

PENGASINGAN DAN PENYARINGAN AKTINOMISET TERUTAMANYA
STREPTOMYCES DARI *LOWER SEGAMA*, SABAH TERHADAP PERENCAT
ISOCITRATE LYASE DALAM *MYCOBACTERIUM* BUKAN PATOGEN

NG LI WEI

DISERTAI YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH MUDA SAINS DENGAN
KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

MAC 2004



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Pengasingan dan Penyaringan Aktinomiset tentomanya
Streptomyces dan lower Segama, Sabah terhadap perencat isocitrate lyase
adalah Mycobacterium bukan patogen.

Ijazah: BIO TEKNOLOGI

SESI PENGAJIAN: 2003 / 2004

Saya NG LI WEI

(HURUF BESAR)

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

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

Ng Li Wei

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 83Y, KAMPUNG PIRANG,
11500, AYER ITAM,
PULAU PINANG.

Nama Penyalia

Tarikh: 12/3/04

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 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).



PENAKUAN

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

9 Mac 2004

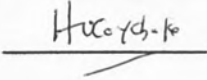
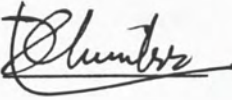
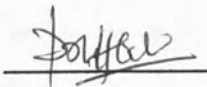
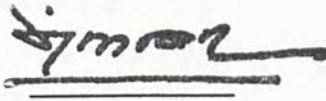


NG LI WEI

HS 2001-1118



DIPERAKUI OLEH

- | | Tandatangan |
|--|---|
| 1. PENYELIA
(Prof. Dr. Ho Coy Choke) |  |
| 2. PEMERIKSA 1
(Dr. Lee Ping Chin) |  |
| 3. PEMERIKSA 2
(Dr. Roziyah Hj Kambol) |  |
| 4. DEKAN
(Prof. Madya Dr. Amran Ahmed) |  |



PENGHARGAAN

Saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia projek saya, Professor Dr. Ho Coy Choke. Prof. telah banyak memberikan bimbingan dan tunjuk ajar kepada saya supaya saya dapat menyiapkan projek ini dengan sempurna. Penghargaan juga dirakamkan kepada Prof. Datuk Dr. Kamaruzaman Ampon, Prof. Dr. Perumal Ramasamy, Dr. Lee Ping Chin, Dr. Jualang @ Azlan Abdullah Bin Gansau, Dr. Zaleha Abdul Aziz dan Dr. Roziah Hj Kambol dengan ikhlas atas ilmu pengetahuan yang dicurahkan selama ini.

Penghargaan ini turut ditujukan kepada senior-senior dan pelajar-pelajar pasca-siswazah Bioteknologi iaitu Eric Lai Ngit Shin, Hew Chaw Sen, Puah Seok Hwa, Foo Sek Hin dan Ong Si Mon yang telah banyak memberi nasihat dan tunjuk ajar dengan membantu saya menyiapkan projek ini dengan lancar. Juga tidak lupa mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan saya terutamanya Lau Hui Chong atas kerjasama dan bantuan yang dihulurkan semasa menjalankan amali projek ini dan juga Tan Chia Yee dan Loo Pooi Eng yang telah membantu saya mengutip sampel-sampel tanah di tapak perkhemahan Kampung Tidong.

Bantuan yang dihulurkan oleh semua rakan sepengajian dan rakan-rakan lain dalam menyiapkan projek ini juga amat saya hargai. Akhir sekali, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada seisi keluarga saya yang telah memberi bantuan kewangan, kasih sayang, sokongan dan galakan kepada saya.



ABSTRAK

Pengasingan aktinomiset dari sampel tanah yang dikutip dari *Lower Segama*, Sabah menjadi salah satu sasaran untuk mendapatkan strain-strain berguna yang dapat merencat enzim isocitrate lyase (ICL) dalam aktiviti glikosilat yang diperlukan oleh *M. tuberculosis* jangkitan laten penyakit tuberculosis. Sejumlah 18 sampel tanah telah dikutip dari *Lower Segama*, Sabah dan sebanyak 44 aktinomiset telah berjaya diasingkan daripada kesemua sampel tanah ini. Media asid humik-vitamin B1 (HV) agar dengan pH 7.2 yang dieram pada suhu 28°C selama 7 hari telah dipilih sebagai media dalam pengasingan sampel tanah ini. pH 7.2 adalah pH optimum bagi pertumbuhan aktinomiset. Koloni tunggal yang dihasilkan atas media HV agar diambil dan disubkulturkan ke atas media oatmeal agar untuk menghasilkan aktinomiset yang tulen. Aktinomiset yang ditulenkan ini ditumbuhkan di dalam manitol-pepton liquid kultur secara aerobik untuk menghasilkan metabolit sekunder yang kemudian diekstrakkan dengan aseton. Ujian penyaringan perencat ICL dilakukan dengan menggunakan mikrobakterium yang bukan patogen iaitu *Mycobacterium smegmatis* jenis liar dan Δicl *M. smegmatis* dengan gen *icl* yang telah ditransformasikan dengan plasmid yang membawa gen *icl* *M. tuberculosis*. Media M9 agar yang mengandungi sumber karbon (glukosa atau asetat), vitamin B1 dan *M. smegmatis* disediakan untuk ujian penyaringan ini. Setiap ekstrak yang hendak diuji dipipetkan ke atas cakera kertas dahulu sebelum dipindahkan ke atas media M9 agar yang telah disediakan. Diameter zon perencatan diperhatikan dan dicatatkan untuk mengenalpasti sama ada ekstrak yang diuji adalah perencat berpotensi atau toksik terhadap *M. smegmatis*. Hanya ekstrak yang menghasilkan zon perencatan pada kedua-dua piring *M. smegmatis* jenis liar dan jenis transformant yang mengandungi sumber karbon asetat dianggap sebagai perencat ICL yang berpotensi. Sebanyak 156 ekstrak metabolit sekunder aktinomiset telah diuji dengan ujian penyaringan perencat ICL. Tiada ekstrak yang menjadi perencat berpotensi bagi ICL tetapi terdapat 13 ekstrak yang menunjukkan ketoksikan terhadap *M. smegmatis*. Ujian pengesahan dan ujian penyaringan perencat lain yang selanjutnya perlu dijalankan terhadap ekstrak-ekstrak tersebut.



ABSTRACT

Isolation of actinomycetes from the soil samples collected from *Lower Segama*, Sabah is one of the targets to product useful strains that can be used to inhibit the isocitrate lyase enzyme (ICL) activity in glyoxylate cycle of *Mycobacterium tuberculosis* which involved in latent infection of tuberculosis. A total of 18 soil samples were collected from *Lower Segama*, Sabah and 44 actinomycetes succeed to isolate. Humic acid vitamin B1 (HV) agar media, pH 7.2, incubated at 28°C for 7 days were chosen for the isolation of actinomycetes. pH 7.2 is the pH optimum for the growth of acinomycetes. Single colony from the HV agar media is picked and inoculated into oatmeal agar media for purification. Purified actinomycetes were grown in the mannitol-peptone aerobic liquid culture. The secondary metabolites of actinomycetes were extracted with acetone. ICL screening was done by using non-pathogenic *Mycobacterium* that are wild type *M. smegmatis* and transformant Δicl *M. smegmatis* which the gene *icl* transformed with the plasmid carrying gen *icl* *M. tuberculosis*. M9 minimal agar media with carbon source (glucose or acetate), vitamin B and *M. smegmatis* are prepared for this screening system. Each extract is pipetted onto the paper disc before transferred onto the M9 minimal agar media. Diameter of the extract inhibition zone was scored to identified the potential ICL inhibitor or toxic against *M. smegmatis*. Only the extract which have inhibition zone on both wild type and transformant *M. smegmatis* in the acetate plate are considered potential ICL inhibitor. A total of 156 secondary metabolite extracts of actinomycetes were tested in screening for inhibitors of ICL. No extract showed potential ICL inhibitor but have 13 extract showed toxic against *M. smegmatis*. Further confirmation and tests should be carried out to confirm those extracts have activity against ICL.



KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	3
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	4
2.1 PENGENALAN	4
2.2 AKTINOMISET	5
2.2.1 Faktor Pertumbuhan Aktinomiset	6
2.3 <i>Streptomyces</i>	7
2.3.1 Pengasingan <i>Streptomyces</i>	9
2.4 TUBERCULOSIS	10
2.5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.6 KITAR GLIOKSILAT	14
2.7 ENZIM ISOCITRATE LYASE (ICL)	16
2.8 PENYARINGAN PERENCAT ICL	17
2.9 <i>Mycobacobacterium smegmatis</i>	19
2.10 ANTIBIOTIK BARISAN PERTAMA DAN KEDUA	19



BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	23
3.1	PENSTERILAN	23
	3.1.1 Autoklaf	23
	3.1.2 Pensterilan Haba	24
	3.1.3 Penurasan	24
3.2	PERSAMPELAN	24
3.3	PENGUKURAN pH SAMPEL TANAH	25
3.4	PENGASINGAN <i>Streptomyces</i> DARI SAMPEL TANAH	25
	3.4.1 Penyediaan Vitamin B	25
	3.4.2 Penyediaan Cyclohexamide	26
	3.4.3 Penyediaan Media Asid Humik-Vitamin B Agar	26
3.5	SUBKULTUR DAN PENULENAN BAGI <i>Streptomyces</i>	27
	3.5.1 Penyediaan Media Oatmeal Agar	27
	3.5.2 Penulenan Koloni Tunggal <i>Streptomyces</i>	28
	3.5.3 Penyediaan Larutan Stok 20% Gliserol	28
3.6	UJIAN MORFOLOGI	29
	3.7.1 Pemerhatian Warna	29
	3.7.2 Pewarnaan Gram	29
3.7	PENGHASILAN METABOLIT SEKUNDER BAGI AKTINOMISET	30
	3.6.1 Penyediaan Medium Penapaian Liquid Kultur	30
	3.6.2 Fermentasi	31
	3.6.3 Pengekstrakan Metabolit Sekunder	31
3.8	PENYARINGAN PERENCAT ICL	31
	3.8.1 Penyediaan Medium M9	31
	3.8.2 Penyediaan Media Pertumbuhan <i>Mycobacterium smegmatis</i>	32
	3.8.3 Penyediaan Media M9 Agar Lapisan Bawah	32
	3.8.4 Penyediaan Media M9 Agar Lapisan Atas	33
	3.8.5 Pemindahan Ekstrak ke atas kertas cakera	33
BAB 4	KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA	34
4.1	PENGUMPULAN SAMPEL TANAH	34
4.2	pH SAMPEL TANAH	37



4.3	PENGASINGAN AKTINOMISET	38
4.4	SUBKULTUR DAN PENULENAN AKTINOMISET	40
4.5	PEWARNAAN GRAM	43
4.6	PENGEKSTRAKAN METABOLIT SEKUNDER DAN PENYEDIAAN STOK GLISEROL	44
4.7	PENYARINGAN PERENCAT ICL	45
BAB 5	PERBINCANGAN	49
5.1	PENGUMPULAN SAMPEL TANAH	49
5.2	PENGASINGAN AKTINOMISET	50
5.3	SUBKULTUR DAN PENULENAN AKTINOMISET	51
5.4	PENGHASILAN METABOLIT SEKUNDER	52
5.5	PENYARINGAN PERENCAT ICL	53
BAB 6	KESIMPULAN	56
RUJUKAN		57
LAMPIRAN		63



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
4.1 Kawasan persampelan di Lower Segama	34
4.2 Nilai pH sampel tanah di kawasan persampelan	37
4.3 Bilangan koloni aktinomiset yang diasingkan dari setiap sampel tanah	38
4.4 Morfologi strain-strain aktinomiset dari media HV agar yang telah dituliskan pada media oatmeal agar dengan pH 7.2.	40
4.5 Warna bagi miselia aerial aktinomiset dan berbentuk spiral	43
4.6 Keputusan ujian penyaringan perencat ICL pada kali pertama	45
4.7 Keputusan ujian penyaringan perencat ICL pada kali kedua	47



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Kitar glioksilat dan glikolisis pada bakteria dan tumbuhan	15
2.2 Perencat bagi aktiviti ICL	18
2.3 Struktur bagi antibiotik-antibiotik barisan pertama	22
2.4 Struktur bagi antibiotik barisan kedua	22
3.1 Corak coretan dalam oatmeal agar pada piring petri	28
4.1 Bilangan koloni tunggal aktinomiset pada media HV agar dengan dipengaruhi oleh pH sampel tanah	39



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
4.1 Koloni tunggal aktinomiset yang dihasilkan dari sampel tanah	40
4.2 Warna miselia aerial dan substrat aktinomiset pada media oatmeal agar	42
4.3 Pewarnaan gram bagi LSE L-8 yang diperhatikan di bawah mikroskop X40.	44
4.4 Keputusan penyaringan perencat ICL	48



SENARAI SIMBOL

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CaCO ₃	Calcium carbonat
Ca ²⁺	Ion calcium
Cys	Cysteine
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOT	Directly Observed Therapy
G+C	Guanine + cytosine
HIV	Human immunodeficiency virus
HV	Humik-vitamin
ICL	Isocitrate lyase
<i>Δicl</i>	Mutasi pada gen isocitrate lyase
LSE	Lower Segama
No	Nombor
RNA	Ribonucleic acid
r.p.m.	Putaran per minit
Ser	Serine
TB	Tuberculosis
%	Peratus
°C	Darjah selsius
g	Gram
mg	miligram
L	Liter
mL	Milimeter
μl	Mikroliter
km	Kilometer
cm	Sentimeter
mm	Milimeter
μm	Mikrometer
v/v	Isipadu per isipadu
w/v	Berat per isipadu
psi	Paun per inci persegi



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Mycobacterium tuberculosis iaitu bakteria yang menyebabkan tuberculosis (TB), lebih menuntut nyawa manusia daripada bakteria patogen yang lain (McKinney et al., 2000). Hampir 1/3 daripada populasi dunia telah dijangkiti *M. tuberculosis* laten (Zahrt dan Deretic, 2001). Hanya kira-kira 10% individu terjangkit yang memiliki tindakan keimunan yang sempurna akan diaktifkan semula dengan penyakit pada jangka hayat hidup (Bentrop dan Russell, 2001).

M. tuberculosis menembusi ke dalam populasi manusia dengan disaingi oleh beberapa patogen yang lain. Kejayaan bakteria adalah bergantung kepada kebolehan mereka untuk meneruskan dan mengekalkan jangkitan kronik dalam tubuh badan manusia yang mengambil keimunan dan menentang daripada penghapusan oleh antimikrobial (Sharma et al., 2000). Vaksin dan ubat baru sangat diperlukan untuk mengawal agen penyebab primer jangkitan TB (Tremblay et al., 2002). Isoniazid dan rifampicin adalah antara dua jenis anti-TB yang berkesan (Cunningham dan Spreadbury, 1998).

Jangkitan laten *M. tuberculosis* merintangi kebolehan dalaman untuk mengawal TB. *M. tuberculosis* bacili tunggal dengan memanjangkan tempoh antara



makrofaj di mana ia akan membiak dan disebarkan ke seluruh badan, dipindahkan dari paru-paru dengan menjangkiti organ yang lain. Bakteria membiak dan menyebabkan jangkitan peringkat akhir semasa bakteria berpindah (Lorenz dan Fink, 2002).

Asid lemak menjadi sumber karbon dan tenaga utama dalam metabolisme *M. tuberculosis* bagi tisu paru-paru yang teruk terjangkit. Kitar β -pengoksidaan dan shunt glioksilat adalah dua laluan yang menyediakan asid lemak yang diperlukan oleh bakteria (McKinney et al., 2000). Dalam kitar glioksilat, dua enzim utama iaitu isocitrate lyase (ICL) dan malat synthase diperlukan untuk tumbuh di asetat yang sebagai sumber karbon. Tambahan pula, kajian fungsi dan struktur *M. tuberculosis* mengemukakan bahawa isocitrate lyase memainkan peranan yang penting bagi persisten bakteria dalam makrofaj dan tikus (Soh et al., 2001). Perkembangan dan penghasilan dadah secara meluas bagi strategi penyingkapan perencat ICL menggunakan mutan Δicl *M. smegmatis* yang ditransformasikan dengan gen *icl* *M. tuberculosis* telah mengurangkan pertumbuhan makrofaj yang aktif dengan nyata tetapi bukan pada makrofaj yang rehat (Sharma et al., 2000).

Aktinomiset ialah 'non-asid-fast', gram positif miselia bakteria yang membentuk filamen yang bercabang dan penghasilan spora yang kaya dengan kandungan G+C iaitu dalam lingkungan 70-75% (Collins dan Lyne, 1976; Grange, 1992; Madigan et al., 2000). Penemuan baru dalam penghasilan metabolit sekunder oleh aktinomiset menghasilkan banyak antibiotik, enzim dan perencat enzim. Populasi aktinomiset adalah tinggi di dalam tanah (Labeda dan Shearer, 1990).



Streptomyces ialah genus yang menggambarkan spesies dan kepelbagaian yang tinggi (Madigan et al., 2000). Kebanyakan aktinomiset yang diasingkan ialah *Streptomyces* sp. Rhizosfera tanah mengandungi jumlah aktinomiset yang lebih banyak daripada non-rhizosfera tanah. Pelbagai antibiotik seperti rifampicin dan streptomycin dihasilkan oleh beberapa streptomiset (Labeda dan Shearer, 1990).

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Terdapat tiga objektif utama dalam menjalankan kajian ini iaitu:-

- 1) Pengasingan *Streptomyces* dari beberapa sampel tanah yang dikumpul dari tapak perkhemahan berdekatan dengan Kampung Tidong, Lower Segama, Sabah.
- 2) Pengekstrakan metabolit sekunder dari *Streptomyces* yang telah diasingkan.
- 3) Penyaringan perencat ICL dalam *Mycobacterium* bukan patogen dengan menggunakan *M. smegmatis* jenis liar dan Δicl *M. smegmatis* jenis transformasi dengan plasmid yang membawa gen *icl* daripada *M. tuberculosis*.



BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 PENGENALAN

Aktinomiset merupakan kumpulan yang besar bakteria gram positif dan kebanyakannya terdapat di dalam tanah berfilamen (Madigan et al., 2000). Penemuan aktinomiset dan genus *Streptomyces* merupakan punca utama dalam penghasilan antibiotik-antibiotik dan perencat enzim-enzim yang berguna (Sykes dan Skinner, 1973).

Pada tahun 2000, dilaporkan bahawa tuberculosis adalah antara 10 penyakit merbahaya yang akan menyebabkan kematian orang dewasa (Kim, 2002). 3 juta orang mati setiap tahun disebabkan oleh jangkitan *M. tuberculosis* (Lotfi, 2002). Menurut Hu & Coates (1998), model *in vitro* bagi replikasi *M. tuberculosis* dikembangkan oleh Wayne. Jangkitan 'latent persistent' *M. tuberculosis* yang menyebabkan penyebaran tuberculosis bukan sahaja disesuaikan dengan persekitaran yang bertentangan dengan makrofaj tetapi juga dengan kuasa penentangan dadah anti-TB (Sharma et al., 2000).

Dalam kitar glikosilat, karbon dioksida dihasilkan dari kitar trikarboksilik (TCA) dan melibatkan penukaran dua karbon kompaun (acetyl-CoA dan glikosilat) kepada empat karbon kompaun (suksinat) (Bentrup, 2001). Menurut Sharma et



Penyusunan sumber mikrobial bagi menghasilkan antibiotik ditemui di USA dan Japan antara tahun 1953 hingga 1970 dengan didapati 85% daripada antibiotik dihasilkan oleh aktinomiset, 11% dari fungi dan 4% dari bakteria (Labeda dan Shearer, 1990).

2.2.1 Faktor Pertumbuhan Aktinomiset

Lacey (1973) menyatakan bahawa terdapat tujuh faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan aktinomiset iaitu jenis tanah, kedalaman tanah, kesan rhizosfera, nilai pH, kandungan air dalam pengudaraan, kandungan zarah organik dan tanah yang digunakan.

Hampir 90% dari populasi aktinomiset ialah *Streptomyces* spp. Populasi aktinomiset berbeza di tanah yang berbeza dengan bergantung kepada kandungan zarah organik, kandungan air dan nilai pH dalam tanah. Kebanyakan aktinomiset hidup dalam kawasan hutan terbiar dan kedalaman sebanyak 11-15 cm ke bawah tanah kerana kedalaman ini mempunyai nilai pH yang rendah iaitu lebih berasid yang sesuai untuk pertumbuhan *Streptomyces*. Kebanyakan aktinomiset tumbuh dalam tanah yang berrhizosfera dan tidak ditakungi air iaitu kandungan yang lebih tinggi. Peningkatan kandungan humus dalam tanah menggalakkan pertumbuhan aktinomiset di mana aktiviti dijalankan melalui penyerapan nutrien.



2.3 *Streptomyces*

Genus *Streptomyces* ialah aktinomiset yang aerobik dan berspora, gram-positif, dapat membentuk substrat bercabang yang luas dan aerial miselia (Labeda & Shearer, 1990). Menurut Hutter (1970), kandungan GC adalah berbeza antara genera aktinomiset di mana genus *Streptomyces* adalah tinggi dengan mempunyai 70-75% kandungan G+C.

Populasi *Streptomyces* yang paling tinggi terdapat dalam tanah dan biasanya hidup pada suhu antara 15 hingga 37 °C, dan ada juga yang hidup pada suhu 45-50 °C (Labeda dan Shearer, 1990). Aerial miselia *Streptomyces* terselindung dengan banyak metabolit sekunder yang berguna dalam penghasilan antibiotik, fungisit atau herbisid dan kebanyakannya bergantung kepada enzim hidrolitik ekstraselular seperti selulase, hemiselulase, protease dan lipase yang dijadikan sebagai sumber karbon yang digunakan untuk menurunkan bahan organik kompleks yang disokong dengan penyesuaian persekitaran semulajadi (Banchio dan Gramajo, 1997; Tremblay et al., 2002).

Menurut Labeda dan Shearer (1990), aerial miselium bagi kebanyakan *Streptomyces* mempamerkan warna yang jelas. Dalam International Projek *Streptomyces* (ISP), tujuh siri warna bagi aerial miselia digunakan iaitu kuning, ungu, merah, biru, hijau, kelabu dan putih untuk menentukan spesies *Streptomyces*. Warna bagi aerial miselia boleh digambarkan dengan *niveus* (putih), *griseus* (hijau kekuningan, kelabu-kuning-kehijauan, perang), *azureus-glaucus* (kelabu kebiruan



kepada hijau kebiruan), *cinnamomeus* (merah jambu kepada perang kelabuan), *cinereus* (kelabu), *prasinus* (hijau kelabuan).

Streptomiset dalam tanah dibahagikan kepada 3 kumpulan fungsi yang utama iaitu fungsi mereka dalam penguraian bahan organik dalam tanah, kesan mereka terhadap struktur tanah campuran dengan tanah liat melalui kemasukan hifa yang mempamerkan sporulasi yang jelas di mana tanaman yang baik dihasilkan dan kebolehan mereka untuk menghasilkan antibiotik yang merencat pertumbuhan mikroba yang lain (Gottlieb, 1973).

Gram positif *Streptomyces* spp. menghasilkan 75% antibiotik untuk kegunaan dalam perubatan dan komersil kerana *Streptomyces* banyak menghasilkan metabolit sekunder (Lotfi, 2002). *S. lividans* berkesan dalam penggunaan kadar promoter mikrobakteria yang tinggi dan dicadangkan supaya dijadikan perumah yang berkualiti dalam penghasilan agen diagnostik dan terapeutik (Tremblay et al., 2002). Pada tahun 1944, streptomycin adalah antibiotik yang pertama berjaya mengubati pesakit TB. Streptomycin yang ditemui dan dihasilkan dari *S. griseus* dapat mengubati tuberculosis dan jangkitan Gram-negatif (Tolba et al., 2002).



2.3.1 Pengasingan *Streptomyces*

Menurut Lotfi (2003), terdapat beberapa cara dan kaedah digunakan untuk mengenali *Streptomyces* spp. Antaranya termasuk kaedah mengkultur dengan menggunakan teknik pemilihan piring, pembinaan sistem gen marker, pergabungan penanda kimia dengan asid LL-diaminopimelic dan ketidakwujudan kategori gula.

Kutzner (1981) melaporkan bahawa penggunaan kaedah turasan membran atau penggunaan medium agar yang telah disteril untuk pengasingan *Streptomyces* dari tanah telah dianjurkan oleh Trolldenier pada tahun 1966. Kewujudan unsur surih dalam media agar menyokong pengekstrakan pertumbuhan *Streptomyces* dari tanah telah dijumpai oleh Spicher pada tahun 1955.

Terdapat 4 prinsip utama bagi kekayaan dan pengasingan terhadap *Streptomyces* yang berjaya digunakan iaitu pertama, memperkayakan substrat sebelum pengasingan. Kedua ialah rawatan bagi sampel untuk mengasingkan mikroba lain daripada mengganggu pertumbuhan *Streptomyces*. Ketiga ialah menggalakkan perbentukan *Streptomyces* pada piring media pengasingan dengan mempunyai kadar sumber karbon ke nitrogen yang tinggi dan keempat ialah pemilihan nutrien untuk merencat pertumbuhan flora pada medium agar yang digunakan untuk pengasingan.

Perkayaan *Streptomyces* dengan keratin dan kitin telah pertama sekali didedahkan oleh Jensen. Keratin menambahkan bilangan *Streptomyces* tanpa memberi kesan kepada bakteria, sementara penambahan kitin kepada tanah menyebabkan peningkatan bakteria dan *Streptomyces*. Kebanyakan media pengasingan ditambahkan



dengan CaCO_3 di mana penghasilan Ca^{2+} meneutralkan asid yang dihasilkan oleh beberapa *Streptomyces* dan juga menambahkan koloni *Streptomyces* (Lacey, 1973). Kandungan karbon dalam media agar pengasingan adalah sedikit di mana kandungan yang sedikit mengawal pertumbuhan eubakteria dan kulat (Crawford, 1993).

2.4 TUBERCULOSIS (TB)

Bilangan kes TB yang baru meningkat 6% setahun antara tahun 1997 hingga 1999 dengan dari 8 juta menjadi 8.4 juta sedunia. Peningkatan ini adalah disebabkan oleh peningkatan sebanyak 20% dari penduduk di sub-Saharan Afrika di mana kebanyakan daripada mereka telah dijangkiti penyakit HIV (Kim).

Kewujudan penyakit ini disebabkan dengan faktor perumah, faktor persekitaran seperti keadaan sosial dan tahap keimunan seseorang terhadap serangan mikrobial. Seseorang yang dijangkiti penyakit HIV lebih dijangkiti dengan TB (Mitsos, 2003). Pesakit HIV senang dijangkiti penyakit tuberculosis di mana terdapat peningkatan kadar jangkitan dengan 8-10% setahun (Bentrup, 2001). Sementara bagi pesakit yang dijangkiti laten *M. tuberculosis* mempunyai peningkatan kadar sebanyak 0.2% setahun dengan keaktifan bakteria (Yuan, 1996).

Pada hari ini, TB dapat diubati dengan menggunakan rawatan kemoterapi. Rawatan ini adalah tidak sesuai digunakan kerana rawatan ini memerlukan masa yang panjang iaitu antara 6 hingga 9 bulan dan merupakan halangan utama dalam rawatan TB yang lebih berkesan dan sesuai (Bentrup, 2001). Menurut Kim, strategi *Directly Observed Therapy* (DOT) dikembangkan supaya penyakit TB dapat menerima



diagnosis dan rawatan yang berkesan. Antara strategi DOT ialah penemuan strategi yang berhubungkaitkan dengan persaingan dadah antara perencat HIV dengan TB; peningkatan penciptaan dan perkembangan diagnosis, dadah dan vaksin yang baru; dan mengingatkan global untuk menghentikan TB supaya strategi kawalan TB yang didapati dapat dijalankan dengan berkesan.

Diagnostik TB ialah mengembangkan ujian baru untuk menentukan TB yang aktif dengan lebih cepat, lebih mudah dan lebih tepat; mengembangkan ujian baru untuk mengesan rintangan rifampicin dengan cepat; dan mengembangkan kaedah yang lebih cekap untuk mengenalpasti peningkatan penyakit TB yang aktif. Penciptaan dadah baru terhadap anti-TB dikembangkan dengan mengembangkan dadah baru yang meningkatkan atau memudahkan rawatan TB; mengembangkan rawatan bagi *multi-drugs resistance-TB* (MDR-TB) yang lebih berkesan; dan mengembangkan rawatan bagi jangkitan laten TB yang lebih berkesan. Penciptaan vaksin baru diperlukan untuk mengelakkan penyakit TB dari tersebar luas dan juga melindungi seseorang yang tidak terjangkit daripada dijangkiti TB dan mengelakkan penyakit bagi seseorang yang telah dijangkiti TB.

Keimunan terhadap penyakit TB dibuktikan aktif dan nyata selepas perencatan dikenakan terhadap pembiakan bakteria secara berterusan selepas tiga minggu jangkitan (Shi et al., 2003). Sehingga hari ini, antibiotik yang telah dihasilkan untuk mengubati TB yang aktif tidak sesuai dan berkesan untuk membunuh bakteria dalam jangkitan laten (Bentrup, 2001).



RUJUKAN

- Banchio, C. dan Gramajo, H. C., 1997. Medium- and long chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3 (2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. *Microbiology* **143**, 2439-2447.
- Barry, C. E., Slayden, R. A., Sampson, A. E. dan Lee, R. E., 2000. Use of genomic and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. *Biochemical Pharmacology* **59**, 221-231.
- Bentrup, K. H., Miczak, A., Swenson, D. L. dan Russell, D. G., 1999. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **181** (23), 7161-7167.
- Bentrup, K. H dan Russell, D. G., 2001. Mycobacterium persistence: adaption to a changing environment. *Trends in Microbiology* **9** (12), 597-605.
- Chennai, 2003. Trends in initial drug resistance over three decades in a rural community in South India. *India Journal of Tuberculosis* **50**, 75-86.
- Collins, C. H. dan Lyne, P. M., 1976. *Actinomyces, Norcadia and Streptomyces*. Dlm: *Microbiological methods*. Butterworth and Co Ltd., Great Britain, 472-475.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M. dan Ousley, M. A., 1993. Isolation and characterization of Actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. and Environ. Microbiol.* **59** (11), 3899-3905.
- Cunningham, A. F. dan Spreadbury, C., 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog. *Journal of Bacteriology* **180** (4), 801-808.



- Donadio, S., McAlpine, J. B., Sheldon, P. J., Jackson, M. dan Katz, L., 1993. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Biochemistry* **90**, 7119-7123.
- Duncan, K. dan Sacchettini, J. C., 2000. Approaches to Tuberculosis Drug Development. Dlm: Hatfull, G. f. & Jacobs Jr., W. R. (pytn) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, 297-312.
- Fratti, R. A., Chua, J., Vergne, I. dan Deretic, V., 2003. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *PNAS* **100** (9), 5437-5442.
- Gottlieb, D., 1973. General consideration and implications of the actinomycetales. Dlm: Sykes, G. dan Skinner, F. A. (pnyt.) *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*, Society for Applied Bacteriology, Britain, 1-17.
- Grange, J. M., 1992. *Actinomyces* and *Nocardia*. Dlm: Greenwood, D., Slack, R. dan Peutherer, J. (pnyt.) *Medical microbiology- a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. Ed. ke-14. Churchill Livingstone, USA, 265-267.
- Higgs, R. E., Zahn, J. A., Gygi, J. D. dan Hilton, M. D., 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (1), 371-376.
- Ho, C. C., Daim, S., Hew, C. S., Puah, P. H., Wong, G. S. S. dan Lee, P. C., 2003. Novel approaches to drug discovery especially for persistent latent infection by *Mycobacterium tuberculosis*. School of Science and Technology, University Malaysia Sabah, Kota Kinabalu.
- Hu, Y. dan Coates, A. R. M., 1999. Transcription of the stationary-phase-associated *hspX* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is inversely related to synthesis of the 16-kilodalton protein. *Journal of Bacteriology* **181**(5), 1380-1387.



- Hutter, R., 1970. The *Streptomyces* complex. Dlm: Prauser, H. dan Jena (pynt.) *The Actinomycetales: The Jena International Symposium on Taxonomy*. VEB Gustav Fisher Verlag Jena, German, 55-63.
- Jacobs, W. R., Kalpana, G. V., Cirillo, J. D., pascopella, L., Snapper, S. B., Udani, R. A., Jones, W., Barletta, R. G. dan Bloom, B. R., 1991. Genetic Systems for Mycobacteria. Academic Press, 537-548.
- Jacobs, W.R., 2003. *Enzymes Offers Target to Attack Drug-Resistant Tuberculosis*. *HHMI News*. <http://www.hhmi.org/news/jacobs3.html>.
- Khetan, A. dan Hu, W. S., 2001. Metabolic engineering of antibiotic biosynthesis for process improvement. *Cell and Tissue Reactor Engineering*.
- Kim, J. Y., 2002. Sub-group: Combating tuberculosis. Harvard Medical School, USA.
- Kutzner, I. J., 1981. The family Streptomycetaceae. Dlm: Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. dan Schlegel, H. G. (pynt.), *The Prokaryotes: A Handbook on habitats, isolation and Identification of Bacteria*, Springer-Verlag, New York, 2028-2090.
- Labeda, D. P. dan Shearer, M. C., 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. Dlm: Labeda, D. P. (pnynt.) *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. McGraw-Hill Publishing Company, USA, 1-19.
- Lacey, J., 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders. Dlm: Sykes, G. and Skinner, F. A. (pnynt.) *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*, Society for Applied Bacteriology, Britain, 231-247.
- Lorenz, M. C. dan Fink, G. R., 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell* 1 (5), 657-662.



- Lo, C. W., Lai, N. S., Cheah, H-Y, Wong, N. K. I. dan Ho, C. C., 2002. Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker Range Sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*, 1-7.
- Lotfī, M., Raoudha, A. M., Samiha, S., Mansour, S. dan Samir, B., 2003. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research of Microbiology*, 1-8.
- Lucas, J. R., Valenciano, S., Laborda, F. dan Turner, G., 1994. Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* **162**, 409-413.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. dan Parker, J., 2000. *Brock Biology of Microorganism*. 9th edition. Prentice Hall, USA.
- McKinney, J. D., Bentrup, K. H., Munoz-Elias, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchettin, J. C., Jacobs, W. R. dan Russell, D. G., 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-738.
- Mitsos, M. L., Cardon, L. R., Ryan, L., LaCourse, R., North, R. J. dan Gros, P., 2003. Susceptibility to tuberculosis: a locus on mouse chromosome 19 (Trl-4) regulates *Mycobacterium tuberculosis* replication in the lungs. *PNAS* **100** (11), 6610-6615.
- Parrish N. M., Kuhajda, F. P., Heine, H. S., Bishai, W. R. dan Dick, J. D., 1999. Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 219-226.
- Quinn, F. D., Birkness, K. A. dan King, P. J., 2002. Alpha-crystallin as a potential marker of *Mycobacterium tuberculosis* latency. *ASM News* **68** (12), 612-620.



School of Biomedical and Life Sciences University of Surrey Guildford, 2001. Tuberculosis. *Microbiology* **28**.
<http://www.socgenmicrobiol.org.uk/QUA/080114.pdf>.

Sharma, V., Sharma, S., Bentrup, K. H., McKinney, J. D., Russell, D. G., Jacobs, W. R. dan Sacchettin, J. C., 2000. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **7** (8), 663-668.

Shi, L., Jung, Y. J., Tyagi, S., Gennaro, M. L. dan North, R. J., 2002. Expression of Th-1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *PNAS* **100** (1), 241-246.

Shirling, E. B. dan Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **16** (3), 313-340.

Soh, B. S., Ioke, P. dan Sim, T. S., 2001. Cloning, heterologous expression and purification of an isocitrate lyase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. *Biochimica et Biophysica Acta* **1522**, 112-117.

The Rockefeller University, 2000. Researchers Find Key to Tuberculosis Persistence in the Body. *News*, 17 August.
<http://www.rockefeller.edu/pubinfo/mckinney081700.nr.html>.

Tolba, S., Egan, S., Kallifidas, D. dan Wellington, E. M. H., 2002. Distribution of streptomycin resistance and biosynthesis genes in streptomycetes recovered from different soil sites. *FEMS Microbiology Ecology* **42** (2), 269-276.

Tremblay, D., Lemay, J., Gilbert, M., Chapdelaine, Y., Dupont, C. dan Morosoli, R., 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Canadian Journal of Microbiology* **48** (1), 43-48.



- Wei, J., Dahl, J. L., Moulder, J. W., Roberts, E. A., Ogaora, P., Young, D. B. dan Friedman, R. L., 2000. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* genes that enhances mycobacterial survival in macrophages. *Journal of Bacteriology* **182** (2), 377-384.
- Yuan, Y., Crane, D. D. dan Barry III, C. E., 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog. *Journal of Bacteriology* **178** (15), 4484-4492.
- Zahrt, T.C. dan Deretic, V., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *PNAS* **98** (22), 12706-12711.

