAN                            | viii       |
| SENARAI JADUAL                       | xii        |
| SENARAI RAJAH                        | xiii       |
| SENARAI FOTO                         | xvi        |
| SENARAI SIMBOL                       | xviii      |
| <br>                                 |            |
| <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>             | <b>1</b>   |
| <br>                                 |            |
| <b>BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN</b>     | <b>4</b>   |
| 2.1 Sampel tumbuhan kajian           | 4          |
| 2.1.1 Orchidaceae                    | 4          |
| 2.1.2 <i>Vanda sp.</i>               |            |
| 2.1.3 <i>Vanda dearei</i>            | 6          |
| 2.1.4 Perkembangan Orkid di Malaysia | 9          |
| 2.1.5 Daun sebagai sumber enzim PAL  | 13         |
| 2.1.6 Enzim                          | 14         |
| 2.2 Fenilalanina Ammonia-Liase       | 18         |
| 2.2.1 Ciri-ciri enzim PAL            | 18         |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.2 Fungsi dan kepentingan enzim PAL              | 19        |
| 2.2.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi keaktifan PAL | 20        |
| 2.3 Fenilalanina (Substrat)                         | 23        |
| 2.4 Laluan Fenilpropanoid                           | 26        |
| 2.4.1 Flavonoid                                     | 29        |
| 2.4.2 Lignin  | 33        |
| 2.5 Sebatian Pewangi melalui laluan fenilpropanoid  | 36        |
| 2.5.1 Latar belakang kajian sebatian pewangi        | 36        |
| 2.5.2 Kajian Biosintesis                            | 37        |
| 2.5.3 Kepentingan laluan                            | 41        |
| 2.6 Nutrien dalam medium Knudson C (1946)           | 43        |
| 2.7 Spektrofotometri                                | 47        |
| 2.8 Penganggaran Protein                            | 48        |
| <b>BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH</b>                       | <b>50</b> |
| 3.1 Sumber Sampel                                   | 50        |
| 3.2 Media Knudson (1946)                            | 51        |
| 3.2.1 Penyediaan Stok Makro dan Mikro               | 51        |
| 3.2.2 Penyediaan Stok FeNa EDTA                     | 51        |
| 3.2.3 Penyediaan Media                              | 54        |
| 3.3 Subkultur                                       | 55        |
| 3.3.1 Pensterilan alatan untuk pengkulturan         | 55        |
| 3.3.2 Pengkulturan sampel                           | 56        |
| 3.4 Pengambilan sampel                              | 57        |
| 3.5 Pengekstrakan Protein                           | 59        |
| 3.5.1 Menyediaan Stok larutan penimbal Tris HCl     | 59        |
| 3.5.2 Penyediaan Stok larutan 2-Mercapethanol       | 59        |
| 3.5.3 Penyediaan Stok larutan Fenilalanina          | 60        |



|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 3.5.4        | Pengekstrakan Sampel   | 60        |
| 3.6          | Penganggaran kepekatan protein   | 62        |
| 3.6.1        | Penyediaan Stok Reagen Bradford  | 62        |
| 3.6.2        | Penganggaran Protein   | 62        |
| 3.7          | Ujian aktiviti enzim   | 64        |
| 3.8          | Penentuan keseluruhan aktiviti enzim   | 65        |
| <b>BAB 4</b> | <b>KEPUTUSAN</b>   | <b>67</b> |
| 4.1          | Perkembangan awal dalam pengkulturan anak pokok <i>Vanda dearei</i>                | 67        |
| 4.2          | Penentuan Protein dengan Kaedah Bradford   | 70        |
| 4.3          | Analisis Aktiviti Enzim Terhadap Ekstrak Daun <i>Vanda dearei</i>                  | 77        |
| 4.3.1        | Keputusan Analisis Aktiviti Total Enzim Bagi Sampel<br>Daun <i>Vanda dearei</i>    | 81        |
| 4.3.2        | Keputusan Analisis Aktiviti Spesifik Enzim Bagi Sampel<br>Daun <i>Vanda dearei</i> | 87        |
| <b>BAB 5</b> | <b>PERBINCANGAN</b>  | <b>94</b> |
| 5.1          | Pengkulturan dan Pengekstrakan   | 94        |
| 5.2          | Pengekstrakan Sampel   | 95        |
| 5.3          | Penentuan Kepekatan Protein  | 98        |
| 5.4          | Ujian Aktiviti Enzim PAL   | 99        |
| 5.5          | Faktor-faktor yang mempengaruhi Aktiviti Enzim                                     | 103       |
| 5.6          | Pemilihan Anak Pokok <i>Vanda dearei</i> dan Perkaitan dengan<br>Sebatian Pewangi  | 107       |



|                         |            |
|-------------------------|------------|
| <b>BAB 6 KESIMPULAN</b> | <b>112</b> |
| <b>RUJUKAN</b>          | <b>115</b> |
| <b>LAMPIRAN</b>         | <b>122</b> |



**SENARAI JADUAL**

| No. Jadual  | Muka Surat |
|---|------------|
| 2.1 Hibrid yang menggunakan baka <i>V. dearei</i>   | 12         |
| 3.1 Jadual-jadual elemen-elemen dalam media Knudson C (1946)  | 53         |
| 3.2 Bahan-bahan yang ditambah bagi pengekstrakan sampel   | 61         |
| 3.3 Penyediaan larutan Ujian Protein (Mikro) bagi memplotkan Lengkuk piawai dalam penentuan kepekatan protein | 64         |
| 4.1 Bacaan BSA ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan bacaan daya penyerapan Protein BSA pada jarak gelombang 595nm         | 70         |
| 4.2 Pengelasan sampel anak pokok (1-60) mengikut kadar aktiviti spesifik Enzim                                | 92         |
| 4.3 Pengelasan sampel anak pokok (61-100) mengikut kadar aktiviti spesifik enzim                              | 93         |



## SENARAI RAJAH

| No. Rajah   | Muka Surat |
|---|------------|
| 2.1 Enzim PAL mengkatalisis tindak balas pendeaminan fenilalanina kepada asid t-sinamik   | 18         |
| 2.2 Biosintesis fenilalanina daripada sikimat   | 23         |
| 2.3 Biosintesis fenilalanina dari kitar Calvin dan Sikimat  | 25         |
| 2.4 Biosintesis Fenilpropanoid  | 27         |
| 2.5 Struktur Flavonoid  | 29         |
| 2.6 Biosintesis flavonoid melalui laluan fenilpropanoid   | 31         |
| 2.7 Biosintesis Lignin  | 34         |
| 2.8 Pembentukan sebatian pewangi pada laluan fenilpropanoid   | 38         |
| 2.9 Prinsip penganalisis dan sistem optik SPECTRONIC 20<br>(Lim & Ang)  | 47         |
| 2.10 Prinsip dalam spektrofotometer bagi mengukur daya penyerapan sesuatu sampel  | 47         |
| 4.1 Graf penentuan BSA piawai   | 71         |
| 4.2 Kepekatan protein ( $\mu\text{g/ml}$ ) melawan nombor sampel pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi pokok pertama sehingga ke-20. | 73         |
| 4.3 Kepekatan protein ( $\mu\text{g/ml}$ ) melawan nombor sampel pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi pokok ke-21 sehingga ke-40.   | 73         |
| 4.4 Kepekatan protein ( $\mu\text{g/ml}$ ) melawan nombor sampel pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi pokok ke-41 sehingga ke-60.   | 74         |



- 4.5 Kepekatan protein ( $\mu\text{g/ml}$ ) melawan nombor sampel pada anak pokok yang besar (10-15cm) bagi pokok ke-61 sehingga ke-80. 74
- 4.6 Kepekatan protein ( $\mu\text{g/ml}$ ) melawan nombor sampel pada anak pokok yang besar (10-15cm) bagi pokok ke-81 sehingga ke-100 dan anak pokok induk. 75
- 4.7 Aktiviti total enzim Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah,  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi sampel ke-1 hingga ke-20 81
- 4.8 Aktiviti total enzim Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah,  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi sampel ke-21 hingga ke-40 82
- 4.9 Aktiviti total enzim Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah,  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi sampel ke-31 hingga ke-60 82
- 4.10 Aktiviti total enzim Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah,  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang besar (10-15cm) bagi sampel ke-61 hingga ke-80. 83
- 4.11 Aktiviti total enzim Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah,  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang besar (10-15cm) bagi sampel Ke-81 hingga ke-100 dan anak pokok induk. 83
- 4.12 Aktiviti spesifik Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi sampel pertama sehingga ke-20. 88
- 4.13 Aktiviti spesifik Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi sampel ke-21 sehingga ke-40. 88
- 4.14 Aktiviti spesifik Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah  $25\pm 2$  °C pada anak pokok yang kecil (5-10cm) bagi sampel ke-41 sehingga ke-60. 89
- 4.15 Aktiviti spesifik Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah,



|      |   |    |
|------|---|----|
|      | 25±2 °C pada anak pokok yang Besar (10-15 cm) bagi pokok ke-61 sehingga 80.   | 89 |
| 4.16 | Aktiviti spesifik Fenilalanina ammonia-liase pada 24 jam cerah, 25±2 °C pada anak pokok yang Besar (10-15 cm) bagi sampel ke-81 sehingga ke-100 dan anak pokok induk. | 90 |



## SENARAI FOTO

| No. Foto  | Muka Surat |
|---|------------|
| 2.1 Bunga <i>Vanda dearei</i> yang mempunyai warna kekuning-kuningan  | 8          |
| 2.2 Pokok <i>Vanda dearei</i> di 'Lagud Sebrang' daerah Tenom, Sabah  | 8          |
| 3.1 Salah satu daripada kultur <i>Vanda dearei</i>  | 58         |
| 4.1 Anak Pokok <i>Vanda dearei</i> yang dikulturkan dalam Petri dan bekas   | 68         |
| 4.2 Pokok <i>Vanda dearei</i> yang sesuai untuk dianalisa   | 69         |
| 4.3 Pengkulturan anak pokok pada keadaan 24 jam cerah dengan bekalan fluorescen 18 watt   | 69         |
| 4.4 Penentuan kepekatan protein bagi ekstrak sampel   | 74         |
| 4.5 Anak pokok <i>Vanda dearei</i> kecil (A) dan anak pokok <i>Vanda dearei</i> besar (B) yang telah dipotong untuk dianalisis. | 78         |
| 4.6 Daun yang dipotong untuk diekstrak dari anak pokok yang kecil (A) dan besar (B) yang beratnya $0.1 \pm 0.02$ g              | 78         |
| 4.7 Hasil ekstrak daun yang terpilih <i>Vanda dearei</i> (A) dan (B).   | 79         |
| 4.8 Hasil ekstrak dalam tabung empar (A) dan hasil pengemparannya (B)   | 79         |

- 4.9 Hasil larutan untuk analisis aktiviti enzim, tabung uji kawalan (A), tabung uji yang ditambah substrat fenilalanina (B). 80



## SENARAI SIMBOL

|       |  |
|-------|--|
| cm    | sentimeter   |
| g/L   | gram per liter   |
| L     | liter  |
| M     | molar  |
| mM    | milimolar  |
| mg/L  | milligram per liter                                      |
| mg/ml | milligram per milliliter                                 |
| ml    | milliliter   |
| w/v   | berat per isipadu  |
| v/v   | isipadu per isipadu                                      |
| %     | peratus  |
| °C    | darjah celcius   |
| DNA   | asid deoksiribonukleik                                   |
| PAL   | Fenilalanina Ammonia-Liase                               |
| BAMT  | S-adenosil-L-Met:benzoik asid karboksil metiltransferase |
| SAMT  | S-adenosil-L-metionin: asid salisiklik metiltransferase  |
| CHS   | Kalkon sintase   |
| IEMT  | S-adenosil-L-Met(iso)eugenol O-metil-transferase         |
| C4L   | hidroksisimat: CoA ligase                                |
| C4H   | Kumarat hidrosilase                                      |
| CHI   | Kalkon isomerase   |
| 2-ME  | 2-Merkapetanol   |
| t-CA  | <i>trans</i> -sinamik                                    |



## BAB 1

### PENDAHULUAN

Di serata Malaysia, terdapat pelbagai jenis spesies tumbuh-tumbuhan yang tumbuh subur yang membawa nilai yang berbeza pada setiap jenisnya. Berbanding dengan tumbuh-tumbuhan yang lain, Orkid merupakan salah satu spesies tumbuh-tumbuhan yang membawa nilai yang boleh dikomersilkan, dan hingga sekarang, segala usaha telah diperhebatkan untuk tujuan tersebut. Setakat ini, jenis Orkid yang diketahui adalah berbeza menurut penemu-penemunya, namun secara universal, diperkirakan jumlah jenis Orkid di dunia adalah lebih kurang 35,000 jenis. Daripada rangkaian yang dibuat, keluarga Orkid dikatakan salah satu daripada keluarga tumbuhan berbunga yang terbesar dan tergolong dalam kategori tumbuhan paling berhasil di dunia. (Hodgson, 1991).

Majoriti daripada tumbuhan eksotik (Orkid) ini terdapat di Malaysia. Semenanjung Malaysia, Sabah dan Sarawak adalah tempat tinggal bagi lebih kurang 3,000 spesies yang dijumpai adalah menarik dan spesies ini terdapat pada kuantiti dan variasi yang banyak yang lazimnya terdapat pada altitud 1,000 dan 6,000 kaki dari paras laut (Fadilah *et al.*, 2001). Borneo telah lama menjadi tumpuan bagi para saintis untuk



membuat kajian memandangkan tempat ini kaya dengan pelbagai spesies floranya iaitu pelbagai jenis famili dan genera tumbuh-tumbuhan berbunga. Famili Orkid (Orchidaceae) dianggarkan sebanyak 2500 hingga 3000 spesies di Borneo, iaitu 10% daripada jumlah spesies di seluruh dunia. Borneo mempunyai pelbagai jenis spesies *Vanda* dan salah satunya ialah *Vanda dearei*, sebagai sumber yang baik yang terdapat Malaysia. (Hans *et al.*, 2004).

*Vanda dearei* merupakan tumbuhan orkid yang besar, dan memiliki warna bunga yang kekuning-kuningan serta haruman yang kuat. Spesies ini berbunga sepanjang tahun dan merupakan spesies bunga yang tidak kurang anggunnya berbanding yang spesies-spesies yang lain yang menjadikannya sebagai orkid yang digemari. *Vanda dearei* ditanam untuk menghasilkan hibrid yang boleh mewarisi warna kuningnya (Chan *et al.*, 1994). Pada dewasa kini, aktiviti-aktiviti manusia terhadap habitat semulajadinya telah mengakibatkan spesies ini semakin pupus. Tambahan itu juga, banyak koleksi bunga ini dilakukan secara haram yang akhirnya menimbulkan masalah ini. Spesies *Vanda* ini telah disenaraikan pada Appendix II dalam CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*). Lantaran itu, adalah satu keperluan untuk memulihara spesies *Vanda* ini (Motes, 1997).

Kajian dilakukan berdasarkan aktiviti enzim Fenilalanina Ammonia Liase (PAL) yang terdapat pada spesies ini. Enzim PAL banyak dikaji dari segi metabolisme sekunder yang terlibat pada tumbuh-tumbuhan bagi menganalisa lignifikasi, pigmentasi, tindak balas terhadap serangan patogen dan sebagainya (El-Shora, 2002 ; Ritter & Schulz,



## RUJUKAN

- Aliah Abdul Rahim, Hasnah Mohamad & Noor'ashikin Selamat (ptrj.).1997. *Bioteknologi*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Amy & John. 1985. *Living with Orchids*. MPH Publication, Kuala Lumpur.
- Ballester, A. R., Lafuente, M. T. & Gonzalez-Candelas, L. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology* **39**, ms. 115-124
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Mimi, A., Naddler-Hassar, T., DoeRner P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J. & Elkin Y. 1994. Quantitative relationship between phenylalanine accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Plant Biology* **91**, ms. 7608-7612.
- 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
- Boudet A. M. 1998. A new view of lignification. *Trends Plant Sci.* **3**, ms. 67-71.
- Bonga, J. M & Aderkas, P. V.1992. *In Vitro Culture of Tress*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, ms. 248-254
- 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, N. & Reece J. 2002. *Biology 6<sup>th</sup> Edition*. Pearson education, San Francisco.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2003. *Biochemistry 4<sup>th</sup> edition*. Thomson Learning Inc., U.S.A.



- Chan, C. L., Lamb, A., Shim, P. S. & Wood, J. J. 1994. *Orchids of Borneo, Introduction and a Selection of Species*. The Sabah Society.
- 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.
- Conn, E. 2001. *Basic Biochemistry*. John Wiley & Sons Inc., U.S.A
- Cooper-Driver, G. A. 2000. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* **56**, ms. 229-236.
- D'Cunha, B., Satyanaravan, V. & Nair, P.M. 1996. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutini*. *Phytochemistry* **42**, ms. 17-20.
- Dennis, D. T., Layzell, D. B., Lefebvre, D. D. & Turpin, D.H. 1997. *Plant Metabolism*. Addison Wesley Longman, England.
- Dixon, R. A. & Paiva N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7**, ms. 1085-1097
- Dudareva, N., Murfitt L. M, Mann C. J., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C. M., Bonham C, Wood K. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell* **12**, ms. 949-961
- Dudareva, N., Pichersky E. 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology* **122**, ms. 627-633.
- El-Shora, H. M., 2002. Properties of Phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. *Plant Science* **162** (1), ms. 1-7.
- Engelsma, G. 1972. A possible role of divalent manganese ions in the photoinduction of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiology* **50**, ms. 599-602.
- Fadilah Abdul Aziz, Zaharah Hasan, Rozlailly Zainol, Nuraini Ibrahim, Tan, S. L. & Hamidah Sulaiman. 2001. *Orchids: The Living Jewels of Malaysia*. Mardi, Malaysia.
- Frank B. D. & Cleon D. 2002. *Getting Started with Proteins*. Oxford: IRL Press.
- Goodman, R. M. 2004. *Encyclopedia of Plant And Crop Science*, Marcel Dekkor, Inc.
- Godwin, L., 1996. *Analytical Techniques for Food and Agricultural Products*, VCH publisher Inc.



- Guterman, I., Shalit, M., Menda, N., Piestun, D., Dafny-Yelin, M., Shalev, G., Bar, E., Davydov, O., Ovadis, M. & Emanuel, M. 2002. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* **14** ms. 2325-2338
- Hahlbrock K. & Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **40**, ms. 347-369.
- Hans, P., Tengku Zainal Adlin & Waidi Sinun. 2004. *Maliau Basin Sabah's Lost World*, Natural History Publication Borneo.
- Hanxiao, J., Karl V. Wood, and John A. Morgan. 2005. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell* **6**, ms. 2962-2969
- Hodgson, M. 1991. *Let's Guide To The World Of Orchids*. Charles Letts (Scotland) Ltd.
- Hsiao, Y., Tsai, W., Kuoh, C., Huang, T., Wang, H., Wu T., Leu, Y., Cen, W., Chen, H. 2006. Comparison of transcription in *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce monoterpene biosynthesis pathway, *Plant Physiol.* **6** ms. 1471-2229
- Humphrey, J.M. & Chapple, C. 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Plant Biol.* **5**, ms. 224-229.
- Humphrey, J.M., Hemm, M.R. & Chapple, C. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate-5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, ms. 10045-10050.
- Jian Y., Peng-Fei, W., Wei-Fu, K., Qiu, H. P., Jing-Ming, Li. & Si-Bao, W. 2005. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia lyase, *Postharvest Biology and Technology* **40**, ms. 64-72
- Jian, Y., Peng-Fei, W., Wei-Fu, K., Qiu, H. P., Jing-Ming, Li. & Si-Bao, W. 2006. Changes and subcellular localizations of the enzymes, *Plant Physiology* **163**, ms. 115-127
- Jian-Ye, C., Peng-Fei, W., Wei-Fu, K., Qiu, H. P., Ji-Cheng, Z., Jing-Ming, Li., Si-Bao, W. & Wei-Dong, H. 2006. Effect of salicylic and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape. *Postharvest Biology and Technology* **40** (1), ms. 64-72.
- Jiang, C. D., Gao, H. Y., Zou, Q., Jiang, G. M. & Li, L. H. 2006. Leaf orientation photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybeans leaves against increase irradiance in field. *Environmental & Experimental Botany* **55**, ms. 87-96.
- Kearns, A. 2003. *Basic Plant Tissue Culture*. BIOS Scientific Publisher.





- Kim, S. H., Kronstad, J. W. & Ellis, B. E. 1996. Purification and characterization of phenylalanine ammonia lyase from *Ustilago maydis*. *Plant Science* **58** ms. 351-357
- 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.
- Kishor, R. P. S., Sha, V. K. & Sharma, G. J. 2006. Hybridization and in vitro culture of an orchid hybrid Ascocenda 'Kangla'. *Scientia Horticulture* **108**, ms. 66-73
- Koes, R., Verweij, W. & Quattrocchio, F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Plant Science* **10** (5), ms. 238-241
- Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M., and Dudareva, N. 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell* **13** ms. 2333-2347
- Kumar, U. 2003. *Methods in Plant Tissue Culture*, Agrobios India.
- Lee, S. C. & Liew, S. L. 2002. *Biologi STPM Jilid I*. Ed. Ke-2. Fajar Bakti Sdn. Bhd, Selangor Darul Ehsan.
- Lim, P. E. & Ang, T. T. 1988. *Prinsip dan Eksperimen Enzim*, Dewan bahasa dan pustaka, Kuala Lumpur.
- Luciana, D. V., Ricardo T. & Feria, D. 2005. In vitro propagation of Brazilian Orchids using tradisional culture media and commercial fertilizer formulations. *Agriculture* **27**, ms. 1-5.
- Manning J. C. & Goldblatt P. 2005. Radiation of pollination systems in the Cape Genus *Tritoniopsis* (Iridaceae: Crocoideae) and the development of bimodal pollination strategies. *Plant Science* **166**, ms. 459-474
- Matsui, T. 2004. Phenylalanine Ammonia Liase in Moso Bamboo Shoot: Molecular cloning and gene expression during storage, *Asian Journal Plant Science* **3**, ms. 315-319
- Merzlyak, M. N., Solovchenko, A. E. & Chivkunova, O. B. 2002. Pattern of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, ms. 679-684.
- Motes, M. R. 1997. *Vandas; Their Botany, History and Culture*. Timber Press, Inc. Hong Kong



- Nakamura, K., Matsubara, K., Watanabe, H., Kokubun, H., Ueda, H., Oyama-Okubo, N., Nakayama, M., Ando, T. 2006. Identification of *petunia hybrida* cultivars that diurnally emit floral fragrances, *Scientia Horticulturae* **108** ms. 61-65
- Negre, F., Kish, C. M., Boatright, J., Underwood, B., Shibuya, K., Wagner, C., Clark, D. G. & Dudareva, N. 2003. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in *Snapdragon* and *Petunia* flowers. *The Plant Cell* **15**, ms. 2992–3006.
- Nishida, R., Keng-Hong, T., Suk-ling W., Alvin Kah-Wei, Yock-Chai Thoong. 2003. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase. *Biochemical Systematics and ecology* **32**, ms. 245-252
- Osmond, P. B., Charles, H., Austin, P., Schrank, A. R., Orville, W., Robert, L., Gordon, W., John, J., Harold, C. B., Burke, H. Judd, Walter, K. L. & Irwin, S. 1964. *Principle of Biology 3<sup>rd</sup> Edition*. Harper & Row Publishers Incorporated.
- Pankaj, K. B., Toshiyuki, M., Haruo, S. and Yusuke, K. A .2003. Phenylalanine ammonia-lyase gene from asparagus: cDNA cloning, sequence and expression in response to wounding, *Plant Sciences* **2**, ms. 425-430
- Plummer, D. T. 1987. *Pengenalan biokimia amali*. Dewan Bahasa dan Pustaka.
- Porter, A. M. 1988. Effect of light intensity on the photosynthetic efficiency of Tomato plants. *Plant Physiology* **12**, ms. 225-253.
- Pott, M. B., Hippauf, F., Saschenbrecker, S., Chen, F., Ross., Kifer, Slusarenko Alan., Joseph P. Noel, Pichersky, E., Effmert, U., and Piechulla, B. 2004. Biochemical and structural characterisation of benzoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. *Plant Physiology* **135**, ms.1946-1955
- Ramussen, S. & Dixon, R. A. 1999. Transgene-mediated and elicitor induced perturbation of metabolic channelling at entry point into the phenylpropanoid pathway, *Plant Cell* **11**, ms. 1537-1552
- Rhodes, D. & Dudareva, N. 2004. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol.* **135**, ms. 1993–2011.
- Ritter H. & Schulz G. E. 2004. Structural basis for entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by PAL. *Plant cell* **17**, ms. 3426-3436
- Rosenberg, I. M. 1996. *Protein Analysis and Purification Benchtop Techniques*. Birkhauser Boston.
- Ross, K. 1999. The scent of orchids (Olfactory and chemical investigations). *Elsevier*, ms. 17-21



- Salisbury, F. B. & Ross, C. W. 1992. *Plant Physiology 4<sup>th</sup> Ed.* Wadsworth, California.
- Sihotang, K., 1984. *Asas Enzimologi.* Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Singh, A., M. Tamil S. & Rameshwar S. 1999. Sunlight induced pigmentation in maize vegetative tissue. *Experimental Botany* **339**, ms. 1619-1625
- Siti Hasmah Hj. Mohd. Ali. 1986. *Taman Orkid Kuala Lumpur.* Pejabat Perdana Menteri. <http://www.pmo.gov.my/WebNotesApp/IsteriPMMMain.nsf/13fe>
- Stewart, J. 1988. *Orchids.* Hamlyn Publishing, Hong Kong.
- Stocheck, C. M. 1990. Quantification of protein. *Method in Enzymology* **182**, ms. 50-69.
- Tan, S. C. 1990. *Biokimia Tumbuhan Hijau.* Dewan Bahasa dan pustaka, Kuala Lumpur.
- Tan, S. C. 1995. *Phenylalanine Ammonia-Lyase Inactivation System in Sunflower Leaf.* Cornell University.
- Theis, N. & Lerdau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Plant Science.* **164**, ms. 93-102.
- Trgiano, R. N. 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises 2<sup>nd</sup> Edition.* Boca Raton, London New York Washington, D.C.
- Tunen, R. C. S. 2003. Regulation of floral scent production in *Petunia* revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* **62**, ms. 997-1008.
- Vainstein A., Lewinsohn E., Pichersky E., and Weiss D. 2001. Floral fragrance, new inroads into an old commodity, *Plant Physiology* **127**, ms. 183-189
- Verdonk, J. C., Haring, M. A., Tunen, A. J. V. & Schuurink, R. C. 2005. Odorant regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* **17** (5), ms. 1612-1624.
- 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.
- Wen, P., Jian-Ye, C., Wei-Fu, K., Qiu-Hong, P., Si-Bao, W. & Wei-Dong, H. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* **169**, ms. 928-934
- Wolfgang, G. W. & Constabel, F. 1998. *Agricultural biotechnology.* Marcel Dekker, Inc., Saskatoon, Canada.



Young, H.S. 1990. *Orchid Portraits (Wild Orchids of Malaysia and Southeast Asia)*, Tropical press Sdn. Bhd, Malaysia.

Zaharah Hassan & Rozlaily Zainal. 1991. *Penanaman Orkid*. Institute penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia, (MARDI), Malaysia.

