

245616

4000005660



PENGASINGAN DAN AKTIVITI PERENCAT ISOCITRATE LYASE  
(ICL) EKSTRAK KASAR AKTINOMISET TERHADAP  
MYCOBACTERIUM

HADIAH

TAY CHIEW HONG

TESISINI 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



1400005660



UMS  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: *Pengesahan dan Aktiviti penentar ICL ekstrak kapur Aktinomiset terhadap Mycobacterium*

Ijazah: *Sarjana Sains Dengan Kepujian*

SESI PENGAJIAN: *2001/02*

Saya TAY CHIEW HONG

## (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

## (TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: *241, Taman Satelite,  
72100 Bahau, N.S.*

## (TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

*Prof. Dr. Ho Cey Choke*

Nama Penyelia

Tarikh: 12/3/04

Tarikh: 12/3/04

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).

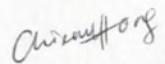


**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja sendiri kecuali nukilan dan ringkasan di mana tiap-tiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

13 Februari 2004



---

**TAY CHIEW HONG**  
**HS2001-1313**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

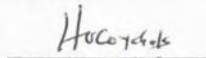
0386000000

## DIPERAKUKAN OLEH

**Tandatangan**

## 1. PENYELIA

(PROF. DR. HO COY CHOKE)



## 2. PEMERIKSA 1

(PROF DR. PERUMAL RAMASAMY )



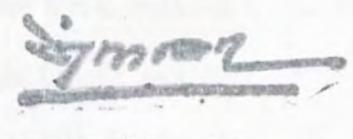
## 3. PEMERIKSA 2

( DR. CHARLES S. VAIRAPPAN )



## 4. DEKAN

(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)

**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA  
SABAH

## PENGHARGAAN

Terlebih dahulu, saya ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Sains Dan Teknologi, Universiti Malaysia Sabah yang telah menyediakan pelbagai kemudahan peralatan dan peluang kepada saya untuk menyiapkan projek tahun akhir ini dengan jayanya.

Saya juga ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia projek saya, Prof. Dr. Ho Coy Choke yang telah banyak berkorban masa, tunjuk ajar dan nasihat kepada saya untuk menjayakan projek ini.

Tidak lupa juga ribuan terima kasih kepada Cik Puah, Cik Hew, Encik Foo Encik Simon dan Encik Chong. Mereka banyak memberi batuan dan nasihat kepada saya sepanjang projek ini. Saya ingin mengatakan terima kasih sekali lagi kepada Cik Hew kerana banyak mengorbankanmasa untuk memberi tunjuk ajar kepada saya. Di samping itu, saya juga amat menghargai dan sokongan moral yang telah diberi oleh rakan-rakan seperjuangan sepanjang projek dijalankan, khasnya Ng Li Wei, Lau Hui Chong, Phang Chee Yong, Yeoh Chin Keong dan Yeoh Seok Har.

Segala kerjasama dan bantuan kalian amatlah saya hargai. Semoga semua pihak sentiasa berada dalam keadaan sihat belaka. Sekian, terima kasih.

## ABSTRAK

Fokus kajian ini adalah untuk mengkaji kebolehan strain H8602 dalam aktiviti perencutan terhadap isocitrate lyase (ICL) daripada *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteria H8602 disahkan sebagai aktinomiset melalui pewarnaan gram. Media oatmeal digunakan untuk pertumbuhan strain H8602 untuk tujuan penulenan aktinomiset. Aktinomiset yang dipencarkan ditumbuhkan di medium mannitol-pepton secara aerobik untuk menghasilkan metabolit sekunder yang kemudian diekstrak dengan penambahan aseton. Ujian penyaringan perencat ICL dilakukan dengan menggunakan *M. smegmatis* jenis liar dan transformant  $\Delta icl$  *M. smegmatis* yang telah ditransformaikan dengan gen *icl* *M. tuberculosis*. Didapati ekstrak ini toksik terhadap *M. smegmatis* kerana terdapat zon perencutan pada kedua-dua piring asetat dan glukosa. Ekstrak ini disejatkan dan dikering-beku untuk mendapat hasil dalam bentuk serbuk yang berwarna kuning. Serbuk ekstrak ini dilarutkan dalam air suling untuk menjalankan kromatografi lapisan nipis. Pemisahan komponen dalam ekstrak ini dicapai dengan menggunakan sistem pelarut metanol-air dengan nisbah 99:1. Dua spot didapat. Komponen-komponen dalam ekstrak dianalisiskan dengan HPLC dengan jarak gelombang yang berbeza dan masa yang tertentu. Didapati sistem pelarut metanol-air dengan nisbah 20:80 memberi pemisahan yang terbaik. Lapan puncak didapatkan termasuk puncak pelarut organik. Hasil daripada HPLC dengan retention time ( $t_R$ ) yang berlainan dikutip dan digunakan dalam penyaringan terhadap perencat ICL. Terdapat zon perencutan dalam kedua-dua piring asetat dan glukosa. Ini menunjukkan ekstrak H8602 adalah toksik terhadap *M. smegmatis*.



**ISOLATION AND ACTIVITY OF INHIBITORS ISOCITRATE LYASE (ICL)  
CRUDE EXTRACT ACTINOMYCETE AGAINST *MYCOBACTERIUM***

**ABSTRACT**

The focus of this study was to find out the potential of strain actinomycetes H8602 in inhibitory activity against isocitrate lyase (ICL) from *Mycobacterium tuberculosis*. H8602 was identified as an actinomycete by gram staining. The bacteria were grown on oatmeal agar by preparing the media with pH 7.2 for 3 days. The isolated actinomycetes were grown in mannitol-peptone medium aerobically to produce second metabolite. The second metabolite then extracted by acetone. Screening of inhibitors ICL was done by using wildtype *M. smegmatis* and transformant  $\Delta icl$  *M. smegmatis* which transformed with plasmid inserted normal *icl* gene from *M. tuberculosis*. Glucose and acetate as the carbon sources in screening of ICL. The results show that the compounds in the extract toxic to *M. smegmatis*. Then, the extracts was evaporated at 56° C and freeze-dried to produce extract in yellow powder form. Then the powder was dissolved in distilled water for the purpose of running thin layer chromatography with silica gel plate. Best separation of the compounds in extract H8602 was obtained with solvent system methanol-water with ratio 99:1. Two spot was obtained. Screening was repeated to ensure the inhibition activity. HPLC was used to separate and analysis the compounds in the extract second metabolite H8602 by different wavelength ( $\lambda$ ) and time. The solvents system, which was used in the HPLC analysis, depends on the system used in thin layer chromatography. The best peaks I get found in solvent system methanol-water 20: 80 detected by 220 $\lambda$ . There are 8 peaks with different retention time ( $t_R$ ) were obtained include the solvent peak. Screening was repeated to test the every compound with different  $t_R$ . Inhibition zone was found in acetate and glucose petri dish, which the fraction was collected from the peaks between at 4 minutes. It is toxic to *M. smegmatis*. Further test and conformation should be carried out to confirm the potential of this extract in inhibitory activity against ICL.

## KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	xiii
SENARAI RAJAH	xiv
SENARAI FOTO	xv
SENARAI SIMBOL	xvi

BAB 1	PENDAHULUAN	1
1.1	PENGENALAN	1
1.2	OBJEKTIF	3
BAB 2	ULASAN PERPUSTAKAAN	5
2.1	PENGENALAN	5
2.2	TUBERKULOSIS	6
2.3	MIKOBAKTERIA	7



2.3.1	Dinding Sel Mikobakteria	8
2.4	ATYPICAL MIKOBAKTERIA	10
2.4.1	Kumpulan I (fotokromogens)	11
2.4.2	Kumpulan II (Scotochromogens)	12
2.4.3	Kumpulan III (Nonchromogens)	12
2.4.4	Kumpulan IV	12
2.5	Mycobacterium Tuberculosis	13
2.5.1	Ciri-ciri <i>M. tuberculosis</i>	14
2.6	ISOCITRATE LYASE	14
2.6.1	Struktur Isocitrate Lyase	16
2.6.2	Peranan Isocitrate Lyase Sebagai Enzim	17
2.6.3	Peranan Isocitrate Lyase Sebagai Protein	17
2.6.4	Keupayaan ICL berkembang menjadi Ubat Antituberkulosis	18
2.7	KITAR GLYOXYLATE	19
2.8	PENYARINGAN PERENCAT ICL	22
2.9	PERKEMBANGAN UBAT ANTITUBERKULOSIS	24
2.10	METABOLIT SEKUNDER	25
2.11	AKTINOMISET	26
2.11.1	Ciri-ciri Aktinomiset	26
<b>BAB 3</b>	<b>BAHAN DAN KAEADAH</b>	<b>28</b>
3.1	TEKNIK PENSTERILAN	28
3.1.1	Autoklaf	28
3.1.2	Pensterilan Haba	29

3.1.3	Penurasan	30
3.1.4	Pensterilan Udara	30
3.2	PENYEDIAAN OATMEAL	30
3.3	PENULENAN KOLONI TUNGGAL AKTINOMISET	30
3.4	PEWARNAAN GRAM UNTUK KAJIAN MORFOLOGI	31
3.5	FERMENTASI	32
3.6	PENGHASILAN METABOLIT SEKUNDER	32
3.7	PENYARINGAN PERENCAT ICL	32
3.7.1	Penyediaan media pertumbuhan <i>M. smegmatis</i>	33
3.7.2	Penyediaan cakera kertas	33
3.7.3	Penyediaan Agar <i>Mycobacterium smegmatis</i>	33
3.7.4	Perletakan cakera kertas dan Inkubasi Piring Penyaringan	34
3.7.5	Penyejatan ekstrak metabolit sekunder	34
3.8	PENGERINGAN EKSTRAK METABOLIT SEKUNDER	34
3.9	PENYARINGAN PERENCAT ICL SELEPAS PENGERINGAN	35
3.10	PEMILIHAN SISTEM PELARUT DENGAN KROMATOGRAFI	35
	LAPISAN NIPIS	
3.12	PENYARINGAN PERENCAT ICL SELEPAS TLC	37
3.13	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)	37
3.14	PENYARINGAN KOMPONEN YANG TELAH DIPISAHKAN DENGAN HPLC	38



<b>BAB 4</b>	<b>PERBINCANGAN DAN ANALISIS DATA</b>	<b>39</b>
4.1	PERTUMBUHAN BAKTERIA H8602 PADA OATMEAL AGAR	39
4.2	KAJIAN MORFOLOGI BAGI STRAIN H8602	39
4.4	PENYARINGAN TERHADAP PERENCAT ICL	42
4.5	PENYEJATAN EKSTRAK METABOLIT SEKUNDER	42
4.6	PENGERINGAN EKSTRAK METABOLIT SEKUNDER	42
4.7	PENYARINGAN PERENCAT ICL SELEPAS PENGERINGAN	43
4.8	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS BAGI EKSTRAK H8602	44
4.9	PENYARINGAN PERENCAT ICL SELEPAS TLC	47
4.10	PEMISAHAN KOMPONEN DALAM EKSTRAK H8602 MELALUI HPLC	48
4.11	PENYARINGAN PERENCAT ICL DENGAN HASIL KOMPONEN DARIPADA HPLC	51
<b>BAB 5</b>	<b>PERBINCANGAN</b>	<b>54</b>
5.1	PEWARNAAN GRAM	54
5.2	FERMENTASI AEROBIK DAN PENGEKSTRAKAN METABOLIT SEKUNDER	54
5.3	PENYARINGAN PERENCAT ICL	55
5.4	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS BAGI EKSTRAK H8602	56
5.4.1	Pemilihan fasa pegun bagi kromatografi lapisan nipis	57
5.4.2	Pemilihan fasa bergerak	57
5.4.3	Penyediaan sample untuk kromatografi lapisan nipis	59
5.4.4	Pengesnan komponen selepas kromatografi lapisan nipis	59



5.5	PEMISAHAN KOMPONEN DALAM EKSTRAK MELALUI HPLC	60
5.5.1	Strategi-strategi dalam menggunakan HPLC	60
5.5.2	Masalah-masalah Dihadapi Semasa Pengendalian HPLC	61
5.5.3	Pemisahan komponen dalam ekstrak	62
5.6	PENYARINGAN PERENCAT ICL DENGAN HASIL DARIPADA ANALISIS HPLC	63
<b>BAB 6</b>	<b>KESIMPULAN</b>	64
<b>RUJUKAN</b>		66
<b>LAMPIRAN</b>		72



## SENARAI JADUAL

	Muka surat
2.1 Pengelasan Runyon atypical mikobakteria	11
2.2 Keputusan penyaringan yang dijangka	22
2.3 Mekanisme resistant bagi ubat dalam mikobakteria	25
4.1 Keputusan penyaringan dengan 20 $\mu$ L ekstrak	41
4.2 Keputusan penyaringan dengan 100 $\mu$ L ekstrak	42
4.3 Keputusan penyaringan dengan 20 $\mu$ L ekstrak selepas pengeringan	43
4.4 Keputusan kromatogram TLC dari 1-4	44
4.5 Keputusan kromatogram TLC dari 5-8	45
4.6 Keputusan kromatogram TLC dari 9-11	46
4.7 Keputusan penyaringan dengan 20 $\mu$ L ekstrak selepas TLC	47
4.8 Nilai-nilai $t_R$ bagi puncak yang berlainan	50
4.9 Keputusan penyaringan dengan asetat sebagai sumber karbon	51
4.10 Keputusan penyaringan dengan glukosa sebagai sumber karbon	51



## SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka surat
2.1 Struktur kimia isocitrate lyase	15
2.2 Struktur cantuman ICL dengan glyoxylate dan suksinat	16
2.3 Struktur ribbon isocitrate lyase	16
2.4 Tapak aktif ICL	17
2.5 Kitar glyoxylate	21
2.6 Keputusan penyaringan yang dijangka	23
3.1 Corak coretan pada piring agar oatmeal	30
4.1 Kromatogram TLC bagi ekstrakH8602 mengikut kekutuban	44
4.2 Kromatogram TLC bagi ekstrakH8602 mengikut kekutuban	45
4.3 Kromatogram TLC bagi ekstrakH8602 mengikut kekutuban	46
4.4 Kromatogram HPLC dengan 350 $\lambda$	48
4.5 Kromatogram HPLC dengan 360 $\lambda$	49
5.1 Urutan pelarut organik mengikut kekutuban	58



**SENARAI FOTO**

No. Foto	Muka Surat
4.1 Koloni bacteria di bawah mikroskop dengan kuasa Pembesaran X 100	40
4.2 Ekstrak metabolit sekunder yang dihasilkan	41



## SENARAI SIMBOL, SINGKATAN, TATANAMA DAN UNIT

### **Simbol**

$^{\circ}\text{C}$	darjah celsius
$\text{dH}_2\text{O}$	distilled water
$\text{ddH}_2\text{O}$	double distilled water

### **Singkatan**

RNA	Asid ribonukleik
TLC	Thin layer chromatography
Met	Metanol
Heks	Heksana
$\text{EtOAc}$	Etil asetat
$\text{CHCl}_3$	Kloroform
But	Butanol
$\text{NH}_2\text{OH}_4$	Ammonium hidroksida

### **Tatanama**

rpm	rotation per minute
UV	ultraviolet
$\text{H}_2\text{O}$	water



**Unit**

M	molar
g	gram
mg	milligram
mm	millimeter
cm	centimeter
mL	milliliter
$\mu\text{L}$	mikroliter
nm	nanometer
w/v	weight over volume
v/v	volume over volume
$R_f$	Mobility relative to front
$t_R$	Retention time



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 PENGENALAN

Tuberculosis (TB) adalah sejenis penyakit yang sangat penting dalam sejarah masyarakat manusia. Tuberculosis dianggap sebagai satu bimbangan kesihatan yang serius di seluruh dunia dengan lebih daripada satu pertiga penduduk dari seluruh dunia telah dijangkiti oleh *Mycobacterium tuberculosis* secara pendam (Zahrt dan Deretic, 2001). Kira-kira 20,000 kes tuberculosis dilaporkan di United State setiap tahun (Madigan *et al*, 2000). Di seluruh dunia, tuberculosis masih dilaporkan hampir 3 million kes kematian setiap tahun iaitu kira-kira 5% daripada kematian keseluruhan. Tuberkulosis merupakan pembunuh pertama di Malaysia pada awal abad ke-14 dan ke-15. Pada tahun 1961, program kawalan tuberculosis negara telah dijalankan di Malaysia. Dengan adanya rancangan aktiviti tuberculosis yang berkesan seperti penvaksinan BCG serta rawatan yang sesuai, kedudukan tuberculosis sebagai pembunuh pertama telah digantikan.

Tuberculosis boleh disebarluaskan daripada satu individu kepada individu yang lain melalui udara. *Mycobacterium tuberculosis* yang menyebabkan tuberculosis merupakan sejenis asid-fast bakteria yang berbentuk rod dan aerobik. Struktur dinding sel jenis bakteria ini adalah berbeza dengan bakteria lain. Bakteria ini boleh menyerang mana-

mana bahagian badan manusia terutamanya peparu. Bakteria ini boleh menjakiti kita secara aktif atau terpendam/laten. Pesakit yang dijangkiti secara aktif boleh dirawat tetapi orang yang dijangkiti secara laten boleh mangambil ubat untuk mengelakkan menjadi pesakit yang sebenar. Oleh sebab risiko pengaktifan semula TB semasa hayat adalah 15%, kira-kira 50-200 juta daripada pesakit yang dijangkiti secara terpendam akhirnya akan berkembang menjadi pesakit TB yang sebenar (Bloom dan McKinney, 1999)

Baru-baru ini, isocitrate lyase (ICL) atau threo-ds-isocitrate-glyoxylate-lyase, sejenis enzim dalam kitaran glyoxylate, telah ditunjukkan bahawa ianya diperlukan oleh *Mycobacterium tuberculosis* untuk hidup dalam macrophages *in vitro* dan semasa jangkitan berterusan *in vivo*, melibatkan pengantara metabolisme ketika masa kependaman (Zahrt dan Deretic, 2001). ICL berfungsi untuk menukar isocitrate kepada suksinat dan glyoxylate dan penting dalam metabolisme asid lemak. ICL membolehkan jaringan karbon didapatkan dengan pesongan acetyl-CoA daripada  $\beta$ -pengoksidaan asid lemak ke dalam laluan glyoxylate (Sharma, 2000). Ia berpotensi sebagai satu ubat terhadap penyakit tuberculosis. Menurut kajian, laluan glyoxylate tidak akan berfungsi dengan sempurna jika ekstrak daripada metabolit sekunder aktinomiset dapat menyaringkan aktiviti ICL. Yang berikutnya, ia boleh mengurangkan penerusan dan virulen bakteria tanpa mempengaruhi pertumbuhan bakteria itu (McKinney, 2000). Ini akan menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* tidak dapat hidup dan satu ubat baru boleh dikembang dengan berkesan.

## 1.2 OBJEKTIF

Objektif utama projek ini adalah untuk menentukan identiti strain bakteria H8602 dan mengkaji potensinya dalam menjadi perencat isocitrate lyase yang berkemungkinan menjadi harapan dalam menerokai ubat antituberkulosis. Seterusnya, perencat bacteria terhadap ICL ini akan dikaji sifat-sifat aktiviti kimia dan biologinya.

Kajian morfologi strain bacteria H8602 adalah bertujuan untuk pengelasan bakteria. Pengelasan bakteria boleh dilakukan dengan dengan pewarnaan gram. Jenis bacteria ini menunjukkan warna yang berlainan melalui pewarnaan gram. Bakteria gram positif menunjukkan warna biru-keunguan dan bacteria gram negatif menunjukkan warna merah di bawah mikroskop.

Selepas menentukan identity bacteria ini, koloni bacteria ini dipencilkkan dan ditulenkkan dan seterusnya difermentasikan secara aerobik. Kemudian, metabolit sekunder akan diekstrakkan. Ini adalah kerana kebanyakkan metabolit sekunder merupakan antibiotik yang mungkin boleh menjadi harapan dalam perkembangan ubat antituberkulosis.

Ekstrak metabolit sekunder diperlukan untuk penyaringan perencat ICL. Tujuan penyaringan ini adalah untuk mencari perencat ICL yang mungkin merupakan salah satu komponen dalam ekstrak metabolit sekunder H8602. Ini adalah kerana perencat ICL ini dapat menyebabkan kitar glyoxylate tidak dapat berfungsi dengan lengkap dan seterusnya menghentikan virulence bakteria tanpa mengganggu pertumbuhan bakteria. Jadi, *Mycobacterium tuberculosis* tidak dapat hidup.

Ekstrak ini perlu dianalisiskan dan komponennya perlu dipisahkan. Pemisahan komponen ini boleh dicapai melalui kromatografi lapisan nipis dan high performance liquid kromatografi. Tujuan pemisahan komponen dalam ekstrak adalah untuk memastikan komponen dengan retention time yang manakah boleh merencangkan aktiviti ICL semasa penyaringan.

Seterusnya, komponen-komponen yang telah dipisahkan melalui HPLC akan dikutip dan digunakan untuk penyaringan. Komponen yang memberi keputusan positif dalam penyaringan akan dikaji dengan sifat-sifat aktiviti kimia dan biologinya. Ini membolehkan kita mengetahui tentang cirri-ciri dan struktur kimianya.

Selain itu, tujuan utama projek ini dijalankan adalah supaya dapat mempelajari dan berpengetahuan menjalankan penyaringan enzim ICL untuk mencari perencat ICL. Ini adalah kerana kita harap boleh mencari ubat antibakteria yang berkesan dalam rawatan penyakit tuberculosis. Tambahan pula, projek ini memberi peluang untuk mempelajari dan memahami peralatan-peralatan canggih berkenaan projek seperti High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

## BAB 2

### ULASAN LITERATUR

#### 2.1 PENGENALAN

Penyakit tuberculosis merupakan sejenis penyakit yang boleh menjangkiti paru-paru manusia melalui udara sejak beberapa abad dahulu. Sehingga tahun 1940 dan 1950-an, masih tiada satu ubat yang dapat mengubati TB. Oleh itu, metabolit sekunder daripada aktinomycetes telah menjadi tumpuan saintis-saintis dan doktor-doktor dari seluruh dunia. Ini adalah disebabkan metabolit sekunder yang diekstrakkan daripada aktinomiset boleh digunakan secara luas dalam bidang perubatan sebagai antibiotik-antibiotik yang sesuai bagi penyakit tertentu. Sebagai contoh, rifampin telah dikembangkan sebagai satu antibiotik dalam pengawalan dan rawatan penyakit tuberculosis. Rifampin adalah satu metabolit sekunder streptomycetes yang diekstrakkan daripada *Streptomyces mediterranei*. Selain itu, metabolite sekunder daripada aktinomiset termasuk juga perencat-perencat enzim. Perencat enzim ini biasanya mempunyai nilai komersial yang tinggi.

## 2.2 TUBERKULOSIS

Tuberkulosis adalah sejenis penyakit kuno yang berkenaan dengan jangkitan di paru-paru manusia sejak beberapa abad dahulu. Penyakit ini telah didapati dalam rangka seorang mumia paderi Mesir yang telah meninggal dunia kira-kira 3,400 B. C.

Pada masa itu, manusia tidak tahu bakteria TB boleh menjangkiti seseorang melalui udara. Menurut kajian daripada saintis-saintis, penyakit ini adalah disebabkan oleh sejenis asid-fast bakteria iaitu *Mycobacterium tuberculosis*. Walaupun pertumbuhan bakteria adalah rendah tetapi bakteria ini boleh bertoleransi terhadap ubat yang dimakan dan kewujudan strain-strain yang resistan terhadap ubat. Sehingga tahun 1950an, saintis-saintis masih tidak dapat mencari ubat-ubat atau cara-cara untuk merawat TB. Pada masa itu, kebanyakan orang yang telah dijangkiti oleh bakteria ini mati kerana tiada ubat yang boleh mengubati mereka. Selain itu, kejayaan *Mycobacterium tuberculosis* sebagai satu patogen adalah disebabkan kebolehannya hidup dalam macrophages dengan tempoh yang panjang, jangkitan berterusan dalam sel asalnya semasa waktu kawalan dengan kekalisan sel pengantara (Zahrt dan Deretic, 2001).

Pada tahun 1881, seorang saintis bakteriologi dari Jerman telah mengatakan bahawa satu per tujuh daripada semua manusia yang mati adalah disebabkan oleh tuberkulosis (Brock, 1970). Pada masa itu, apakah yang menyebabkan penyakit ini masih tidak diketahui. Beliau telah menggunakan pelbagai cara untuk mencari penyebabnya seperti penggunaan mikroskop, tisu staining, pengasingan kultur tulen dan penyuntikan animal. Akhirnya, pada tahun 1882, Koch telah mengumumkan perjumpaanya tentang

basili tubercle semasa kuliahya di Berlin. Beliau telah mengumumkan bakteria *Mycobacterium tuberculosis* sebagai penyebab tuberculosis.

Tuberkulosis adalah sejenis penyakit yang dahsyat. Ia boleh muncul dalam dua jenis jangkitan dalam badan manusia. Penyakit ini boleh dijangkiti secara aktif atau laten. Orang yang dijangkiti secara aktif dipanggil sebagai pesakit TB. Mereka memerlukan rawatan daripada doktor. Mereka akan mati jika keadaannya terlalu serius. Orang yang yang dijangkiti dengan TB laten adalah berbeza daripada pesakit TB. Mereka tidak akan berasa sakit, tidak akan menyebarkan TB kepada orang lain melalui udara dan tiada sebarang simptom atas mereka. Tetapi ia mungkin akan menjadi tenat pada masa depan.

Baru-baru ini, isocitrate lyase, satu enzim dalam kitar glyoxylate, telah ditunjukkan bahawa ianya diperlukan oleh *M. tuberculosis* untuk hidup dalam macrophage *in vitro* dan semasa tempoh jangkitan *in vivo*, melibatkan pengantara metabolisme semasa tempoh laten (Zahrt dan Deretic, 2001). Enzim ini telah dianggap sebagai satu sasaran penyelidikan oleh saintis-saintis untuk memperkembangkan ubat antituberkulosis yang lebih berkesan.

### **2.3 MIKOBAKTERIA**

Mikobakteria adalah sejenis alkohol-fast dan asid-fast bakteria yang berbentuk rod. Saiznya biasanya berada dalam  $0.2^{0.6} \times 1.0^{10}$   $\mu\text{m}$ . Mikobakteria juga adalah aerobik. Mikobakteria adalah berbeza dengan bakteria lain dengan sifat asid-fast itu. ‘Asid-fast’ bermaksud kebolehan sesuatu organisma untuk menahan carbolfuchsim stain walaupun kemudiannya dirawat dengan campuran asid etanol-hidroklorik. Ini adalah disebabkan

## RUJUKAN

Alcamo, I. E., 1983. *Fundamentals of Microbiology Fourth Edition*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California. 73-76.

Barman, T. E., 1969. *Enzyme Handbook Vol II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 747-748.

Barman, T. E., 1969. *Enzyme Handbook Vol I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 1-13.

Bellion, E. dan Woodson, J., 1975. Two distinct Isocitrate Lyases from a Pseudomonas Species. *Journal Of Bacteriology* **122** (2), USA, 557-564.

Beynon, R.J. dan Bond, J.S., 1989. *Proteolytic enzymes a practical approach*. IRL Press, 83-89.

Brock, T. D. dan Brock, K. M., 1978. *Basic Microbiology with Applications Second Edition*. Prentice-Hall. Inc, 33-34.

Buchanan, R.E. dan Gibbons, N. E., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The William & Wilkins Company, 682-700.

Christian, G. D., 1994. *Analytical Chemistry First Edition*. Library Of Congress, United States of America. 506-554.

Collins, C. H. dan Grange, J. M., 1985. *Isolation and Identification of Microorganism of Medical and Veterinary Importance*. Academic Press. 281.

Cooper, G. M., 1997. *The cell A molecular Approach*. ASM Press, New York, 790-791.

Drauz, K. dan Waldmann, H., 1995. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis A Comprehensive Handbook*. VCH, 218-220.

Furniss, B. S. dan Hannaford, A. J., 1993. *Teks Kimia Organik Amali Jilid 1*. Dewan Bahasa Dan Pustaka, Selangor. 227-269.

Harrigan, W. F. dan McCance, M. E., 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London and New York, 9-10, 213-214, 30-33.

Holme, D. J. dan Peck, H., 1994. *Problem Solving in Analytical Biochemistry*. Longman Scientific & Technical, Malaysia. 54-71.

Jacobs, W. R., 2000. *Mycobacterium tuberculosis: a once genetically intractable organism*. Hatfull Dlm, G.F & Jacobs, W.R. (pynt) Molecular Genetics of Mycobacteria. Washington. ASM Press.

Karp, G., 1996. *Cell and Molecular Biology 2<sup>nd</sup> edition*. John Wiley & Sons. Inc, U. S. A., 118.

Khasnabis, S., Escuyer, V. E. dan Chatterjee, D., 2002. Emerging Therapeutic Targets in Tuberculosis: post-genomic era. *Expert Opin. Ther. Targets* **6** (1), 21-40.

Krstulovic, A. dan Brown, P. R., 1982. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Canada. 85-123.

Lacey, J., 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders. Dlm: Sykes, G. and Skinner, F. A. (pnyt.) *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*, Society for Applied Bacteriology, Britain. 231-247.

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

Levinson, W. dan Jawetz, E., 1998. *Examination & Board Review Medical Microbiology & Immunology*. Appleton & Lange, 6-7, 124-130.

Lorenz, M. C. dan Fink, G. R., 2002. Life and dead in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell* **1** (5), 657-662.

MacFaddin, J. F., 1985. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. William & Wilkins, 513-518, 458-464.

Mandelstam, J., Quillen, K. Mc. dan Dawes, I., 1968. *Biochemistry of Bacterial Growth Third Edition*. Blackwell Scientific Publication, 151-153.

McKinney, J. D., Kerstin Honer zu Bentrup., Munoz-Elias, E. J., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R. dan Russell, D. G., 2000. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in microphages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-738.

Nicholson, S. D. E., 1970. *An Introduction to Metabolic Pathways*. Blackwell Scientific publications, 40-41, 151.

O' Leary W., 1989. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press. Inc. Boca Raton Florida, 327-330.

Parker, M. M., 1970. *Brock Biology of Microorganisms Ninth Edition*. Prentice Hall International, Inc, United States of America, 519-524.

Pasch, H. dan Trathnigg, B., 1998. *HPLC of Polymers*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 119-156.

Manchenko, P. G., 1994. *Handbook Of Detection of enzyme on Electrophoresis Gels*. CRC press, 294, 15-25.

Potter, G. W. H., 1995. *Analysis of Biological Molecules*. Chapman & Hall, Great Britain. 129-149.

Rothe, G. M., 1994. *Electrophoresis of Enzymes Laboratory Methods*. Springer Verlag Lab, 19-22, 141.

Satinder Ahuja., 1991. *Chiral Separations by Liquid Chromatography*. America Chemical Society, Washington. 183-203.

Schulz, A. R., 1994. *Enzymes Kinetics From Diastase to multi enzyme Systems*. Cambridge University Press, 3-22.

Shirling, E. B. dan Gottlieb, D., 1966. Methods For Characterization Of Streptomyces Species. *International Journal Of Systematic Bacteriology* **16** (3), 313-340.

Webb, J. L., 1966. *Enzyme and Metabolic Inhibitors Volume II*. Academic press, 62, 709.

Wei, J., Dahl, J. L., Moulder, J. W., Roberts, E. A., Young, D. B. dan Friedman, R. L., 2000. Identification Of a *Mycobacterium tuberculosis* Gene that enhances Mycobacterial survival in Macrophages. *Journal Of Bacteriology* **182** (2), 377-384.

Wheeler, W. C. dan Hanks, J. H., 1965. Utilization of External Growth Factors by Intracellular Microbes: *Mycobacterium paratuberculosis* and *Wood Pigeon Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology* **89** (3), Baltimore USA , 889-895.

Work, T. S. dan Work, E., 1998. *Laborotary Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Volume 2*. North-Holland Publishing Company, 18-35.



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Zahrt, T. C. dan Deretic, V., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *PNAS* **98** (22), 12706-12711.

