

4000005601



PENCIRIAN BAHAN KIMIA DAN PENYARINGAN AKTIVITI BIOLOGI  
STRAIN H7393 DALAM PERENCATAN MAPK KINASE DAN GSK3 DALAM  
TRANSDUKSI ISYARAT SEL EUKARIOTIK

HADIAH

PHANG CHEE YONG

TESIS 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

2004

PERPUSTAKAAN UMS



1400005601

## UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Pencirian Bahen Kimia Dan Penyaringan Aktiviti BrologiSTRAIT 4739B Dalam Perencutan MAPK Kinase dan GSK-3Dalam Transduksi Isyarat Eukariotik -Ijazah: DegreemSESI PENGAJIAN: 2004Saya Phang chee Yang

(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 sabaja.
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: 93, LORONG 1 MURHI 21  
TAJAMAH DESA MURHI, SG DUA  
1800 BUTTERWORTH

Nama Penyelia

Tarikh: 12 - 3 - 2004

Tarikh: \_\_\_\_\_

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 diklasaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

③ 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 March 2004

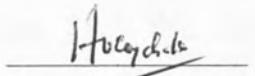


PHANG CHEE YONG

HS2001-1677

**PENGAKUAN PEMERIKSAAN****DIPERAKUKAN OLEH****Tandatangan****1. PENYELIA**

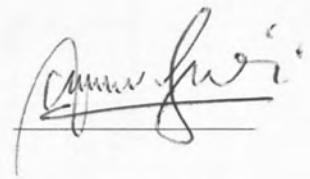
( Prof. Ho Coy Choke )

**2. PEMERIKSA 1**

( Dr Roziah Kambul )

**3. PEMERIKSA 2**

( Dr Jualang Azlan Gansau )

**4. DEKAN**

( Prof Madya Dr. Amran Ahmed )



## PENGHARGAAN

Dengan ikhlasnya saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Prof Ho Coy Choke yang sanggup menyelia saya selama ini dengan banyak memberikan nasihat kepada saya sepanjang kajian projek ini. Penghargaan juga dicurahkan kepada Prof Datuk Dr Kamaruzaman Ampom, Prof Dr Perumal Ramasamy, Prof K. Paranjothy, Dr. Jualang Azlan Gansau, Dr Lee Ping Chin, Dr Zaleha Abdul Aziz dan Dr. Roziah Kambol yang iklas mencerahkan ilmu pengetahuan dan tunjuk ajar sepanjang pengajian saya di UMS.

Selain itu, saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada senior-senior Eric Lai Ngit Shin, Foo Sek Hin, Simon Ong, Phuah Seok Hwa dan Hew Chew San yang sering memberi bantuan dan tunjuk ajar kepada saya selama ini yang membolehkan saya menyempurnakan projek dengan sempurna.

Akhir sekali, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan seperjuang saya terutamanya Gan Chai Pei, Tay Chiew Hong, Yeoh Chin Keong dan Yeoh Seok Har atas bantuan dan sokongan yang diberikan.

## ABSTRAK

Strain aktinomiset H7393 merupakan perencat yang berpotensi dalam merencat yis mutan Mkk1<sup>p386</sup>. Fokus kajian ini adalah menyambungkan penyelidikan ke atas strain H7393 yang dilakukan oleh Cheah.H.Y.(2003) dalam tesisnya "Isolation of Actinomycetes from mangrove in sabah and screening for inhibitor against eukaryotic signal transduction". Strain H7393 dipencarkan dalam medium mannitol-pepton secara aerobik untuk penghasilan metabolisme sekunder dan diekstrakan oleh aseton. Ekstrak aseton aktinomiset H7393 menunjukkan penghadiran perencat yis mutan Mkk1<sup>p386</sup> dengan pertumbuhan yis mutan sekitar kertas whatman berekstrak pada kedua-dua piring glukosa dan galaktosa. Ekstrak H7393 kemudian dikering bekukan menjadi serbuk dan dilarutkan dalam air suling dalam kuantiti yang sedikit supaya jadi pekat untuk menjalankan kromatografi TLC. Dalam ujian kromatografi TLC didapati sistem pelarut metanol dan air dengan nisbah 4:1 dapat memisahkan kompoun-kompoun kepada dua tompok dengan nyata dengan nilai  $R_f$  kompoun pertama berada dalam lingkungan 0.6 hingga 0.8 dan nilai  $R_f$  kompoun kedua berada dalam lingkungan 0.3 hingga 0.5. Dalam sistem penyaringan perencat GSK-3 $\beta$  manusia pula, sebanyak 114 ekstrak strain aktinomiset telah diuji dalam sistem penyaringan perencat yis mutan Yep24-MCK1 dan sistem penyaringan perencat yis mutan YCp-BUL1. Keputusan mendapat strain H7667 merupakan perencat GSK-3 $\beta$  manusia, strain H11110 serta strain H8985 merupakan perencat kepada GSK-3 $\beta$  manusia dan perencat Bull1. Strain H8934, H7944, H8604, H8996, H11013 dan H11111 merupakan toksik kepada GSK-3 $\beta$  manusia dan Bull1.



## ABSTRACT

The actinomycete strain H7393 is potential inhibitor for yis mutant Mkk1<sup>p386</sup>. The focus of this research is to continue Cheah.H.Y.(2003) research's on strain H7393 which done in her thesis 'Isolation of Actinomycetes from mangrove in Sabah and screening for inhibitor against eukaryotic signal transduction'. Strains H7393 were grown in mannitol-peptone medium aerobically to produce secondary metabolites. The secondary metabolites then extract by acetone. The acetones extract of actinomycete H7393 showing inhibition in MAPK Kinase screening. H7393 extract is then freeze dry into powder and is dissolved in distilled water to test on thin layer chromatography. Purpose of thin layer chromatography is to separate the compounds in the strain actinomycete H7393. We found that the solvent system comprising methanol and water at ratio 4:1 can separated the compound clearly with its  $R_f$  value for the first spot is between 0.6 and 0.8. while the  $R_f$  value for the second spot is between 0.3 and 0.5. In the screening system for human GSK-3 $\beta$  inhibitor, a total of 114 extract strain actinomycete had been tested on the screening system for human GSK-3 $\beta$  inhibitor and yeast Bull1 inhibitor. The result for the both screening system, the extract of strain H7667 has been found as inhibitor of human GSK-3 $\beta$ . While the extract of strain H11110 and strain H8985 was found as both the inhibitor of human GSK-3 $\beta$  and yeast Bull1. The strain H8934, H7944, H8604, H8996, H11013 and H11111 has been found as toxic to both the screening system of human GSK-3 $\beta$  and yeast Bull1

## **KANDUNGAN**

Muka Surat

PENGAKUAN

PENGAKUAN PEMERIKSA

SENARAI KANDUNGAN

SENARAI JADUAL

SENARAI RAJAH

SENARAI FOTO

SENARAI SINGKATAN

### **BAB 1 PENDAHULUAN**

### **BAB 2 ULASAN LITERATUR**

2.1	Ciri-ciri aktinomiset	5
	2.1.1 Streptomyces	6
2.2	Metabolit Sekunder	7
2.3	Transduksi Isyarat	8
2.4	Protein Kinase	11
2.5	Laluan MAPK Kinase dalam Kanser Manusia	14
2.6	GSK3	15
2.7	Sasaran Penyaringan Perencat MAPK Kinase	16
2.8	Sasaran penyaringan perencat GSK3 yis	18
	2.8.1 Penyaringan Perencat Yis Mutan Yep24-MCK1	18
	2.8.2 Sistem Penyaringan Perencat Yis Mutan YCp-BUL1	19



### **BAB 3 RADAS, BAHAN DAN KAEADAH**

3.1	Strain	23
3.1.1	Strain Aktinomiset H7393	23
3.1.1	Strain Yis Mutan, $Mkk1^{P386}$	23
3.1.2	Strain Yis Mutan dengan YE <sub>p</sub> 24-MCK1	24
3.1.3	Strain Yis mutan dengan YCp-BUL1	24
3.2	Pensterilan Radas	25
3.3	Pengkulturan Strain	25
3.3.1	Pengkulturan Aktinomiset Dalam Agar Oatmeal	25
3.3.2	Pengkulturan Yis $Mkk1^{P386}$	26
3.3.3	Pengkulturan Strain Yis Mutan YE <sub>p</sub> 24-MCK1 Dan YCp-BUL1 Dalam YPD Media	26
3.4	Penyimpanan Kultur Tulen Dalam Stok Gliserol	27
3.5	Fermentasi	27
3.5.1	Fermentasi Dalam Media Mannitol Pepton	27
3.5.2	Fermentasi Yis $Mkk1^{P386}$	27
3.6	Pengekstrakan Metabolit Sekunder	28
3.7	Sistem Penyaringan Perencat MAPK Kinase Dengan Strain Yis $Mkk1^{P386}$	28
3.8	Sistem Kromatografi Lapisan Nipis	29
3.9	Sistem Penyaringan Perencat GSK3 Yis Dengan Strain Yis Mutan YE <sub>p</sub> 24-MCK1 Dalam Media SC-Ura	31
3.10	Sistem Penyaringan Perencat GSK3 Yis Dengan Strain Yis Mutan YCp-BUL1 Dalam Media SC-Ura	32



**BAB 4 KEPUTUSAN**

4.1 Pengkulturan Strain aktinomiset	33
4.2 Fermentasi aktinomiset untuk metabolit sekunder	35
4.3 Sistem Penyaringan Perencat MAPK Kinase Dengan Strain Yis Mkk1p386	35
4.4 Sistem Kromatografi Lapisan Nipis	37
4.5 Sistem Penyaringan Perencat GSK-3 $\beta$ Manusia Dengan Strain Yis Mutan YEp24-MCK1	41
4.6 Sistem Penyaringan Perencat Yis Mutan YCp-BUL1	43

**BAB 5 PERBINCANGAN**

5.1 Pengkulturan Strain	44
5.2 Fermentasi dan pengekstrak metabolit sekunder	45
5.3 Sistem Penyaringan Perencat MAPK Kinase	46
5.4 Sistem kromatografi TLC	47
5.5 Sistem Penyaringan Perencat GSK-3 $\beta$ Manusia Dengan Strain Yis Mutan YEp24-MCK1	48
5.6 Sistem Penyaringan Perencat Yis Mutan YCp-BUL1	51

**KESIMPULAN**

53

**RUJUKAN**

55

## SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Antibiotik yang disintesiskan daripada <i>Streptomyces</i>	6
2.2 Keputusan yang dijangka jika perencat GSK3 hadir	20
4.1 Pemerhatian strain aktinomiset pada agar oatmeal	34
4.2 Keputusan ujian penyaringan perencat MAPK kinase dengan Yis Mutan Mkk1 <sup>p386</sup>	35
4.3 Keputusan Kromatogram TLC dari 1-5	38
4.4 Keputusan Kromatogram TLC dari 6-10	39
4.5 Keputusan Kromatogram TLC dari 11-13	40
4.6 Keputusan Penyaringan Perencat GSK-3 $\beta$ Manusia ( Perencat)	41
4.7 Keputusan Penyaringan Perencat GSK-3 $\beta$ Manusia ( Toksik )	42
4.8 Sistem Penyaringan Perencat Yis Mutan YCp-BUL1	43



## SENARAI RAJAH

No. rajah	Muka Surat
2.1 katalisis ATP kepada CAMP suatu siri transduksi isyarat	9
2.2 Kaskade MAPK dalam Sistem Tranduksi Isyarat Yis	12
2.3 Laluan MAPK Bagi Yis Tunas Dan Sel Mamalia	13
2.4 Sistem Penyaringan Perencat MAPK Kinase	17
2.5 Sistem Penyaringan Perencat Yis Mutan Yep24-MCK1	18
2.6 Penyaringan Perencat Yis Mutan YCp-BUL1	19
2.7 Model menunjukkan interaksi antara GSK3, Bul1/Bul2 dan Rsp5	21
4.1 Kromatogram TLC bagi ekstrak H7393	37
4.2 Kromatogram TLC bagi ekstrak H7393	38
4.3 Kromatogram TLC bagi ekstrak H7393	39
5.1 Model menunjukkan interaksi antara GSK3, Bul1/Bul2 dan Rsp5	49

**SENARAI FOTO**

4.1	Strain H7393 yang dikulturkan pada agar oatmeal piring petri	33
4.2	Keputusan ujian penyaringan perencat MAPK kinase	36
4.3	keputusan Penyaringan Perencat GSK-3 $\beta$ manusia	42
4.4	Keputusan Penyaringan Perencat Yis Mutan YCp-BUL1	44



## SENARAI SINGKATAN

$^{\circ}\text{C}$	Darjah Celcius
%	Peratus
$\mu\text{l}$	Mikroliter
L	Liter
M	Molar
mg	Mikrogram
ml	Mililiter
mm	Milimeter
No.	Nombor
psi	Poun per Inci Persegi
rpm	Putaran per Minit
s	Saat
sp	Spesies
w/v	Berat per Isipadu
g	Gram
ATP	Adenosine Trifosfat
GTP	Guanosine Trifosfat
GDP	Guanosine Difosfat
G + C	Guanine + Cytosina
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase



MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
UV	Ultraviolet
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PBS	Larutan Penimbal Sulfat



## BAB 1

### PENDAHULUAN

Aktinomiset merupakan mikroorganisma yang terkenal sebagai penghasil metabolit sekunder yang penting dalam bidang industri ataupun dalam bidang perubatan. Kebanyakkannya boleh dijumpai dalam tanah yang bersifat alkali atau neutral, kaya dengan humus dan mempunyai sistem pengudaraan yang bagus, namun begitu terdapat juga sebilangan kecil aktinomiset yang boleh dijumpai pada habitat akuatik. (Parker 2000).

Bagi bakteria aktinomiset, tujuan utama metabolit sekunder dihasilkan ialah bertindak sebagai antibiotik yang toksik atau merencatkan pertumbuhan bakteria lain ataupun fungi di persekitarannya bagi mengurangkan persaingan untuk mendapatkan nutrien dan ruangan untuk bertumbuh. Tatapi bagi ahli saintis pula, metabolit sekunder ini merupakan agen anti tumor, agen anti immunosupresif, antibiotik dan agen-agen lain telah memainkan peranan yang penting dalam bidang perubatan dan perindustrian (Parker 2000).

Semua organisme dan mikroorganisma mempunyai tindak balas/rangsangan terhadap isyarat daripada persekitaran. Dalam tindak balas ini, isyarat yang diterima akan ditransduksikan dari permukaan sel hingga ke dalam sel menerusi satu laluan yang

dikenali sebagai laluan transduksi isyarat. Dalam sel eukariot, modul MAPK memainkan peranan penting dalam transduksikan isyarat antara permukaan sitoplama cell dan nukleus sel. Dalam modul ini, isyarat dari persekitaran akan mengaktifkan ‘cascade’ MAPK melalui reseptor serine/ threonine kinase. Reseptor ini akan mengaktifkan protein-protein lain yang terletak berhampiran dengannya. Lantaran itu, proses pemfosforilan atau pendefosforilan yang melibatkan protein kinase MAPK, MAPKK dan MAPKKK akan berlaku yang menyebabkan fenomena pengubahsuai kepada pengekspresan gen dan aktiviti protein yang akan menghasilkan satu tindak balas selular terhadap rangsangan tersebut (Gustin *et al.*, 1998).

Kebanyakkan penyakit kanser adalah disebabkan kegagalan untuk mengawal pertumbuhan dan pembahagian sel secara normal. Ini mungkin disebabkan oleh laluan MAPK Kinase yang gagal berfungsi dengan normal, lantaran itu akan menyebabkan gangguan ke atas regulasi protein-protein kinase. Maka pengkajian perencat langsung atau tidak langsung laluan MAPK Kinase ini merupakan satu sasaran yang penting untuk menghasilkan agen anti kanser yang penting (Cohen,2002).

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) merupakan serine/threonine kinase yang menjalankan pemfosforilan untuk menyahaktifkan glikogen synthase yang akan mengaktifkan protein fosfatase ATP-Mg-dependent jenis 1.Yis mempunyai 4 gen *MCK1*,*MDS1*,*MRK1* dan *YOL128c* yang menunjukkan homologi kepada GSK3 dalam sel mamalia. Selain itu GSK3 yis memainkan peranan yang penting dalam meiosis dan mitosis sel. (Andoh *et al.*, 2000)

Protein GSK3 memainkan peranan dalam mitosis dan meiosis sel, oleh itu laluan protein GSK-3 $\beta$  manusia turut dikaji untuk memahami sistem transduksi isyarat sel eukariotik. Dalam kajian, pemencilan dan penyaringan perencat GSK-3 $\beta$  manusia dijalankan dengan mengenalpasti perencat-perencat yang boleh merencatkan GSK3 - *mck1*, iaitu gen mutan yang membolehkan pertumbuhan yis pada suhu tinggi (37°C) dalam ‘Synthetic Complete’ media tanpa kehadiran urasil (Andoh *et al.*, 2000).

Tujuan utama kajian ini dijalankan adalah mengkaji aktiviti kimia dan biologi perencat MAPK kinase daripada metabolit sekunder aktinomiset iaitu daripada strain H7393. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan media bioassai yis Mkk1<sup>p386</sup> untuk mengenalpasti kehadiran perencat, seterusnya menjalankan TLC dan HPLC untuk memisahkan kompoun-kompoun ekstrak metabolit sekunder aktinomiset. Selepas itu sifat-sifat aktiviti kimia dan biologi perencat MAPK kinase akan dikaji, serta kompoun-kompoun dalam ekstrak metabolit sekunder actinomiset yang menjadi faktor perencat akan dikenalpasti.

## BAB 2

### ULASAN LITERATUR

#### 2.1 Ciri-ciri aktinomiset

Aktinomiset merupakan sekumpulan bakteria gram positif yang aktif secara metabolit, mempunyai kandungan G + C yang tinggi iaitu melebihi 55% dalam DNA. Aktinomiset juga merupakan bakteria aerobik yang membentuk filamen bercabang atau spora aseksual (Alexander, 1997). Menurut Parker dalam bukunya ‘Brock Biology Of Microorganisms’ didapati filamen bercabang aktinomiset iaitu miselia mempunyai ciri-ciri analog yang sama dengan miselia yang dihasilkan oleh kulat.

Kebanyakkan aktinomiset boleh dijumpai dalam tanah yang bersifat alkali atau neutral, kaya dengan humus dan mempunyai sistem pengudaraan yang bagus, namun begitu terdapat juga sebilangan kecil aktinomiset yang boleh dijumpai pada habitat akuatik seperti kolam atau lumpur sungai. Kebanyakkan aktinomiset hidup secara aerob dan saprofit dalam tanah, ia boleh menghasilkan enzim ekstraselular untuk mendegradasikan makromolekul kompleks/ dan substrat organik yang terdapat dalam tanah. (Lee *et al.*, 2000)



**UMS**  
UNIVERSITI  
MALAYSIA  
SABAH

### 2.1.1 Streptomyces

Aktinomiset boleh dibahagikan kepada banyak genus antara ialah *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* dan lain-lain. Diantara genus –genus tersebut *Streptomyces* merupakan kumpulan aktinomiset yang paling besar. Ia mengandungi kandungan G + C yang tinggi 69 -73 % dan mempunyai cabang spora yang panjang, mempunyai diameter filamen dari 0.5 hingga 1.0 $\mu$ m dan membentuk spora yang digelar konidia (Weaver, 1999). *Streptomyces* boleh diklasifikasikan berdasarkan kepada warna, bentuk dan cara susunan miselia aerial serta sporanya. Selain itu, ciri- ciri fisiologi seperti pigmentasi oleh miselia aerial dan miselia vegetatif juga boleh digunakan.

*Streptomyces* bukan sahaja merupakan organisma utama yang hidup dalam tanah, malahan bau–bau tanah merupakan bau-bau yang dihasilkan oleh metabolit sekunder *Streptomyces* yang digelar geosmins. Geosmin merupakan kompoun yang terdiri daripada sebatian karbon, oksigen dan hidrogen.. Struktur geosmin yang umum ialah trans-1,10dimetil-trans-9-decalol. Selain daripada *Streptomyces* geosmin juga dihasilkan daripada sianobakteria. (Parker, 2000 )

*Streptomyces* biasa didapati pada tanah yang mempunyai pH yang neutral dan beralkali, tanah yang mempunyai sistem pengudaraan yang baik. Selain itu, juga terdapat hipotesis yang mencadangkan *Streptomyces* hanya memerlukan keperluan air yang kurang untuk tumbuh berbanding dengan bakteria-bakteria tanah yang lain. Ini menyebabkan *Streptomyces* amat senang dipencarkan dan ditumbuhkan dalam piring petri

beragar. Mediumnya hanya memerlukan sumber karbon seperti gula, alkohol, asid organik, asid amino dan kompoun aromatik untuk bertumbuh. (Parker, 2000 )

*Streptomyces* juga menghasilkan sebatian metabolit sekunder yang boleh dijadikan sebagai antibiotik dalam bidang perubatan, terdapat penyelidikan yang menyatakan lebih daripada 500 jenis antibiotik telah dihasilkan daripada *Streptomyces*, oleh itu *Streptomyces* sangat penting dalam bidang perindustrian dan perubatan. Jadual 2.1 dibawah menunjukkan beberapa jenis contoh antibiotik hasilan *Streptomyces*. Antibiotik ini boleh dikelaskan mengikut struktur kimia molekul-molekul utama antibiotik tersebut.

**Jadual 2.1 Antibiotik yang disintesiskan daripada *Streptomyces***

Pengelasan Kimia	Secara	Nama Biasa	Dikeluar oleh
Aminoglikosida		Streptomisin	<i>S. griseus</i>
		Spektinomisin	<i>Streptomyces</i> spp.
		Neomisin	<i>S. fradiae</i>
Tetrasikline		Tetrasikline	<i>S. aureofaciens</i>
		Klotetrasiklin	<i>S. aureofaciens</i>
Macrolide		Erithromisin	<i>S. erythreus</i>
		Klindamisin	<i>S. lincolnensis</i>
Poliene		Nistatin	<i>S. noursei</i>
		Amfocitin B	<i>S. nodosus</i>
Tiada		Kloramfenikol	<i>S. venezuelae</i>

(Parker, 2000)

Strain bakteria H7393 yang digunakan dalam kajian ini, merupakan sampel *Streptomyces* yang didapati daripada tanah dan ia juga menunjukkan kesan positif dalam merencatkan pertumbuhan yis mutan Mkk1 pada sekitarnya (Cheah,2003). Oleh itu, metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Streptomyces* yang dikaji merupakan antibiotik yang berpotensi untuk mengubati penyakit.

## 2.2 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder ditakrifkan sebagai produk daripada proses sintetik yang tidak memainkan peranan dalam laluan metabolit organisma tersebut. Ia tidak terlibat dalam pertumbuhan pembibakan atau fungsi lain dalam organisma tersebut. Walau bagaimanapun, metabolit-metabolit sekunder ini mempunyai peranan yang penting dalam bidang perubatan. Contoh –contoh metabolit sekunder adalah seperti antibiotik, agen antitumor yang digunakan dalam rawatan kanser dan perencat enzim dalam suatu industri (Higgs *et al.*, 2000). Dalam aktinomiset, metabolit sekunder bertindak sebagai antibiotik yang toksik atau merencatkan pertumbuhan bakteria lain ataupun fungi di persekitarannya bagi mengurangkan persaingan untuk mendapatkan nutrien dan ruangan untuk bertumbuh (Campbell, 1996).

Penghasilan metabolit sekunder sering kali dikaitkan dengan sporulasi, biasanya metabolit sekunder dihasilkan pada fasa ‘stationery’ dalam kitar sel dimana pertumbuhan

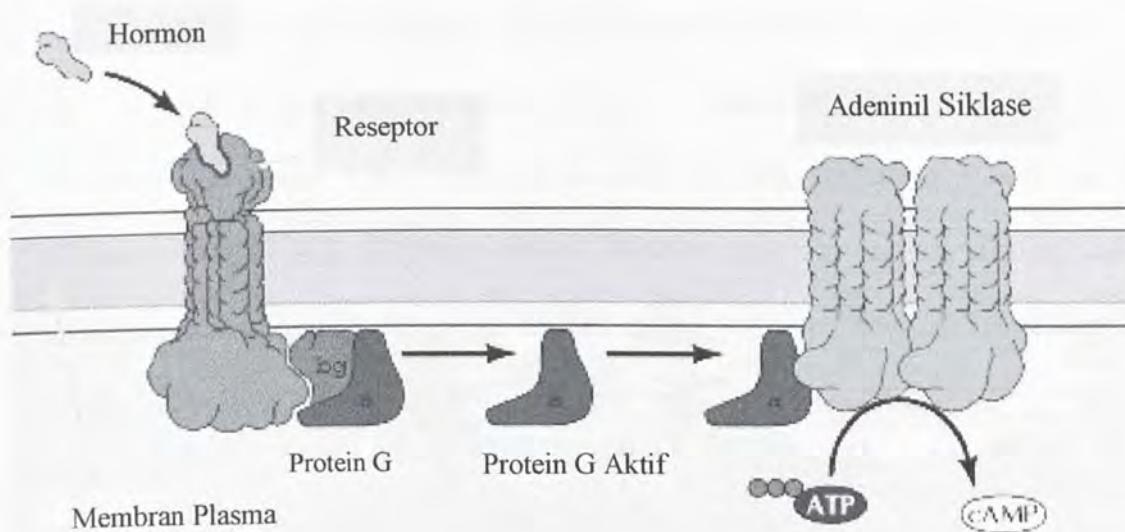
aktif sel berhenti. Oleh itu kadar penghasilan metabolit sekunder adalah bergantung kepada kadar pertumbuhan sel dan komposisi medium yang digunakan.

Kebanyakan metabolit sekunder ialah molekul organik kompleks yang memerlukan banyak tindak balas enzim untuk proses sintesis. Menurut buku ‘Brock Biology Of Microorganisms’ lebih kurang 72 prosedur yang perlu dijalankan untuk mensintesiskan antibiotic *tetracycline* manakala lebih kurang 25 langkah diperlukan untuk mensintesiskan antibiotik *erythromycin*. Tindak balas ini tidak akan berlaku pada penghasilan metabolit primari. (Bos, 2000)

### 2.3 Transduksi Isyarat

Transduksi isyarat merupakan suatu proses tindak balas sel terhadap rangsangan dari persekitaran. Dalam tindak balas ini suatu isyarat dipancarkan dari keadaan luar sel ke dalam sel. Molekul-molekul tambahan sel seperti faktor pertumbuhan, sitokin, neurotransmitters ataupun hormon akan bergabung dengan suatu receptor yang spesifik yang menghubungkan matriks dengan sitoskeleton yang berada pada luar permukaan sel. Receptor ini seperti tirosine kinase, tirosine fosfatase dan serine/threonin kinase membolehkan isyarat yang ditransduksikan dipancarkan dalam bentuk ion yang kecil samada dari atau ke luar sel (Bos, 2000).

Pergerakan ion ini akan mengaktifkan protein G yang bergabung dengan reseptor, protein G ini seterusnya akan berpisah dari reseptor dan membawa isyarat ke sasaran intra sel yang akan mengakibatkan aktiviti selular dan pengekspresan gen yang akan menghasilkan tindak balas selular terhadap rangsangan sel (Cooper, 1997).



**Rajah 2.1 Menunjukkan katalisis ATP kepada CAMP suatu siri transduksi isyarat**  
(Cooper, 1997)

Protein G merupakan receptor yang terletak di membran sel dan mempunyai 7 lapisan transmembran yang menerusi membran sel. Reseptor yang ditunjukkan dalam rajah merupakan reseptor *serpentine* iaitu reseptor-reseptor seperti reseptor adrenergic, reseptor odorant dan beberapa jenis hormon. Selain itu, protein G terdiri daripada 3 subunit iaitu subunit  $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$  yang juga dikenali sebagai protein G heterotrimeric.

## RUJUKAN

- Andoh T., Hirata Y., dan Kikuchi A.** 2000. Yeast Glycogen Synthase Kinase 3 Is Involved In Protein Degradation in Cooperation with Bul1,Bul 2 and Rsp. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 6712-6720.
- Alexander M.** 1977. *Introduction soil microbiology 2nd Edi.* John Wiley And Son. Canada.
- Blumer K. J. And Johnson G. L.** 1994. Diversity In Function and Regulation of MAP Kinase Pathways. *Science.* **19:** 236-239.
- Brunet A., and Pouyssegur J.** 1996. Identification of MAP Kinase Domain By Redirecting Stress Signal into Growth Factor Response. *Science.* **272:** 1652- 1655.
- Bos J. L.** 2000. *Molecular Mechanisms of Signal Transduction.* IOS Press Publisher. Washington D.C.
- Campbell N. A.** 1996. *Biology Fourth Edition Campbell.* The Benjamin/ Cumming Publisher. California.
- Cohen P.** 2002. Protein Kinase- The Major Drug Targets Of The Twenty First Century. *Nature Review.* **1:**309-315.
- Cooper G.M.,** 1997. *The Cell: A Molecular Approach.* Oxford Universiti Press. Oxford.
- Davis J. H., and Sheldon G. F.** 1995. *Surgery “A Problem Solving Approach 2<sup>nd</sup> Edi.” .* Mosby- Year Book. Inc.

**Delaney A. M., Printen. J. A., Chen Huifen, Fauman E. B., and Dudley D. T.** 2002. Identification of novel Mitogen –Activated Protein Kinase Kinase activation domain recognized by the inhibitor PD184352. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 7593-7602.

**Dennis D. T., Turpin D. H., Lefebvre D. D., and Layzell D. B.** 1997. *Plant Metabolisms at Signal Transduction*. Addison Press Publisher. Washington D.C.

**Dudley D. T., Pang L., Decker S. J. Bridges A. J., and Saltiel A. R.** 1995. A Synthetic Inhibitor Of The Mitogen Activated Protein Kinase Cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 7686-7689.

**English J. M., and Cobb M. H.** 2002. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* **23:** 40-45.

**Es. J. H V., Barker N., and Clevers H.** 2003. You Wnt some, You lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Current Opinion in Gen. and Dev.* **13:** 28 - 33.

**Favata M. F., Horiuchi K. Y., Manos E. J., Daulerio A. J., Stradley D. A., Feeser W. S., and Trzaskos.** 1998. Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen Activated Protein Kinase Kinase. *Biol. Chem. J.* **29:**18623-18632.

**Gustin M. C., Albertyn J., Mathew A. and Davenport K.** 1998. MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology And Mol. Biol. Review.* **62:**1264-1300.

**Hai L. P., Kyeong T. P., Jeong H. L., Shin G. K., Jing B. J., Sung H. K., and Hwang.** 1999. An Arabidopsis GSK3/shaggy Like Gene That Complements Yeast Salt Stress Sensitive Mutant Is Induced By NaCl and Abscisic Acid. *Plant Physiology.* **119:** 1527-1534.

**Higgs R. E., Zahn J. A., Gygi J. D., and Hilton M. D.** 2001. Rapid Method To Estimate The Presence Of Secondary Metabolites in Microbial Extracts. *AEM*. **67**: 371-376.

**Ho C.C.** 2003. *Molecular Cell Biology, Biodiversity and Biotechnology*. Universiti Malaysia Sabah. Kota Kinabalu.

**Howard G. C., and Brown W. E.** 2001. *Modern Protein Chemistry (Practical Aspect)*. CRC Press Publisher. London.

**Kleijn M., and Proud C. G.** 2000. The activation of eukaryotic initiation factor (elf) 2B by growth factor in PC12 cell requires MEK/ERK signaling. *FEBS Letter*. **476**: 262-265.

**Klug W. S., and Cumming M. R.** 1997. *Genetic 5<sup>th</sup> Edi*. Prentice Hall Publisher. New Jersey.

**Kolch W.** 2000. Meaningful Relationship : The Regulation Of The Ras/Raf/MEK/ERK Pathway By Protein Interactions. *Biochem J*. **351**: 289-305.

**Lee S. D., Kang S. O., and Hah Y. C.**, 2000. Catellatospora koreensis sp. Nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave. *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1103-1111.

**Lewis T. S., Hunt J. B., Aveline L. D., Jonscher K. R., Louie D. F., Yeh J. M., Nahreini T. S., Resing K. A., and Ahn N. G.** 2000. Identification of Novel MAP Kinase Pathway Signaling Targets by Functional Proteomics and Mass Spectrometry. *Molecular Cell*. **6**: 1343-1354.

**Mathew, and Holde V.** 1995. *Biochemistry Second Edition*. The Benjamin/ Cumming Publisher. New York.

- Mizunuma M., Hirata D., Miyaoka R., and Miyakawa T.** 2001. GSK-3 Kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hs11 down regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  in budding yeast. *EMBO J.* **20:** 1074-1085.
- Morgon B. A., Bouquin N., and Johnston L. H.** 1995. Two Component Signal Transduction System in Budding yeast MAP a Different Pathway. *Trends in cell biology.* **5:** 453-457
- Parker M. M.** 2000. *Brock, Biology of Microorganisms 9<sup>th</sup> Edi.* Prentice Hall Publisher. New Jersey.
- Petrache I., Choi M. E., Otterbein L. E., Chin B.Y., Mantell L. L., Horowitz S., and Choi A. M. K.** 1999. Mitogen activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cell. *AJP-Lung Cellular and Mol. Biol.* **277:** 589 – 592.
- Petrolakis E., dan Wong E.** 2002. Nerve growth factor specifically stimulates translation of eukaryotic elongation factor 1A-1 (eEF1A-1) mRNA by recruitment to polyribosomes in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **277:** 18718-18727.
- Ray L. B., Adler E. M., and Gough N. R.** 2003. Building a Case For Signaling. *Science magazine.* **300:**1523.
- Richard S. M., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J. L., Lehmann S., Launay J. L., and Kellermann O.** 2000. Signal Transduction Through Prion Protein. *Science.* **289:** 1925-1928.
- Rodrigues K. F., Hesse M., and Werner C.** 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *J. Basic Microbiology.* **40:** 261-267.

- Schaeffer H. J., and Weber M. J.** 1999. Mitogen activated protein kinase : specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 2435- 2444.
- Stahl E.** 1969. *Thin Layer Chromatography- A Laboratory Handbook*. Springer. New York
- Takekawa M., Maeda T., and Saito H.** 1998. Protein phosphatase 2Ca inhibit the human stress- responsive p38 and JNK MAPK pathway. *EMBO J.*, **17:** 4744-4752.
- Touchstone J.C. dan Dobbins M.F.** 1983. *Practice Of Thin Layer Chromatography 2nd Edi.* John Wiley And Son Inc. Canada.
- Weaver R. F.** 1999. *Molecular Biology*. MCB McGraw – Hill Companies. Kansas.
- Xiao M. Q., Pramanik R., Wang J., Schultz R. M., Maitra R. K., Han J. H., De Luca H. F., and Chen G.** 2002. The p38 and JNK Pathway cooperate to trans- activated vitamin D receptor via c Jun/ AP-1 and sensitize human breast cancer cell to vitamin D3 induced growth inhibition. *J. Biol.Chem.* **277:** 25884- 25892.
- Yamaguchi K., Shirakabe K., Shibuya H., Irie K., Oishi I., Ueno N., Taniguchi T., Nishida E., and Matsumoto K.** 1995. Identification Of a Member of The MAPKKK Family as a Potential Mediator of TGF- $\beta$  Signal Transduction. *Science*. **270:** 2008-2011.