

93032

4000006243



KAJIAN MORFOLOGIKAL, FISIOLOGIKAL DAN PENYARINGAN
TERHADAP AKTINOMISET YANG MENGHASILKAN
PERENCAT-PERENCAT PROTEIN KINASES PADA
TRANSDUKSI ISYARAT EUKARIOTIK

YEOH SEOK HAR

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

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERPUSTAKAAN UMS
FEBRUARI 2004



1400006243



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

UDUL: KAJIAN MORFOLOGIKAL, FISIOLOGIKAL DAN PENYARINGAN TERHADAP PERENCET-PROTEIN TRANSOLUKSI AKTINOKINASE YANG MENGAKTIFKAN FASE PERENCET KINASES PADA ISYARAT EUKARYOTIK

JAZAH: SARTANA MUDA SAINS DENGAN KEPUTIAN

SESI PENGAJIAN: 01 / 02

AYA YEOH SEOK HAR

(HURUF BESAR)

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

- Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
- Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
- Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.

* 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)

Larang Tetap: 5, TAMAN LUMBA KUCHING,

PROF. DR HO COY CHOKE

Nama Penyelia

11400 PENANG.

Tarikh: 12 / 3 / 04

Tarikh:

ATURAN: * 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.

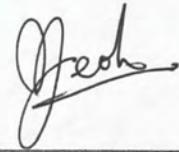
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



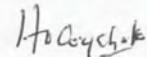
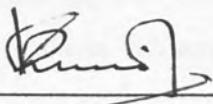
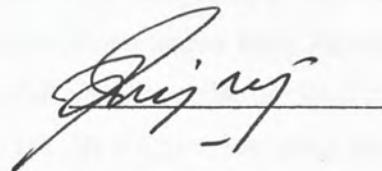
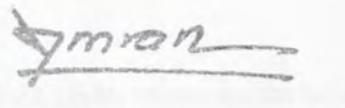
PENGAKUAN

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

13 FEBRUARI 2004



YEOH SEOK HAR
HS2001-1625

DIPERAKUKAN OLEH**Tandatangan****1. PENYELIA****(PROF. DR. HO COY CHOKE)****2. PEMERIKSA 1****(PROF. DR. PERUMAL RAMASAMY)****3. PEMERIKSA 2****(DR. CHARLES S. VAIRAPPAN)****4. DEKAN****(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)****UMS**
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Izinkan saya merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Professor Dr. Ho Coy Choke yang sudi menjadi penyelia saya sepanjang kajian projek ini dijalankan. Segala teguran, tunjuk ajar dan juga bimbingan yang diberikan oleh beliau akan dijadikan panduan bagi saya untuk selama-lamanya. Penghargaan juga dirakamkan kepada Professor Dr. Paranjothy, Professor Dr. Perumal Ramasamy, Professor Dr. Kamaruzaman Ampon, Dr. Lee Ping Chin, Dr. Roziah Haji Kambol, Dr. Zaleha Abdul Aziz dan Dr. Jualang yang iklas mencurahkan ilmu pengetahuan dan tunjuk ajar sepanjang pengajian saya di UMS.

Jutaan terima kasih saya ucapkan kepada Dr. Masaki Mizunuma dan Dr. Tomoko Andoh kerana sudi memberikan yis strain untuk sistem penyaringan GSK-3 β manusia dan MCK1. Selain itu, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada pembantu makmal Bioteknologi, Cik Rokiah Ibrahim dan pelajar-pelajar tua En. Foo Sek Hin, En. Ong Si Mon, Cik Puah Seok Hwa dan Cik Hew Chaw Sen yang sudi memberi tunjuk ajar, nasihat dan bantuan yang membolehkan saya menyempurnakan projek ini dengan lancar.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada rakan seperjuangan saya En. Yeoh Chin Keong, Cik Tay Chiew Hong, Cik Gan Chai Pei dan En. Phang Chee Yong atas bantuan dan sokongan yang diberikan selama ini.

Akhir sekali, penghargaan juga dirakamkan kepada keluarga kesayangan saya yang sering memberi galakan, kasih sayang dan sokongan kepada saya. Jasa dan budi baik mereka akan saya hargai selama-selamanya.

ABSTRAK

Sebanyak 139 spesis aktinomiset tanah yang berasal dari Tabin dan *Lower Segama* telah diekstrakan dalam aseton dan dinyaringkan terhadap sistem penyaringan GSK- 3β manusia berdasarkan yis. Hanya ekstrak H8955 yang didapati merupakan perencat positif terhadap sistem penyaringan ini. Ekstrak-ekstrak H7530, H7667, H8934 dan H11110 (dinyaringkan oleh rakan sekerja saya), yang merupakan perencat positif dalam sistem penyaringan ini telah dikumpul dan dinyaringkan dalam sistem penyaringan MCK1 dengan tapakjalan diaktifkan kalsium oleh yis. Keputusannya ialah H7530, H8955 dan H11110 bersifat sebagai perencat MCK1, H7372 dan H7944 menunjukkan zon perencat yang tidak dipengaruhi oleh MCK1 dan H7667 sebagai pengawalan negatif. Strain H7372 dan H7944 telah dinyaringkan terhadap sistem penyaringan MAPKKinase tetapi keputusan menunjukkan toksik kepada yis. Selain penyaringan, 2 aktinomiset strain H7372 (perencat Ras-Raf) dan H7944 (perencat Raf) telah dikaji dari segi morfologi dan fisiologi. Kedua-dua strain ini menunjukkan kesamaan dalam morfologi dan fisiologi. Kedua-dua strain ini ialah bakteria gram positif dan bertumbuh dengan baik pada ISP2 dan ISP3 medium. Secara fisiologikal, mereka ialah katalase positif dan menggunakan sumber nitrogen L-proline, L-histidine dan L-valine dengan baik. Perbezaannya ialah, strain H7372 mempunyai rangkaian spora spiral terbuka tetapi H7944 tidak mempunyai ciri ini. H7372 menggunakan sumber karbon (D-glukosa, L-inositol, D-fruktosa, sukrosa dan D-mannitol) dengan banyak, manakala H7944 menggunakan D-glukosa dan L-inositol dengan banyak.

ABSTRACT

A total of 139 species of soil actinomycetes originated from Tabin and *Lower Segama* have been extracted into acetone and screened against human GSK-3 β yeast based screening system. Only extract H8955 is found to be positive inhibitor against this screening system. Extracts H7530, H7667, H8934 and H11110 (obtained from my colleagues), which are shown as positive inhibitor against human GSK-3 β screening system are then screened against MCK1 screening system by using Ca²⁺-activated pathway of yeast. Results are H7530, H8955 and H11110 behave as MCK1 inhibitor, H7372 and H7944 show their inhibition zone are not affected the MCK1, and H7667 shows as negative control. Strain H7372 and H7944 screened against MAPKKinase screening system but shown toxic to yeast. Besides screening for inhibitor, 2 actinomycete strains H7372 (Ras-Raf inhibitor) and H7944 (Raf inhibitor) have been characterized. Both strains showing some similarities in morphological and physiological. Both are gram positive bacteria with a good growth on ISP2 medium and ISP3 medium. Physiologically, they are catalase positive and utilize nitrogen sources L-proline, L-histidine and L-valine well. On the other hand, strain H7372 has a spiral spore chain but H7944 absent of it. H7372 utilize carbon sources (D-glucose, L-inositol, D-fructose, sucrose and D-mannitol) well, whereas H7944 utilize D-glucose and L-inositol well.

SENARAI KANDUNGAN

	Muka Surat
HALAMAN JUDUL	i.
PENGAKUAN	ii.
PENGESAHAN	iii.
PENGHARGAAN	iv.
ABSTRAK	v.
ABSTRACT	vi.
SENARAI KANDUNGAN	vii.
SENARAI JADUAL	xii.
SENARAI RAJAH	xv.
SENARAI FOTO	xvi.
SENARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN	xvii.
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Pengenalan	1
1.2 Matlamat atau tujuan utama kajian	4
1.3 Objektif untuk mencapai matlamat kajian	4
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	5
2.1 Klasifikasi Aktinomiset	5
2.1.1 <i>Actinobacteria</i>	6
2.1.2 <i>Actinoplanetes</i>	6
2.1.3 <i>Actinomycetes with multilocular sporangia</i>	7

2.1.4	<i>Nocardioform aktinomiset</i>	7
2.1.5	<i>Streptomycetes</i>	
2.1.6	<i>Maduromycetes</i>	11
2.1.7	<i>Thermomonospora</i>	11
2.1.8	<i>Mikropolispora</i>	12
2.1.9	<i>Thermoaktinomiset</i>	12
2.2	Morfologikal Aktinomiset	13
2.3	Fisiologikal Aktinomiset	16
2.4	Kimotaksonomi Aktinomiset	19
2.5	Filogenetik Aktinomiset	22
2.6	Metabolit Sekunder	24
2.7	Sistem Transduksi Isyarat	27
	2.7.1 Tapakjalan isyarat MAP Kinase dalam sel eukariot	28
	2.7.2 Kepentingan GSK-3 dalam sel eukariot	30
2.8	Penyaringan perencat MAP Kinase, perencat MCK1 pada yis serta penyaringan GSK-3 β manusia.	36
	2.8.1 Penyaringan perencat MAP Kinase(MKK1) pada yis.	36
	2.8.2 Penyaringan perencat GSK-3 β manusia.	38
	2.8.3 Penyaringan perencat MCK1 pada yis.	39
BAB 3 BAHAN, RADAS DAN KAEDAH		45
3.1	Sistem Penyaringan untuk Perencat MAPK kinase	45
3.1.1	Strain Yis	45
3.1.2	Media Pengkulturan Yis	

(untuk yis mutan MKK1p386)	46
3.1.3 Media Fermentasi Yis (untuk yis mutan MKK1p386)	46
3.1.4 Media Bioassai bagi perencat MAPK kinase (MKK1 ^{p386})	46
3.2 Sistem Penyaringan untuk Perencat GSK3 β manusia	48
3.2.1 Strain Yis dan media	49
3.3 Sistem Penyaringan untuk Perencat MCK1	49
3.3.1 Strain $\Delta zds\ 1$ dan strain $\Delta zds\ 1\ \Delta mck\ 1$	50
3.3.2 Media YPD	50
3.4 Medium Pengkulturan strain aktinomiset	52
3.5 Media Fermentasi strain aktinomiset	52
3.6 Kajian Morfologikal	52
3.6.1 Medium-medium untuk kajian morfologikal	53
3.6.2 Gram staining	53
3.7 Kajian Fisiologikal	54
3.7.1 Pembentukan melanin pigmen	54
3.7.2 Suhu	55
3.7.3 pH	55
3.7.4 Toleransi NaCl	56
3.7.5 Aktiviti Katalase	56
3.7.6 Penggunaan sumber karbon	57
3.7.7 Penggunaan sumber nitrogen	60
BAB 4 KEPUTUSAN	61
4.1 Sistem Penyaringan	61

4.1.1	Penyaringan perencat MAPK Kinase (MKK1)	61
4.1.2	Penyaringan untuk perencat GSK-3 β manusia pada yis.	63
4.1.3	Penyaringan untuk perencat MCK1 yis yang homolog kepada GSK-3 β manusia.	67
4.2	Kajian morfologi aktinomiset	74
4.2.1	Morfologi bagi strain H7372	74
4.2.2	Morfologi bagi strain H7944	76
4.3	Kajian fisiologi aktinomiset	79
4.3.1	Fisiologi bagi strain H7372	79
4.3.2	Fisiologi bagi strain H7944	83
BAB 5 PERBINCANGAN		88
5.1	Sistem Penyaringan	88
5.1.1	Penyaringan perencat MAPKKinase	88
5.1.2	Penyaringan untuk perencat GSK-3 β manusia	89
5.1.3	Penyaringan untuk perencat MCK1 yis yang homolog kepada GSK-3 β manusia.	91
5.2	Kajian morfologi aktinomiset	96
5.2.1	Morfologi strain H7372	96
5.2.2	Morfologi strain H7944	97
5.3	Kajian fisiologi aktinomiset	98
5.3.1	Fisiologi strain H7372	98
5.3.2	Fisiologi strain H7944	99
5.4	Cadangan	101

BAB 6 KESIMPULAN	103
RUJUKAN	105
LAMPIRAN I	113
LAMPIRAN II	115
LAMPIRAN III	116
LAMPIRAN IV	117
LAMPIRAN V	118
LAMPIRAN VI	121
LAMPIRAN VII	124

SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Antibiotik-antibiotik yang dihasilkan oleh Streptomycetes, aktiviti biologikal dan struktur kelasnya.	9
2.2 Morfologi dan kandungan dinding sel oleh genera aktinomiset jenis aerobik	15
2.3 Dinding sel kimotaip	16
2.4 Bentuk-bentuk asid lemak bagi genera-genera Actinomycetales	21
2.5 Ciri-ciri bentuk fosfolipid bagi aktinomiset	22
2.6 Penunjuk biokimia oleh genera-genera aktinomiset	22
2.7 Beberapa contoh perencat GSK-3	35
2.8 Sistem Penyaringan bagi Perencat MCK1 pada Yis	41
4.1 Keputusan bagi penyaringan perencat MAPKKinase kali pertama.	62
4.2 Keputusan bagi penyaringan perencat MAPKKinase kali kedua.	62
4.3 Keputusan bagi penyaringan perencat MAPKKinase kali ketiga.	62
4.4 Keputusan bagi penyaringan perencat kepada GSK-3 β manusia pada SC-uracil media pada 25°C dan 37°C	64
4.5 Keputusan untuk strain berpotensi (H8955) pada pelbagai kepekatan pada SC-uracil media pada 25°C dan 37°C	64
4.6 Keputusan untuk penyaringan ekstrak H7530 yang bersifat hampir sama dengan perencat MCK1 dengan sistem penyaringan berdasarkan tapakjalan diaktifkan-kalsium.	68

4.7	Keputusan untuk penyaringan ekstrak H7372 yang memaparkan zon perencat yang tidak mempengaruhi MCK1 dengan sistem penyaringan berdasarkan tapakjalan diaktifkan-kalsium.	69
4.8	Keputusan untuk penyaringan ekstrak H7667 yang tiada menunjukkan aktiviti dalam sistem penyaringan berdasarkan tapakjalan diaktifkan-kalsium.	70
4.9	Keputusan sistem penyaringan untuk perencat MCK1 yis yang homolog kepada GSK-3 β manusia	71
4.10	Keputusan morfologikal bagi strain H7372 pada pelbagai medium.	75
4.11	Keputusan morfologikal bagi strain H7944 pada pelbagai media.	78
4.12	Keputusan fisiologikal (pembentukan melanin) bagi strain H7372.	80
4.13	Keputusan fisiologikal (pembentukan suhu) bagi strain H7372.	80
4.14	Keputusan fisiologikal (kesan perubahan pH) bagi strain H7372.	80
4.15	Keputusan fisiologikal (toleransi terhadap 13% (w/v) NaCl) bagi strain H7372.	81
4.16	Keputusan fisiologikal (katalis aktiviti terhadap 3% (v/v) H ₂ O ₂) bagi strain H7372.	81
4.17	Keputusan fisiologikal (penggunaan sumber karbon) bagi strain H7372.	81
4.18	Keputusan fisiologikal (penggunaan sumber nitrogen) bagi strain H7372.	82
4.19	Keputusan fisiologikal (pembentukan melanin) bagi strain H7944.	84

4.20 Keputusan fisiologikal (pembentukan suhu) bagi strain H7944.	84
4.21 Keputusan fisiologikal (kesan perubahan pH) bagi strain H7944.	84
4.22 Keputusan fisiologikal (toleransi terhadap 13% (w/v) NaCl) bagi strain H7944.	85
4.23 Keputusan fisiologikal (katalis aktiviti terhadap 3% (v/v) H ₂ O ₂) bagi strain H7944.	85
4.24 Keputusan fisiologikal (penggunaan sumber karbon) bagi strain H7944.	85
4.25 Keputusan fisiologikal (penggunaan sumber nitrogen) bagi strain H7944.	86
5.1 Ciri-ciri persamaan antara morfologi dan fisiologi bagi strain H7372 dan H7944	100
5.2 Ciri-ciri perbezaan antara morfologi dan fisiologi bagi strain H7372 dan H7944	101

SENARAI RAJAH

No. Rajah	Halaman
2.1 Struktur-struktur antibiotik yang dihasilkan oleh Streptomycetes	10
2.2 Struktur-struktur antibiotik yang dihasilkan oleh Streptomycetes	10
2.3 Struktur-struktur metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Streptomycetes	26
2.4 Struktur-struktur metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Streptomycetes	27
2.5 Struktur kimia Staurosporine	27
2.6 Laluan MAP Kinase bagi sel mamalia dan yis tunas	30
2.7 Peranan GSK-3 dalam tapak jalan isyarat Wnt/β-catenin	33
2.8 Beberapa tapak jalan isyarat yang merencatkan GSK3	34
2.9 Sistem penyaringan perencat MAPK Kinase	37
2.10 Sistem penyaringan perencat GSK-3 β manusia	39
2.11 Tapakjalan yang dicadangkan untuk pengawalan Hs11 kinase oleh MCK1	41
3.1 Carta aliran bagi kaedah-kaedah untuk menyediakan sistem penyaringan bagi menyaringkan perencat MCK1	51

SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
4.1 Strain H8955 yang menunjukkan zon perencat pada kepekatan yang berlainan dengan sistem penyaringan perencat GSK-3 β manusia pada SC-uracil media pada 37°C	65
4.2 Strain H8955 yang menunjukkan zon perencat pada kepekatan yang berlainan dengan sistem penyaringan perencat GSK-3 β manusia pada SC-uracil media pada 25°C	66
4.3 Hasil gram staining bagi strain H7372 di bawah mikroskop cahaya 1000x	74
4.4 Morfologikal koloni bagi strain H7372 pada ISP2 medium, pH7.2, hari-14.	75
4.5 Hasil spore suspension bagi strain H7944 diperhatikan di bawah mikroskop cahaya. 20x.	77
4.6 Hasil gram staining bagi strain H7944 di bawah mikroskop cahaya. 1000x	77
4.7 Morfologikal bagi koloni strain H7944 pada ISP2 medium, pH 7.2, hari-14.	78

SENARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN

%	Peratus
°C	Darjah Celcius
CaCl ₂	kalsium klorida
µl	Mikroliter
cm	Sentimeter
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
g	Gram
G ₂	Peringkat pertumbuhan kedua
GLU	Glikosa
GAL	Galaktosa
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
L	Liter
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
min	Minit
mg	Miligram
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mm	Milimeter
No.	Nombor
PBS	Larutan penimbal sulfat
Raf	Protein serine/threonine kinase yang dikodkan oleh onkogen <i>raf</i>
Ras	Protein yang mengikat kepada GTP dan dikodkan oleh Onkogen <i>ras</i>
rpm	Putaran permunit
SC-ura	Synthetic complete without uracil
s	Saat
sp.	Species
v/v	Isispadu per isipadu
w/v	Berat per isipadu

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan

Aktinomiset merupakan bakteria yang ‘sebenar’ dengan ciri-ciri morfologi yang amat sama dengan fungi yang berfilamen (Mark, 1999). Ciri-cirinya termasuk bergram positif, biasanya membentukkan filamen yang bercabang, 0.5 – 1.0 μm dalam diameter, sebilangan filamen akan membentukkan serpihan yang pelbagai bentuk atau berada dalam keadaan yang kukuh dan menghasilkan arthrospora, spora yang dihasilkan adalah tunggal dan dalam rantaian yang pelbagai ukuran, biasanya sporanya adalah ‘nonmotile’, tetapi sesetengahnya akan menghasilkan spora flagela, sesetengahnya adalah aerobik tetapi ada sesetengah genera yang bersifat fakultatif atau anaerobik, menggunakan sumber karbon yang banyak, hidup di habitat yang luas, segelintir daripadanya adalah pathogen kepada manusia, haiwan dan tumbuhan.

Secara amnya, order *Actinomycetales* boleh dibahagikan kepada beberapa genera iaitu *Actinobacteria*, *Actinoplanetes*, *Actinomycetes with multilocular sporangia*, *Nocardioform actinomycetes*, *Streptomycetes*, *Maduromycetes*, *Thermomonosporas*, *Micropolyspores* dan *Thermoactinomyces*. Order

Actinomycetales ini telah dibentukkan untuk aktinomiset di bawah kajian morfologi, kimotaksonomi dan 16S rRNA (Goodfellow, 1983).

Dari segi morfologi, aktinomiset telah memaparkan diversiti morfologi yang besar, bentuknya telah melingkungi kokkoid, rod yang tidak bercabang, rod yang bercabang sedikit, hifa yang berbentuk fragmen, miselia bercabang dengan spora bersama dengan hifa aerial, dan multilocularspora. Walaupun morfologi organisma ini berbeza dari yang ringkas ke yang kompleks tetapi kebanyakan strain oleh kebanyakan spesis boleh dibahagikan kepada dua kumpulan morfologi yang utama, iaitu nocardioform- dan sporo-actinomycetes (Goodfellow, 1983). Selain itu, aktinomiset yang berasal dari genera atau famili yang berlainan akan memaparkan warna substrat miselia, warna aerial miselia, warna pigment yang berlainan juga. Maka, kajian morfologi adalah paling penting untuk mendefinisikan kumpulan aktinomiset pada tahap genus dan famili.

Aktinomiset merupakan 10% hingga 50% kepada jumlah populasi microorganisma dalam tanah (Labeda dan Shearer, 1990). Sesetengah aktinomiset memerlukan gas oksigen untuk hidup iaitu aerobik, tetapi ada di antaranya ialah fermentatif. Suhu juga mempengaruhi kehidupan dan perkembangan aktinomiset. Biasanya aktinomiset akan hidup dalam lingkungan suhu 28°C – 37°C, ada juga yang hidup pada 55°C (Mark, 1999). Kebanyakan aktinomiset adalah bertoleransi dalam keadaan beralkali, dan jarangnya adalah bertoleransi kepada keadaan berasid. Aktinomiset yang berasal dari genera-genera yang berbeza juga akan memerlukan sumber karbon dan sumber nitrogen yang berbeza. Jadi, kajian fisiologi telah

dijalankan ke atas aktinomiset untuk mengetahui cara-cara hidup dan keadaan yang bersesuaian untuk pertumbuhan dan kehidupannya.

Metabolit sekunder telah dianggap sebagai unsur yang tiada manfaat kepada sesuatu mikroorganisma untuk pertumbuhan dan proses yang penting untuk sel (Vining 1990) tetapi sebagai pertahanan atau perlindungan kepada mikroorganisma itu. Aktinomiset dipercayai telah menghasilkan banyak metabolit sekunder yang berguna dan berkesan dalam bidang industri, perubatan dan juga agrikultur (Piret dan Demain, 1988). Antaranya ialah streptomycetes yang terkenal dengan penghasilan metabolit sekunder yang terbanyak sekali. Kegunaan metabolit sekunder termasuk: agen antibakteria, agen antitumor, agen antifungi, agen insecticide dan anthelmintic, agen immunonodulasi, antiviral dan perencat enzim.

Sistem penyaringan perencat MAPK Kinase dan sistem penyaringan perencat GSK3 β adalah bertujuan untuk menyaringkan protein kinases yang terlibat dalam tapakjalan MAPK Kinase dan tapakjalan wnt terutamanya MKK1 serta GSK3 β . Kedua-dua jenis protein kinase ini adalah bertanggungjawab dalam proses pembahagian sel dan gen transkripsi selepas dirangsangkan oleh faktor pertumbuhan. Jadi, perencat MAPK Kinase dan perencat GSK3 β adalah berpotensi untuk mengawal proliferasi sel kanser atau Alzheimer's disease (bagi kes GSK3 β) dan menyekatkannya daripada berlaku. Selain itu, sistem penyaringan untuk perencat MCK1 juga dicari dengan berdasarkan tapakjalan diaktifkan-kalsium.

Strain H7372 dapat merencatkan perhubungan antara protein Ras/Raf dan mengurangkan kuantiti MEK1/2 and ERK1/2 manusia yang difosforilasikan.

Manakala strain H7944 sebagai perencat Raf. Jadi, ia telah menjadi tumpuan kajian saya. Selain itu, ia juga akan dinyaringkan terhadap sistem penyaringan perencat GSK3 β manusia pada SC-uracil media dan MCK1 pada YPD media.

1.2 Matlamat atau tujuan utama kajian

Kajian ke atas aktinomiset strain H7372 (merupakan perencat Raf-Ras) dan strain H7944 (merupakan perencat Raf) telah dilakukan untuk mengetahui ciri-ciri (morfologikal dan fisiologikal) aktinomiset yang menghasilkan perencat-perencat protein kinases pada transduksi isyarat eukariotik. Selain itu juga menyaringkan perencat MKK1, perencat GSK-3 β manusia pada SC-uracil media dan perencat MCK1 pada YPD media.

1.3 Objektif untuk mencapai matlamat kajian

1. Untuk mendapatkan metabolit sekunder bagi aktinomiset yang diberi melalui fermentasi untuk menjalankan penyaringan.
2. Menjalankan penyaringan ke atas strain-strain aktinomiset yang diberi, untuk mengesahkannya menghasilkan perencat-perencat protein kinase.
3. Menjalankan penyaringan ke atas strain-strain aktinomiset untuk mendapatkan perencat GSK3 β dan MCK1 dari sistem penyaringan yang baru direka.
4. Mengkaji morfologikal dan fisiologikal pada strain aktinomiset H7372 dan H7944 yang diberi.

BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 Klasifikasi Aktinomiset

Aktinomiset merupakan bakteria yang ‘sebenar’ dengan ciri-ciri morfologi yang amat berbeza dengan fungi yang berfilamen (Mark, 1999). Sebelum perkataan aktinomiset diperkenalkan, ia telah dikelaskan sebagai satu kumpulan peralihan antara bakteria yang ringkas dan fungi, dengan ciri-ciri yang bertindih dengan sempadan bakteria dan fungi. Sehinggalah pada awal tahun 1950, order *Actinomycetales* telah dibentukkan untuk aktinomiset di bawah kajian morfologi, kimotaksonomi dan 16S rRNA. (Goodfellow, 1983).

Famili *Actinomycetales* telah terkenal sebagai mikroorganisma yang paling banyak digunakan dalam aplikasi bioteknologi dan juga sebagai subjek rujukan sebelumnya. Perhatian telah diberikan ke atas kumpulan aktinomiset adalah kerana kumpulan ini telah menghasilkan banyak metabolit sekunder yang penting untuk manusia. Contohnya ialah antibiotik, enzim dan perencat enzim yang pentingnya dalam komersial. (Labeda dan Shearer, 1990) Selain itu, ia juga sentiasa bersama dengan persekitaran dan keperluan manusia, jadi ia amat senang didapatkan. (Piret dan Demain, 1988)

Mengikut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9*, order *Actinomycetales* telah dibahagikan kepada 7 kumpulan. Mereka telah diklasifikasikan mengikut genera-genera masing-masing dengan ciri-ciri yang tersendiri seperti jenis dinding sel, susunan konidia, kehadiran sporangia , kandungan G+C dan sebagainya (Prescott *et al.*, 1993).

2.1.1 *Actinobacteria*

Bergram positif, bukan asid-fast, aktinomiset bergerak yang membentukkan substrat miselia yang fragmentasikan kepada unsur yang menyerupai rod dan coccoid, memerlukan nutrient yang banyak, menjalankan metabolisme karbohidrat jenis fermentasi dan berkembang secara fakultatif sehingga anaerobik. Genus-genusnya ialah *Actinomyces*, *Agromyces*, *Arachnia*, *Arcanobacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Promicromonospora*, *Renibacterium*, *Rothia* dan *Unassigned actinobacteria*. (Goodfellow *et al.*, 1983).

2.1.2 *Actinoplanetes*

Famili bagi *Actinoplanaceae* membentukkan hifa, bergram positif, tiada asid-fast, spora jenis bergerak atau tetap yang dihasilkan di antara sporangia dan membran spora. (Goodfellow *et al.*, 1983). Filamen yang stabil dibentukkan dengan sedikit atau tiada perkembangan aerial. Spora yang tetap dihasilkan dalam bentuk sporangia (*Actinoplates*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium* dan *Pilimelia*) atau spora jenis tetap yang tunggal (*Micromonospora*) atau dalam bentuk rangkaian (*Catellatospora*).

RUJUKAN

- Becker, B., Lechevalier, M. P. dan Lechevalier, H. A., 1965. Chemical Composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology* **13**, 236-243.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, W., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. dan Nusse, R., 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a wingless receptor. *Nature* **282**, 225-230.
- Blumer, K. J. dan Johnson, G. L., 1994. Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 236-239.
- Bousfield, I. D., Keddie, R. M., Dando, T. R. dan Shaw, S., 1985. Chemical composition and structure of murein. Dlm: M. Goodfellow dan David E. Minnikin (pnyt.) *Chemical Methods In Bacterial Systematics*, Academic Press, London, 201-219.
- Brenner, D. J., Staley J. T. dan Krieg, N. R., 2001. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. Dlm: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edisi-2. Boone DR, Castenholz RW (pnyt.), Springer-Verlag, 27-48.
- Tanji, C., Yamamoto, H., Yorioka, N., Kohno, N., Kikuchi, K. dan Kikuchi, A., 2002. A-Kinase Anchoring Protein AKAP220 Binds to Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) and Mediates Protein Kinase A-dependent Inhibition of GSK-3 β . *J. Biol. Chem.* **277**, 36955-36961.
- Cane, D. E., Walsh, C. T. dan Khosla, C., 1998. Harnessing the Biosynthetic Code: Combinations, Permutations, and Mutations. *Science* **282**, 63-68

- Carmichael, J., Sugars, K. L., Bao, Y., P. dan Rubinsztein, D. C., 2002. Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors Prevent Cellular Polyglutamine Toxicity Caused by the Huntington's Disease Mutation. *J. Biol. Chem.* **277**, 33791-33798.
- Chun, J., Youn, H. D., Yim, Y. I., Lee, H., Kim, M. Y., Hah, Y. C. dan Kang, S. O., 1997. *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology* **47**, 492-498.
- Cohen, P., 2002. Protein kinases- the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews* **1**, 209-315.
- Cooper, G. M. dan Hausman, R. E., 2003. Cell Signaling. *The Cell, A Molecular Approach*, third edition, ASM Press, Washington DC Sinauer Association, Inc. 523-570.
- Cross, T., Walker, P. D. dan Gould, G. W., 1968. Thermophilic actinomycetes producing resistance endospores. *Nature*, London **220**, 352-354.
- Cummins, C. S. dan Harris, H., 1956. A comparison of cell-wall composition in *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium* and *Propionibacterium*. *Journal of General Microbiology* **15**, ix-x.
- Cummins, C. S. dan Harris, H., 1958. Studies on cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *Journal of General Microbiology* **18**, 173-189.
- Demain, A. L., 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 455-463.
- Ding, V. W., Chen, R. H. dan McCormick, F., 2001. Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 β by Insulin and Wnt Signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 32475-32481.

- Doble, W. B. dan Woodgett, J. R., 2003. GSK-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* **116**, 1175-1186.
- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Jr. R. C. B., Woodgett, J. R. dan Mills, G. B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *PNAS* **97**, 11960-11965.
- Frame, S. dan Cohen, P., 2001. Review Article: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1-16.
- Goodfellow, M. dan Cross, T., 1983. Classification. *The Biology Of The Actinomycetes*. Academic Press, London, 8-131.
- Goodfellow, M. dan O'Donnell, A. G., 1993. Roots of Bacterial Systematics. *Handbook of New Bacterial Systematics*, 1st Edition, Academic Press Ltd, 31-39.
- Goodfellow, M., 2000. Microbial Systematics : Background and Uses. Dlm: Priest, F. G. dan Goodfellow, M. (pnyt.) *Applied Microbial Systematics*. Kluwer Academic Publishers, 1 – 13, 425 – 427.
- Goodfellow, M., Williams, S. T. dan Mordarski, M., 1983. Introduction to and Importance of Actinomycetes. *The Biology Of The Actinomycetes*. Academic Press, London, 1-5.
- Goodfellow, M., 1985. The Actinomycetes. Dlm: Niall A. Logan (pnyt.) *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications. 168-175.
- He, X., Saint-Jeannet, J. P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., dan Varmus, H., 1997. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-1654.

- Hirata, Y., Andoh, T., Asahara, T. dan Kikuchi, A., 2003. Yeast Glycogen Synthase Kinase-3 Activates Msn2p-dependent Transcription of Stress Responsive Genes. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 302-312.
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., dan Yoshida, T., 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* **151**, 249-255.
- Korn-Wendisch, F. dan Kutzner, H. J., 1992. The Family Streptomycetaceae. Dlm. Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. H. (pynt.). *The Prokaryotes*, Vol II. New York: Springer-Verlag, 921-995.
- Kroppenstedt, R. M., 1985. Fatty Acid and Menaquinone Analysis of Actinomycetes and Related Organisms. Dlm: M. Goodfellow dan David E. Minnikin (pynt.) *Chemical Methods In Bacterial Systematics*, Academic Press, London, 201-219.
- Küster, E. dan Williams, S. T., 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* **202**, 928-929.
- Kutzner, H. J., 1981. The Family Streptomycetaceae. In *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria* eds. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. & Schlegel, H. G., Berlin & New York, Springer-Verlag, 2028-2090.
- Labeda, D. P. dan Shearer, M. C., 1990. Isolation of Actinomycetes for Biotechnological Applications. *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. McGraw-Hill, Inc. US, 1-15.
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P. dan Gerber, N. N., 1971. Chemical composition as a criterion in the classification of actinomycetes. *Advance in Applied Microbiology* **14**, 47-72.

- Lingappa, Y. dan Lockwood, J. L., 1961. A chitin medium for isolation, growth and maintainance of actinomycetes. *Nature* **189**, 158.
- Link, J. T., Raghavan, S., Gallant, M., Danishefsky, S. J., Chou, T. C dan Ballas, L. M., 1996. *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 2825.
- Locci, R., 1981. Morphology : Micromorphology and Development of Actinomycetes. Dlm: Klaus P. Schaal dan Gerhard Pulverer (pnty.) *Actinomycetes*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 119 – 130.
- Lomovskaya, N., Doi-Katayama, Y., Filippini, S., Nastro, C., Fonstein, F., Gallo, M., Colombo, A. L. dan Hutchinson, C. R., 1998. The *Streptomyces peucetius* *dpsY* and *dnrX* Genes Govern Early and Late Steps of Daunorubicin and Doxorubicin Biosynthesis. *J Bacteriol* **180**(9), 2379-2386.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. dan Parker, J., 1997. Microorganisms and Microbiology, *Brock Biology of Microorganisms*, 9th Edition, Prentice Hall Publishers, 1-28.
- Mark, C., 1999. Filamentous Prokaryotes – Actinomycetes. *Soil Microbiology An Exploratory Approach*. Delmar Publishers, 101-110.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyaoka, R. dan Miyakawa, T., 2001. GSK-3 Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast. *The EMBO Journal* **29**, 1074-1085.
- Minnikin, D. E., Alshamaony, L. dan Goodfeelow, M., 1975. Differentiation of Mycobacterium, Norcadia and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *Journal of General Microbiology* **88**, 200-204.
- Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G., Caldicott, A. B. dan Goodfellow, M., 1980. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Chromatography* **188**, 221-233.

- Minnikin, D. E. dan O'Donnell, 1983. Actinomycete Envelope Lipid and Peptidoglycan Composition. *The Biology Of The Actinomycetes*. Academic Press, London, 337-382.
- Nolan, R. D. dan Cross, T., 1988. Isolation and Screening of Actinomycetes. Dlm: Goodfellow, M., Williams, S. T. dan Mordarski, M. (pnyt.) *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, US, 1-25.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. dan Masuma, R., 1977. *J. Antibiotics* **30**, 275.
- Omura, S., Sasaki, Y., Iwai Y. dan Takeshimi, H., 1995. *J. Antibiotics* **48**, 535
- Piret, J. M. dan Demain, A. L, 1988. Actinomycetes in Biotechnology : An Overview. Dlm: Goodfellow, M., Williams, S. T. dan Mordarski, M. (pnyt.) *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, US, 461 – 479.
- Polakis, P., 2000. Wnt Signaling and Cancer. *Genes & Development* **14**, 1837-1851.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. dan Klein, D. A., 1993. *Microbiology*. Ed. Ke-2. Dubuque : Wm. C. Brown.
- Priest, F. dan Austin, B., 1993. *Modern Bacterial Taxonomy*, 2nd Edition, Chapter 1, Chapman & Hall, London.
- Rayner, T. F., Gray, J. V. dan Thorner, J. W., 2002. Direct and Novel Regulation of cAMP-dependent Protein Kinase by Mck1p, a Yeast Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 16814-16822.
- Schaal, K. P., 1985. Identification of Clinically Significant Actinomycetes and Related Bacteria Using Chemical Techniques. Dlm: Goodfellow, M. dan Minnikin, D. E. (pynt.) *Chemical methods in Bacterial Systematics*, 359-381.

- Schaal, K. P. dan Pulverer, G., 1981. The genera Actinomyces, Agromyces, Arachnia, Bacterionema, and Rothia. In *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Dlm: Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. & Schlegel, H. G. (pnyt). Berlin and New York, Springer-Verlag, 1923-1950.
- Schleifer, K. H. dan Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* **36**, 407-477.
- Shirling, E. B. dan Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst Bacteriol* **16**, 313-340.
- Slack, J. M. dan Gerenscer, M. A., 1975. *Actinomyces, Filamentous Bacteria*. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publing Co.
- Staneck, J. L. dan Robert, G. D., 1974. *Applied Microbiology* **28**, 226-231.
- Tresner, H. D. dan Backus, E. J., 1963. System of color wheels for streptomycetes taxonomy. *Applied Microbiology* **11**, 335-338.
- Tresner, H. D., Hayes, J. A. dan Backus, E. J., 1968. Differential tolerance of streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic acid. *Applied Microbiology* **16**, 1134-1136.
- Vining, L. C., 1990. Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology* **44**, 395-427.
- Watanabe, Y., Irie, K. dan Matsumoto, K., 1995. Yeast *RLM1* Encodes a Serum Response Factor-Like Protein That May Function Downstream of the Mpkl (Slt2) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **15** (10), 5740-5749.

Wilkinson, M. G. dan Millar, J. B. A., 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *The Faseb Journal* **14**, 2147-2157.

Williams, S. T. dan Wellington, E. M. H., 1980. Micromorphology and Fine Structure of Actinomycetes. Dlm: M. Goodfellow dan R.G. Board (pnyt.) *Microbiological Classification and Identification*. Academic Press, 139 – 160.

Williams, S. T., Goodfellow, M. dan Alderson, S., 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL, p. 2452-2492. In Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Wilson, K. H., Blitchington, R. B. dan Greene, R. C., 1990. "Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction", *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 1942-1946.

Woose, C. R., 1987. "Bacterial evolution", *Microbiological Reviews* **51**, 221-271.

Yu, T. W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B. S., Hutchinson, C. R. dan Floss, H. G., 1999. Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**(16), 9051-9056.

Zhang, Q., Li, W. J., Cui, X. L., Li, M. G., Xu, L. H. dan Jiang, C. L., 2003. *Streptomyces yunnanensis* sp. nov., a mesophile from soils in Yunnan, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **53**, 217-221.