

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: TRANSFORMASI LABISIA PUMILA DENGAN MENGGUNAKAN AGROBACTERIUM

RHIZOGENES.

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS DENGAN ICPUSIAN (KURSUS BIOTEKNOLOGI)

SESI PENGAJIAN: 2004/2005

Saya HAZA HAZRI ABD. HAMED

(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 hak milik 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

Ay

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Ay

DR. JUALANG AZLAN @ GANSAU

Nama Penyclia

Alamat Tetap: 3125 JLN TUAN HUSSIN, POKOK SENNA,

13200 KEPALA BATAS, PERAI UTARA, PINANG.

Tarikh: 25/4/07

Tarikh: 25/4/07

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).



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

007510008

**TRANSFORMASI *Labisia pumila* DENGAN MENGGUNAKAN
*Agrobacterium rhizogenes***

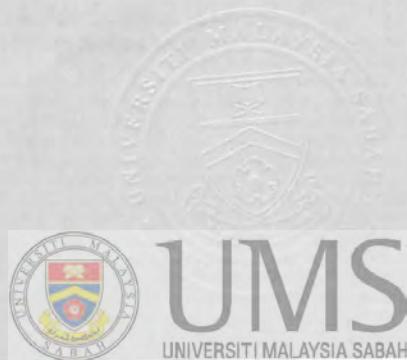
HAZA HAZRI ABD. HAMED

**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**

2007

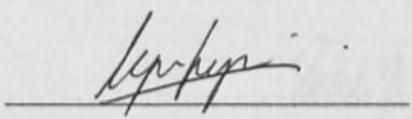


UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

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

24 APRIL 2007



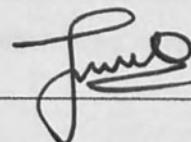
HAZA HAZRI BIN ABD HAMED
HS2004-1954



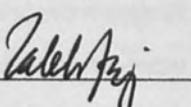
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERAKUAN PEMERIKSA**DIPERAKUI OLEH****Tandatangan****PENYELIA**

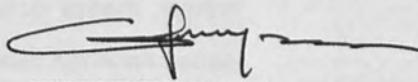
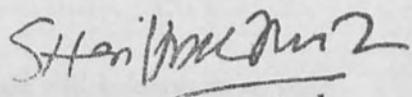
DR. JUALANG@AZLAN GANSAU

**PEMERIKSA 1**

DR. ZALEHA ABD. AZIZ

**PEMERIKSA 2**

DR. IVY WONG NYET KUI

**DEKAN**(SUPT. (K) PROF. MADYA DR. SHARIFF A. KADIR
S. OMANG)**UMS**
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang.

Alhamdulillah, bersyukur kepada Allah kerana dengan izinNya, saya telah berjaya untuk menyiapkan projek tahun akhir ini. Setinggi-tinggi penghargaan ingin saya tujukan khas kepada penyelia saya iaitu Dr. Jualang Azlan Gansau, di atas tunjuk ajar, dorongan serta nasihat yang telah diberikan bagi membolehkan saya menjayakan projek tahun akhir ini.

Jutaan terima kasih juga ingin saya tujukan kepada pelajar pascasiswa di Makmal Tisu Kultur UMS, terutamanya Cyril Misong yang tidak jemu-jemu memberi tunjuk ajar serta telah banyak membantu saya darisegi alatan makmal, sampel serta masa beliau. Ucapan terima kasih ini juga ditujukan kepada saudari Zurainizam Osman yang sentiasa memberikan sokongan yang tidak berbelah bahagi kepada saya.

Akhir sekali, penghargaan ini saya tujukan kepada ahli keluarga saya yang telah banyak memberikan sokongan dan dorongan darisegi moral mahupun kewangan. Tidak lupa kepada sahabat-sahabat terutamanya rakan-rakan Program Bioteknologi yang melakukan projek tahun akhir di Makmal Tisu Kultur UMS kerana telah banyak membantu saya sama ada secara langsung atau tidak langsung dalam menjayakan projek penyelidikan ini.

Tanpa kalian semua, sukar untuk saya menyiapkan projek tahun akhir ini. Jasa dan pengorbanan kalian semua tidak akan saya lupakan hingga ke akhir hayat. InsyaAllah. Sekian, terima kasih.

ABSTRAK

Kajian transformasi ke atas *Labisia pumila* var. *pumila* (Kacip Fatimah) menggunakan *Agrobacterium rhizogenes* strain TR105 dan A4GUS telah dilakukan ke atas bahagian nod dan internod bahagian batang *Labisia pumila*. Terdapat tiga objektif yang dikaji dalam kajian ini iaitu jenis eksplan, mencari bacaan ketumpatan optikal (OD) yang optimum dan jenis strain yang berbeza. Kesemua eksplan yang telah dicederakan terlebih dahulu kemudiannya diinokulasi di dalam larutan kultur sel terampai *Agrobacterium* pada bacaan OD yang ingin dikaji iaitu 0.4, 0.5 dan 0.6 bagi strain TR105 dan 0.5, 0.7 dan 0.9 bagi A4GUS selama 30 minit. Kemudian, kesemua eksplan dipindahkan ke dalam medium ko-kultivasi selama 6 hari sebelum dipindahkan ke medium MS dengan gandaan vitamin yang baru untuk fasa regenerasi. Dalam kajian ini, kawalan yang digunakan adalah eksplan yang diinokulasi dengan air suling yang telah disteril dan dikultur pada medium MS dengan gandaan vitamin. Tiga replikasi dilakukan dalam kajian ini. Bagi tujuan ujian Histokimia, *Agrobacterium* strain A4GUS telah digunakan. Keputusan kajian menunjukkan terdapat masalah pertumbuhan berlebihan *Agrobacterium* strain A4GUS pada eksplan yang diinokulasi pada bacaan OD₆₀₀ 0.5 dan OD₆₀₀ 0.7 berlaku selepas tempoh ko-kultivasi walaupun setelah empat kali basuhan dengan menggunakan antibiotik. Masalah ini telah menyebabkan ujian Histokimia tidak dapat dilakukan, sebaliknya, ujian Histokima yang dilakukan pada eksplan yang diinokulasi pada bacaan OD₆₀₀ *Agrobacterium* A4GUS 0.9 tidak menunjukkan sebarang keputusan tompokan biru. Tiada pembentukan akar rerambut tumbuh bagi eksplan yang ditransformasi dengan menggunakan strain TR105.



ABSTRACT

Transformation of *Labisia pumila* var. *pumila* (Kacip Fatimah) was performed by using two different strains of *Agrobacterium rhizogenes* which were TR105 and A4GUS. Type of explants, type of strains and the best OD reading of *Agrobacterium* growth were the three objectives studied in this experiment. All the explants had been wounded before inoculated in *Agrobacterium* culture with OD reading 0.4, 0.5 and 0.6 for TR105 strain and 0.5, 0.7 and 0.9 for A4GUS strain for 30 minutes. All the explants were removed onto co-cultivation medium for 6 days followed by transferring of explants onto fresh MS with double vitamin medium for regeneration phase. In this experiment, the explants that had been inoculated in sterilized distilled water and cultured on MS with double vitamin were used as control. Three trials of transformation were carried out for each type of explants with the same OD reading of each strain. For Histochemical test, *Agrobacterium* A4GUS was used. The result of this experiment was, there was overgrowth problems of *Agrobacterium* strain A4GUS occurred on all explants that have been inoculated with OD reading 0.5 and 0.7 after co-cultivation period although all the explants had been washed with antibiotic for forth time. Test of Histochemical could not be done on all the explants with overgrowth problems but for the explants that were inoculated at OD₆₀₀ 0.9, this test was carried out and showed negative result. There was no hairy root formation found on explants that were transformed with TR105 strain.



KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	ii
PERAKUAN PEMERIKSA	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI FOTO	xiii
SENARAI SARIKATA	xiv
SENARAI SINGKATN	xv
SENARAI UNIT DAN SIMBOL	xvi

BAB 1	PENDAHULUAN	1
BAB 2	ULASAN PERPUSTAKAAN	5
2.1	<i>Labisia pumila</i> (Kacip Fatimah)	5
2.2	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> TR105 dan A4GUS	10
2.3	Transformasi Menggunakan <i>Agrobacterium</i>	11
2.4	T-DNA	13
	2.4.1 Mekanisma transformasi T-NA ke dalam sel tumbuhan	15
2.5	Kaedah Lain Dalam Transformas	18
	2.5.1 Suntikan mikro	18
	2.5.2 Senapang biolistik	18



2.5.3	Elektroforasi	20
2.5.4	Kaedah kimia (Polyethylene glycol)	20
2.6	Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Kecekapan Transformasi	21
2.6.1	Pemilihan strain <i>Agrobacterium</i>	21
2.6.2	Jenis eksplan	22
2.6.3	Pertumbuhan <i>Agrobacterium</i>	23
2.6.4	Penyediaan inokulum	24
2.6.5	Infeksi eksplan	25
2.6.6	Tempoh ko-kultivasi	25
2.6.7	Kesan penambahan strain tidak bersifat onkogenik	27
BAB 3	BAHAN DAN KAEADAH	28
3.1	Senarai Peralatan Adalah Seperti Dalam Lampiran A	28
3.2	Penyediaan Larutan Stok MS (Murashige & Skoog, 1962)	28
3.2.1	Penyedian larutan makronutrien (10x) untuk 1 liter (L)	28
3.2.2	Penyediaan larutan mikronutrien (100x) untuk 1 liter (L)	29
3.2.3	Penyediaan larutan vitamin (10x) untuk 1 liter (L)	30
3.2.4	Penyediaan stok hormon BAP (1mg/mL)	31
3.3	Penyediaan Media Kultur	31
3.3.1	Penyediaan media agar MS dengan gandaan vitamin untuk proses propagasi <i>Labisia pumila</i>	31
3.3.2	Penyediaan media ko-kultivasi	33
3.4	Penyediaan Eksplan	33
3.4.1	Penyediaan eksplan bagi tujuan propagasi	33
3.4.2	Penyediaan eksplan bagi tujuan transformasi	33
3.5	Penyediaan <i>Agrobacterium rhizogenes</i> TR105 dan A4GUS	34
3.5.1	Penyediaan media <i>Yeast Mannitol</i> (YM) untuk pengkulturan <i>A.rhizogenes</i> TR105	34
3.5.2	Penyediaan media <i>Yeast Extract</i> (YE) untuk pengkulturan <i>A.rhizogenes</i> A4GUS	35
3.5.3	Penyediaan koloni tunggal <i>A.rhizogenes</i> TR105 dan A4GUS	36

3.5.4 Penyediaan <i>A.rhizogenes</i> TR105 dan A4GUS bagi tujuan inoculasi	36
3.6 Transformasi Eksplan Dengan Menggunakan <i>A. rhizogenes</i> TR105	37
3.6.1 Inokulasi dan ko-kultivasi	37
3.6.2 Pengawalan <i>Agrobacterium</i> dan kultur selepas transformasi	38
3.7 Analisa β-Glucuronidase (GUS)	38
BAB 4 KEPUTUSAN	40
4.1 Pengkulturan Eksplan Kacip Fatimah	40
4.2 Penyediaan Kultur Sel Terampai (Suspension) <i>Agrobacterium rizhogenes</i> Strain TR105 Dan A4GUS Pada Bacaan OD Yang Berbeza	42
4.3 Transformasi Eksplan Kacip Fatimah Menggunakan <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	44
4.4 Regenerasi Eksplan Selepas Tempoh Ko-Kultivasi	45
4.4.1 Keadaan eksplan pada medium regenerasi	46
4.4.2 Keadaan eksplan pada medium regenerasi selepas basuhan kedua	47
4.4.3 Keadaan eksplan pada medium regenerasi selepas basuhan ketiga dan keempat	48
4.5 Ujian Histokimia GUS Ke Atas Eksplan	50
BAB 5 PERBINCANGAN	54
5.1 Jenis Eksplan	54
5.2 Bacaan OD Kultur Bakteria	56
5.3 Jenis Strain	58
5.4 Transformasi	61
5.4.1 Melukakan eksplan	61
5.4.2 Tempoh inoculasi	62
5.4.3 Ko-kultivasi	63
5.5 Faktor-Faktor Lain Yang Menyebabkan Tiada Pembentukan	65

Akar Rerambut	
5.5.1 Prakultur eksplan Kacip Fatimah	65
5.5.2 Pertumbuhan berterusan <i>Agrobacterium</i>	67
5.5.3 Ketiadaan bahan peransang tambahan untuk transformasi	70
5.6 Ujian Histokimia	71
BAB 6 KESIMPULAN	73
RUJUKAN	76
LAMPIRAN	
LAMPIRAN A	85



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Komposisi larutan makronutrien (10x) g/L	29
3.2 Komposisi larutan mikronutrien (100x) g/L	30
3.3 Komposisi larutan vitamin (10x) g/L	30
3.4 Komposisi media MS dengan gandaan vitamin	32
3.5 Komposisi media <i>Yeast Mannitol</i>	34
3.6 Komposisi media <i>Yeast Extract</i>	
3.7 Bacaan OD inokulum bagi kedua-dua jenis strain <i>Agrobacterium</i>	36
3.8 Skor peratusan tompokan warna biru yang terbentuk pada eksplan	38
4.1 Keputusan transformasi bagi <i>A. rhizogenes</i> strain TR105	50
4.2 Keputusan transformasi dan ujian Histokimia yang dilakukan ke atas eksplan yang dikultur dengan <i>A. rhizogenes</i> strain A4GUS	50



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Proses transformasi menggunakan <i>Agrobacterium</i>	17

SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 <i>Labisia pumila var. pumila</i> yang terdapat di makmal Tisu Kultur UMS	9
4.1 Tumbuhan induk Kacip Fatimah yang kemudiannya dipotong untuk mendapatkan bahagian nod dan internod	40
4.2 Bahagian batang tumbuhan induk yang telah dipotong untuk dijadikan eksplan	40
4.3 Eksplan yang telah dikultur secara <i>in vitro</i> pada media MS dengan gandaan vitamin	41
4.4 Kultur <i>Agrobacterium</i>	42
4.5 Sampel <i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain A4GUS yang telah diuji dengan larutan GUS dan menunjukkan keputusan yang positif	43
4.6 Eksplan yang telah dilukakan dengan menggunakan jarum yang telah disteril	44
4.7 Eksplan yang telah diinokulasi dengan menggunakan <i>Agrobacterium</i> strain TR105 (OD 0.5) pada medium regenerasi	46
4.8 Keadaan eksplan yang diinokulasi pada bacaan OD 0.5 pada fasa regenerasi selepas basuhan keempat	48
4.9 Hasil keputusan ujian Histokimia yang telah dilakukan ke atas eksplan yang diinokulasi pada bacaan OD kultur <i>A. rhizogenes</i> 0.9	49
4.10 Eksplan pada fasa regenerasi selepas 4 minggu ditransformasi dengan menggunakan kultur sel terampai <i>A. rhizogenes</i> strain TR105 pada OD 0.5	51
4.11 Eksplan pada fasa regenerasi selepas 4 minggu ditransformasi dengan menggunakan <i>A. rhizogenes</i> strain TR105 pada bacaan OD inokulum 0.6	52

SENARAI SARI KATA

Inkubasi	-	Incubate
Transformasi	-	Transformation
Ko-kultivasi	-	Co-cultivation
Antibiotik	-	Antibiotic
Rantaian T	-	T-strand
Rantaian pemacu	-	Overdrive sequence
Kompleks T	-	T-complex
Eksplan	-	Explant
DNA rekombinan	-	DNA recombination
Suntikan Mikro	-	Microinjection
Senjata biolistik	-	Biolistic gun
Elektroporasi	-	Electroporation
Bahagian T	-	T-region

SENARAI SINGKATAN

DNA	Deoxyribonucleic acid
GUS	β -glucuronidase
T-DNA	Transfer DNA
Vir	Virulence
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronidase
MS	Murashige & Skoog
Rpm	Revolution per minute
OD	Optical Density
BAP	6-Benzylaminopurine
PEG	Polyethylene glycol
NLS	Nucleus Localization Signal

SENARAI UNIT DAN SIMBOL

g	gram
°C	darjah Celsius
L	liter
μg	mikrogram
μm	mikrometer
mm	milimeter
cm	sentimeter
nm	nanometer
mL	mililiter
v/v	isipadu per isipadu
kbp	kilo <i>base pair</i>
Md	megadalton
pH	darjah keasidan
%	peratus
β	beta
&	dan
<	kurang daripada
\leq	sama dan kurang daripada



BAB 1

PENDAHULUAN

Malaysia merupakan salah satu negara di dunia yang kaya dengan pelbagai spesis flora dan fauna. Terletak di garisan khatulistiwa, Malaysia amat bertuah kerana mempunyai pelbagai khazanah alam yang hidup subur di hutan hujan tropika dan mempunyai hutan antara yang tertua di dunia. Hasilnya, Malaysia juga kaya dengan pelbagai spesis tumbuhan herba yang amat berpotensi di dalam bidang farmaseutikal. Antara tumbuhan herba yang amat popular dikalangan masyarakat Melayu terutamanya kepada kaum wanita ialah pokok *Labisia pumila* atau lebih dikenali sebagai Kacip Fatimah. Ketika ini, pasaran herba pada peringkat antarabangsa merangkumi penambah rasa makanan, bahan asas produk kesihatan serta bahan asas untuk produk neutrasuetikal dan anggaran pasaran adalah diantara USD 40 hingga 100 juta, iaitu 10% hingga 20% peningkatan bagi setiap tahun (Ramlan, 2002).

Labisia pumila merupakan salah satu tumbuhan herba yang mempunyai potensi besar dalam bidang perubatan terutamanya yang melibatkan penjagaan kesihatan bagi kaum wanita. *Labisia pumila* dikatakan dapat meningkatkan tenaga kaum wanita seterusnya membolehkan kaum wanita dapat terus aktif dalam meneruskan kehidupan

seharian. Selain itu, tumbuhan ini telah digunakan sejak turun-temurun sebagai ubat untuk membantu proses kelahiran bayi serta sebagai ubat selepas bersalin (Ramlan, 2002). *Labisia pumila* juga dikatakan mempunyai keupayaan untuk mengubati cirit-birit, sakit sendi dan juga mengurangkan kesakitan ketika haid (Ramlan, 2002).

Namun begitu, terdapat pelbagai masalah yang timbul dalam usaha untuk mengkomersialkan tumbuhan ini di peringkat antarabangsa. Antaranya ialah, ketika ini, *Labisia pumila* hanya tumbuh secara liar di kawasan hutan di Malaysia. Selain itu, tiada maklumat lengkap berkaitan tumbuhan ini seperti kaedah penanam yang paling berkesan bagi tumbuhan ini, maklumat-maklumat bagi sebatian aktif yang membolehkan *Labisia pumila* digunakan bagi tujuan perubatan dan mekanisma tindak balas sebatian tersebut telah membantutkan usaha untuk meningkatkan nilai bagi tumbuhan herba ini.

Bagi menangani masalah ini, kejuruteraan genetik dikatakan dapat membantu untuk meningkatkan nilai terhadap tumbuhan ini terutama di dalam penghasilan sebatian metabolit sekunder. Bahan metabolit sekunder ialah bahan yang dihasilkan oleh tumbuhan di dalam tetapi tidak penting bagi tujuan pertumbuhan tumbuhan tersebut sebaliknya ia penting dalam memastikan kelangsungan hidup tumbuhan tersebut. Contoh bagi bahan metabolit sekunder adalah seperti bahan anti-bakteria, bahan anti-kanser dan sebagainya yang mampu membantu manusia untuk menghasilkan ubat-ubatan yang berkesan.

Kejuruteraan genetik yang boleh digunakan untuk tujuan ini adalah DNA rekombinan, iaitu memasukkan gen asing ke dalam DNA tumbuhan dan menghasilkan modifikasi genetik mengikut ciri yang dikehendaki. Terdapat pelbagai kaedah bagi tujuan DNA rekombinan seperti kaedah senjata biolistik, elektroporasi dan melalui transformasi *Agrobacterium*. Dalam kajian ini, kaedah pemindahan DNA asing menggunakan kaedah transformasi *Agrobacterium*. Transformasi ialah kaedah memperkenalkan DNA yang ingin diklonkan ke dalam sel bagi membolehkan protein yang dikod oleh DNA tersebut dapat dihasilkan (Songstad *et al.*, 1995). Kaedah ini mempunyai banyak kelebihan berbanding kaedah lain. Kaedah ini tidak melibatkan kos yang tinggi, lebih jitu dan dapat memindahkan gen yang dikehendaki dengan hujung yang diketahui dengan melakukan sedikit perubahan. (Gustavo *et al.*, 1998).

Jenis *Agrobacterium* yang digunakan dalam kajian ini ialah *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrobacterium rhizogenes* merupakan bakteria gram negatif yang berasal daripada tanah dan mempunyai kelebihan semulajadi untuk melakukan mekanisma transformasi terhadap tumbuhan (Vinod *et al.*, 2006). Bakteria ini membawa plasmid *Ri* yang mempunyai gen akar rerambut. *Agrobacterium* ini akan menjangkiti tumbuhan yang telah dicederakan dan seterusnya meransang pertumbuhan akar rerambut pada bahagian yang dijangkiti hasil daripada rekombinasi gen yang terdapat pada plasmid bakteria dengan gen pada sel yang telah dicederakan (Vinod *et al.*, 2006). Akar rerambut ini mempunyai kebaikan tertentu seperti menghasilkan bahan metabolit sekunder yang mempunyai nilai dalam bidang kesihatan. Penghasilan akar rerambut ini memudahkan pembuktian secara fizikal bahawa proses transformasi telah berlaku.

Terdapat banyak faktor yang memainkan peranan dalam memastikan proses transformasi menggunakan *Agrobacterium* berlaku dengan efisien. Antaranya ialah pemilihan strain *Agrobacterium* yang sesuai, cara mengendalikan eksplan dan juga parameter transformasi yang terlibat. Contoh bagi parameter yang terlibat adalah seperti faktor suhu dan pH semasa proses ko-kultivasi, jangkamasa pra-kultur dan ko-kultivasi dan juga jenis media yang digunakan untuk mengkultur eksplan (Wu *et al.*, 2003).

Bagaimanapun, untuk mengkaji satu sistem transformasi tumbuhan menggunakan kaedah *Agrobacterium*, terdapat banyak faktor yang berkait rapat serta memainkan peranan penting untuk membolehkan proses ini berlaku. Oleh itu, objektif bagi kajian transformasi *Labisia pumila* dengan menggunakan *Agrobacterium rhizogenes* ;

1. Mengkaji kekerapan penghasilan akar rerambut menggunakan bahagian nod dan internod stem *Labisia pumila* sebagai eksplan.
2. Menentukan bacaan ketumpatan optikal (OD) pertumbuhan *Agrobacterium rhizogenes* strain TR105 dan A4 GUS yang optimum.
3. Mengkaji faktor strain *A. rizhogenes* yang berbeza iaitu strain TR105 dan A4GUS dalam menentukan kejayaan transformasi.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Labisia pumila* (Kacip Fatimah)

Labisia pumila merupakan salah satu tumbuhan herba yang popular di kalangan masyarakat Melayu terutamanya melibatkan soal penjagaan kesihatan bagi kaum wanita.

Labisia pumila yang lebih dikenali sebagai Kacip Fatimah merupakan tumbuhan herba yang tergolong di dalam keluarga *Myrsinaceae*. Tumbuhan ini digunakan secara meluas oleh masyarakat Melayu zaman dahulu sebagai tumbuhan ubatan bagi tujuan membantu proses kelahiran bayi. Selain daripada itu, Kacip Fatimah juga digunakan sebagai ubatan post-partum iaitu ubatan selepas proses kelahiran.

Labisia pumila hanya merupakan genus yang terkecil di dalam keluarga *Myrsinaceae*. Kacip Fatimah biasanya dijumpai di kawasan Indochina selain daripada Malaysia. Tumbuhan ini tumbuh secara liar di dalam kawasan hutan hujan yang terletak 80 hingga 100 meter dari aras laut. Selain daripada membantu di dalam proses kelahiran bayi serta sebagai ubat selepas bersalin, Kacip Fatimah juga dikatakan mampu mengubati cirit-birit, sengal-sengal tulang, gonorea iaitu sejenis penyakit yang menyebabkan



berlakunya lelehan pada alat kemaluan serta mampu mengurangkan kesakitan semasa haid (Zainon, 2004).

Terdapat tiga jenis Kacip Fatimah yang telah dikenal pasti terdapat di Malaysia iaitu variasi *alata*, variasi *pumila* dan variasi *lanceolata*. Ketiga-tiga jenis *Labisia pumila* ini mempunyai perbezaan darisegi ciri-ciri fizikal, kimia serta aktiviti biologi (Zhari *et al.*, 1999). Adalah penting bagi penyelidik untuk melakukan penyelidikan berkaitan sebaitan aktif yang terdapat pada tumbuhan ini bertujuan untuk mengenal pasti bahagian atau bahan yang terdapat pada Kacip Fatimah, yang berpotensi untuk dibangunkan sebagai ubatan herba yang selamat dan berkesan.

Pada ketika ini, terdapat permintaan yang tinggi terhadap tumbuhan herba termasuk mendapatkan sumber daripada tumbuhan-tumbuhan herba yang tumbuh secara liar. Ini kerana, pada ketika ini, aktiviti penanaman tumbuhan herba secara komersial masih tidak giat diusahakan disebabkan oleh masalah kekurangan maklumat berkaitan tumbuhan herba berkenaan, termasuklah Kacip Fatimah. Ketika ini, Kacip Fatimah mendapat permintaan yang tinggi di dalam Malaysia terutamanya sebagai minuman tonik selepas bersalin. Walau bagaimanapun, kekurangan maklumat berkaitan *Labisia pumila* seperti maklumat teknikal dalam mengenal pasti jenis Kacip Fatimah, teknik propagasi, agronomi serta aspek sivikultur menjadikan proses untuk mengkomersialkan tumbuhan ini menghadapi masalah. Oleh yang demikian, kajian yang melibatkan proses propagasi dilihat sebagai langkah yang penting untuk membolehkan Kacip Fatimah dikomersialkan secara meluas.

Selain itu, ketiga-tiga variasi Kacip Fatimah yang terdapat di negara ini mempunyai fungsi yang berbeza untuk setiap satunya. Maka, pemilihan variasi Kacip Fatimah yang betul adalah penting bagi memastikan sesuatu kajian yang dilakukan berjaya atau tidak terdapat masalah lain yang timbul disebabkan oleh pemilihan variasi yang tidak sesuai. Walaubagaimanapun, terdapat masalah untuk mengenal pasti variasi bagi Kacip Fatimah. Sebagai contoh, terdapat hanya sedikit perbezaan di antara variasi *alata* dan variasi *pumila* darisegi daun dan petiol. Oleh itu, adalah penting untuk para penyelidik menghasilkan satu kaedah yang berkesan untuk mengenal pasti jenis tumbuhan ini.

Kajian awal telah dilakukan menggunakan kaedah agroperhutanan dalam usaha untuk membiakkan tumbuhan ini. Kaedah ini melibatkan penanaman Kacip Fatimah di dalam kawasan pokok getah serta di kawasan pokok rotan. Walaubagaimanapun, kajian bagi penanaman Kacip Fatimah secara monokultur masih tidak dilakukan. Hasil daripada kajian awal ini, didapati bahawa kaedah penanaman yang berkesan untuk tumbuhan ini adalah menggunakan biji benih serta akar. Selain itu, Kacip Fatimah tumbuh dengan subur di kawasan yang redup serta tidak mempunyai kandungan air yang tinggi di dalam tanah tetapi mempunyai kandungan humus yang tinggi.

Kacip Fatimah biasanya direbus untuk mendapatkan air rebusan untuk diminum. Air rebusan Kacip Fatimah dikatakan mempunyai sebatian kimia yang penting untuk kesihatan wanita. Pada masa ini, sudah terdapat minat dikalangan para penyelidik

RUJUKAN

- Albright, L. M., Huala, E., dan Ausubel, F. M., 1989. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. Dlm: Stanton B. Gelvin, *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, **67** (1), 16-37.
- Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C. dan Jones, H. D., 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat fluorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1135-1142.
- Bajaj, Y. P. S., 1989. Genetic engineering and in vitro manipulation of plant cells technical advances. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 9: Plant Protoplast and Genetic Engineering II*. Springer-Verlag, German, 1-18.
- Ballas, N., dan Citovsky, V., 1997. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium VirD2* protein. Dlm: Stanton B. Gelvin, *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003. **67** (1), 16-37.
- Binns, A. N., dan Howitz, V. R., 1994. The genetic and chemical basis of recognition in the *Agrobacterium*: Plant Interaction. Dlm: Dangl, J.L. *Bacterial pathogenesis of plants and animals*. Springer-Verlag, New York, 119-138.
- Caiping, M., Steven, H., Strauss dan Meilan, R., 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of the genome-sequence poplar clone, nisqually-1 (*Populus trichocarpa*). *International Society For Plant Molecular Biology*. **22**: 1-9.

- Cardoza, V., dan Stewart, C. N., 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus L.*) from hypocotyls segment explants. *Plant Cell Report* **21**, 599-604.
- Carmine, D., dan Simona., 1998, *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection, *Electronic Journal of Biotechnology* **1** (2).
- Chakrabarty, R., Viswakarma, N., Bhat, S. R., Kirti, P. B., Singh, B. D. dan Chopra, V. L., 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *J. Biosci.* **27**: 495–502.
- Chi, N. H., Jhu, F. L., Uei, C. C., Chin, Y. T. dan Hsiao, S. C., 2002. *Development of Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation system for Salvia miltiorrhiza*. Agricultural Research Institute, National Chung-Hsing University.
- Chilton, M.-D., M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Dlm: Stanton B. Gelvin, *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003. **67** (1), 16-37.
- Crossway, A., 1989. Microinjection of cells and protoplasts: Integration of foreign DNA. In: Bajaj, Y. P. S., 1989. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 9: Plant protoplast and Genetic engineering II*. Springer-Verlag, German, 1-18.

- Damiano, C., dan Monticelli S., 1998. *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection, *Electronic Journal of Biotechnology*, **1** (2).
- Dilek, D., Khalid, M. K., dan Sebahattin O., 2005. *Agrobacterium*-mediated tumor and hairy root formation from different eksplants of lentil derived from young seedling, *International Journal of Agriculture & Biology*, 1019-1025.
- Dillen, W., De Clercq, J., Kapila, J., Zambre, M., Van Montagu M., dan Angenon G. 1997. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plant. *Plant Journal*, **12**: 1459-1463.
- Draper, J., Scott, R. 1994. Gene transfer to plant. Dlm : Grierson, D. *Plant Genetic Engineering*. U. Kingdom: Blackie Academic & Profesional. 39-75.
- Ercan, G., Taskin, K. M., Turgut, K., Yuce, S., 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum L.* populations grown in Turkey . *Tr. J. of Botany*, **23**: 373-377.
- Feyissa, T. 2006. *Micropropagation, transformation and genetic diversity of Hagenia abyssinica (Bruce) J.F. Gmel.* Doctoral dissertation.
- Frank, F., White, Eugene, W., Nester, 1980. Relationship of plasmids responsible for hairy crown gall tumorigenicity. *Journal Of Bacteriology*, **144**: 710-720.
- Fullner dan Nester E. W., 1996. Temperature affect the T-DNA transfer marchinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal Bact.* **178**: 1489-1504

- Gietl, C. Z., Koukolikova-Nicola, dan Hohn, B., 1987. Mobilization of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cells involves a protein that binds single-stranded DNA. Dlm: Stanton B. Gelvin, *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003. **67** (1), 16-37.
- Gustavo, A. R., Joel, G. C., Roberto, V. P., Camilo, A. P., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **3**.
- Han, J. L., Wang, H., Ye, H. C., Liu, Y., Li, Z. Q., Zhang, Y., Zhang, Y. S., Yan, F. dan Li, G. F., 2005. High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure. *Plant Science* **168**: 73-80.
- Howard, E., dan V. Citovsky. 1990. The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. Dlm: Stanton B. Gelvin, 2003, *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **67** (1), 16-37.
- Hinchee, M. A. W., Corbin, D. R., Armstrong, C. L., Fry, J. E., Sato, S. S., DeBoer, D. L., Petersen, W. L., Armstrong, T. A., Connor, D. V., Layton, J. G., dan Horch, R.B., 1994. Plant transformation. Dlm: Vasil, I. K., dan Thorpe, A. T., *Plant cell and tissue culture*: 231-270. Netherland: Kluwer Academic Publisher.
- Hunault, G., 1985. Organic acids, pH, ammonium and nitrate interaction on the growth of Asparagus tissue cultivated *in vitro*. Ann. Sci. Nat., Bot. **13**, 63-75.

- Jenes, B., Helen Moore, Jun Cao dan Wanggen Zhang, Ray Wu., 1993. Techniques for gene transfer. Dlm: Shain-dow Kung dan Ray Wu., 1993. *Transgenic plants: engineering and utilization*, Academic Press, Tokyo, 1: 134-142.
- Kennedy, Burger, J. T., dan Watson, 1999. Genetic enhancement of nutritional quality of grain sorghum. *South African Journal Of Science*.
- Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, M. F., Sanford, J. C., 1988. *Factors influencing gene delivery into Zea mays cells by high velocity microprojectiles*. Bio-Techol. 6: 559-563.
- Komari, T., Ishida, Y., dan Hiei, Y., 2004. Plant transformation technology: *Agrobacterium*-mediated transformation. Dlm: Christou, P. & Klee, H. *Handbook of Plant Biotechnology*. John-wiley, USA, 1: 233-261.
- Kumar, K. K., Maruthasalam, S., Loganathan, M., Sudhakar, D., dan Balasubramanian, P., 2005. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. *Plant Molecular Biology Report*. 23: 67-73.
- Margie, M., Paz, Huixia Shou, Zibiao Guo, Zhangyuan Zhang, Anja K. Banerjee dan Kan Wang, 2003. Assessment of condition affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136:167-179.
- Men, S., Ming, X., Liu, R., Wei, C. dan Li, Y., 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 63-71.
- Monika, S., 2006. Studies of adventitious root formation in woody species. *Doctoral Thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences.

- Murashige, T., dan Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Nik Musa'adah, M., Nur Muna, N. A. M. & Rasadah, M. A., 2004. Tropical anti-inflammatory activity of *Labisia pumila*. In: Zutiyati, Z., Azizol, A. K., dan Khorizah, S., *New dimensions in complementary health care*. Forest Research Institute Malaysia, Kepong, 168-170.
- Ramlan, A. A., 2002. *Turning Malaysia into a global herbal producer: a personal perspective*. Siri Syarahan Perdana Profesor.
- Richard, M. T., Paul Christou dan Eva Stoger., 2002. Genetic transformation of plant and their cells. Dlm: Kirsi-Marja, Oksman-Caldentey dan Wolfgang H. Barz., 2002, *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. Marcel Dekker, New York, 111-114.
- Ryder M. H., Max, E., Tate, dan Kerr, A., 1985. virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. *Plant Physiol.* **77**: 215-221.
- Sangwan, R. S., Bourgeois, Y., Brown, S., Vasseur, G., dan Sangwan-Norreel B., 1992. Characterization of competent cells and early event of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **188**: 439-456.
- Satyavanthi, V. V., Prasad, V., Gita Lakshmi, B., Lakshmi Sita, G., 2002. High efficiency transformation protocol of three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, **162**, 215-223.

- Smith, F. D., Harpending, P. R., Sanford, J. C., 1992. Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells, *J. Gen. Microbiol.* **138**, 239-248.
- Songstad, D. D., Somers, D. A., dan Griesbach, R. J., 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **40**, 1-15.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P., 1986. *Agrobacterium tumefaciens vir gene expression*. National Academy of Science, USA. **83**: 379-383.
- Stanton, B. G., 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67** (1), 16-37.
- Stanton, B. G., 1993. Molecular genetic of T-DNA transfer from *Agrobacterium* to plants. Dlm: Shain-dow Kung dan Ray Wu., 1993. *Transgenic plants: engineering and utilization*. Academic Press, Tokyo, **1**, 134-142.
- Suzuki, S., dan Nakano, M., 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation in liliaceous ornamental plants. *JARQ* **36**, No 3.
- Tepfer, D., 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Dlm: Jackson J. F., H. F Linskens. 2003. *Genetic Transformation of Plant*. Vol. **23**. Springer, New York.
- Torregrosa dan Bouquet, A., 1997. *A. rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **49**: 53-62.

- Van, d. V., Karimi, M., Herder, G. D., Montagu, V. M., 2003. *Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of plant*, molecular methods of plant analysis. Springer, New York, **23**: 23-30.
- Vinod, K., Ashwani Sharm, Bellur Chayapathy, Narasimha Prasad, Harishchandra Bhaskar, Gururaj Gokare, Aswatanarayana Ravishankar., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation results in hairyroot formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol (9)
- Vinod, S., Ram C. Y., Neelam R. Y., Khushi., 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa L.*). *African Journal of Biotechnology* **11**, 572-575.
- Wu, H., Sparks. C., Amoah, B., Jones, H.D., 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep* **21**: 659-668.
- Yu, H., Yang, S. H., dan Goh, C. J., 2001. *Agrobaacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the 1 *knox* gene *DOH1*. *Plant Cell Rep* **20**:301-305.
- Zainon, A. S., 2004. Tumbuhan penawar pelbagai penyakit: Tongkat Ali, Kacip Fatimah dan Pegaga. Dlm: In: Zutiyati, Z., Azizol, A. K. dan Khorizah, S. *New Dimensions in Complementary Health Care*. Forest Research Institute Malaysia, Kepong, 3-6.
- Zarate, R., dan Michael M. Yeoman, 1999. *Application of recombinant DNA technology to studies on plant secondary metabolism*, Instituto Universitario de Bio-Orgánica A. González, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain.

- Zdravkovic', S., K., Muhovski, Y., Druart, P., alic', D., Radojevic', C.' L., 2004. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum L.* and the regeneration of transformed plants, *Plant Cell Rep*, **22**, 698–704.
- Zhari, I., Norhayati, I., dan Jaafar, L., 1999. *Malaysian Herbal Monograph 1*: 45–48. Malaysian Monograph Committee.