

245850

4000005528



TRANSFORMASI *Catharanthus roseus* DENGAN
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens*

LOH POH IAN

DISERTASI YANG DIKEMUKAN 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

PERPUSTAKAAN UMS



1400005528

Februari 2004



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Transformasi Catharanthus roseus dengan menggunakan Agrobacterium tumefaciens

Ijazah: Sarjana Muda Sains (Kepujian)

SESI PENGAJIAN: 2004

Saya LOH POH TAN

(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

Xan
(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 3-A, Jalan Sejahtera 10-A,
Taman Aebe, 72100 Bunan,
N.S.D.K.

Nama Penyelia

Tarikh: 15/3/04

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.

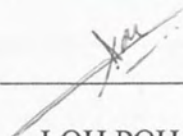
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana socara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENAKUAN

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

Febuari 2004



LOH POH IAN

HS2001-2655

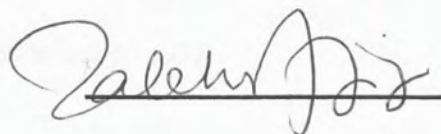


DIPERAKUKAN OLEH

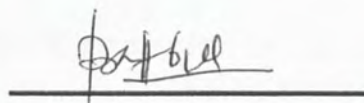
Tandatangan

PENYELIA

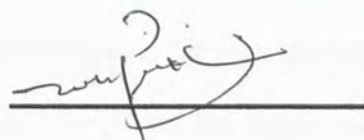
(Dr. Zaleha Abdul Aziz)

**PEMERIKSA 1**

(Dr. Roziah Hj. Kambul)

**PEMERIKSA 2**

(Cik. Teoh Peik Lin)

**DEKAN**

(Prof. Madya Dr. Amran Ahmed)



PENGHARGAAN

Saya ingin mengambil kesempatan ini mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Sains Dan Teknologi, Universiti Malaysia Sabah yang telah menyediakan pelbagai kemudahan dan bekalan kepada saya untuk menjalankan projek ini.

Saya juga merakamkan ribuan terima kasih kepada penyelia projek saya, Dr. Zaleha Abdul Aziz yang telah meyumbang masa, nasihat, tunjuk ajar, dan galakan sepanjang pelaksanaan projek ini.

Tidak lupa juga saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Cik Roseline yang menyumbang tenaga dan tunjuk ajar semasa pelaksanaan projek ini dan rakan-rakan seperjuangan yang berganding bahu bersama saya. Bantuan dan galakan mereka telah membantu saya menjayakan projek ini. Mereka ialah Choi San San, Esther Lo, Koo Geok Chin, Chee Jee Wei, Czelum Wong, Lim Soon Siang dan Rosliza Ibrahim.

Segala galakan, nasihat, bantuan, dan tunjuk ajar yang diberi oleh semua pihak yang terlibat amat dihargai. Semoga mereka sentiasa dalam keadaan baik dan sejahtera. Sekian, terima kasih.



ABSTRAK

Tiga variati *Catharanthus roseus* yang berlainan warna bunga digunakan untuk melakukan transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 + pCAMBIA 1303. Pengaruh tempoh pra-kultur dan ko-kultur terhadap transformasi telah diuji. Biji benih *C. roseus* dikumpul dari sekitar Kompleks Sukan Likas, Kota Kinabalu lalu dicambah dalam medium $\frac{1}{2}$ MS. Setelah hipokotil mencapai panjang kira-kira 4 cm, ia dipotong lalu dipra-kultur selama 0, 4, 8, dan 12 hari. Kemudian, eksplan diko-kultur bersama *A. tumefaciens* AGL1 + pCAMBIA 1303 selama 3, 6, dan 9 hari pada medium yang mengandungi 200 mM asetosiringon. Eksplan dipilih dengan menggunakan 50 mgL^{-1} higromisin dan aktiviti gen *gus* diuji dengan ujian histokimia GUS. Pada tempoh pra-kultur yang singkat (4 hari), *C. roseus* dari variati putih telah menunjukkan peratus eksplan dengan ujian aktiviti gen *gus* positif yang tinggi dengan peningkatan tempoh ko-kultur (9 hari). Apabila tempoh pra-kultur ditingkatkan untuk variati ini, hari ko-kultur yang pendek (3 hari) telah berupaya menghasilkan peratus eksplan dengan aktiviti gen *gus* yang tinggi (88.9%-100%). Untuk variati merah jambu, dengan peningkatan tempoh pra-kultur peratus eksplan dengan keputusan positif ujian GUS merosot sedikit. Untuk variati ungu, eksplan dengan 4 hari pra-kultur dan 6 hari ko-kultur telah menyebabkan peratus eksplan dengan keputusan positif ujian GUS yang tinggi.



ABSTRACT

Three varieties of *Catharanthus roseus*, based on different colour of flowers, were collected and transformed using *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 + pCAMBIA 1303. The effects of pre-culture and co-culture periods toward transformation were evaluated. *C. roseus*'s seeds were collected from the Likas Sport Complex, Kota Kinabalu and germinated on $\frac{1}{2}$ MS medium. When the lengths of the hypocotyls reached about 4 cm, there were cut and pre-cultured for 0, 4, 8, and 12 days. After that, explants were co-cultured with *A. tumefaciens* AGL1 + pCAMBIA 1303 for 3, 6 and 9 days on a medium containing 200 mM acetosyringon. Following inoculation, explants were selected using 50 mgL^{-1} hygromycin and the activity of *gus* gene was checked using the histochemical GUS test. Short pre-culture period (4 days) and long co-culture period (9 days) for white variety results in high percentage of explants showing positive *gus* activity (blue staining). When the pre-culture period was increased to 8 and 12 days, short co-culture period (3 days) was capable to produce 100% of explants showing positive *gus* activity. For pink variety, increasing the pre-culture period result in slight drop of percentage of explants with positive *gus* activity. Increasing the pre-culture period and co-cultivation period gave variable results for pink variety. For purple variety, 4 days pre-culture with 6 days co-culture periods result in high percentage of explants showing positive *gus* activity.



KANDUNGAN

	Muka Surat
PENAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI SINGKATAN	xiii
SENARAI LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	2
BAB 2 ULASAN LITERATUR	3
2.1 <i>Catharanthus roseus</i>	3
2.2 KEGUNAAN <i>C. roseus</i> DALAM BIDANG PERUBATAN TRADISIONAL DAN MODEN	5
2.2.1 Perubatan Tradisional	5
2.2.2 Perubatan Moden	6
2.3 TRANSFORMASI DENGAN MENGGUNAKAN <i>A. tumefaciens</i>	8
2.3.1 Kawasan T-DNA	10
2.3.2 Kawasan Virulen	11
2.3.3 Pemindahan T-DNA	12
2.4 TRANSFORMASI <i>C. roseus</i> DENGAN <i>A. tumefaciens</i>	13
2.5 GEN PELAPOR	15
2.6 GEN PENANDA	16
2.7 FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI TRANSFORMASI	17
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	20



3.1	SUMBER BIJI BENIH	20
3.2	PERCAMBAHAN	20
	3.2.1 Penyediaan Media Percambahan	20
	3.2.2 Teknik Percambahan	21
3.3	PRA-KULTUR	22
	3.3.1 Penyediaan Media Pra-Kultur	22
	3.3.2 Teknik Pra-Kultur	23
3.4	PENGKULTURAN STRAIN <i>A. tumefaciens</i> AGL1 + pCAMBIA 1303	23
	3.4.1 Sumber <i>A. tumefaciens</i> AGL1 + pCAMBIA1303	23
	3.4.2 Penyediaan Media Dan Larutan LB (LB Broth)	23
	3.4.3 Penyediaan Strain <i>A. tumefaciens</i> AGL1 + pCAMBIA 1303	24
3.5	KO-KULTUR	24
	3.5.1 Penyediaan Media Ko-Kultur	24
	3.5.2 Inokulasi Dan Ko-Kultur	25
3.6	PENYEDIAAN DAN PENJANAAN SEMULA EKSPLAN	25
	3.6.1 Penyediaan Media Pemilihan	25
	3.6.2 Penyediaan Media Penjanaan Semula	26
	3.6.3 Teknik Pemilihan	26
	3.6.4 Penjanaan Semula	26
3.7	ANALISIS HISTOKIMIA GUS	27
BAB 4	KEPUTUSAN	28
4.1	PERATUSAN PERCAMBAHAN	28
4.2	KESAN <i>A. tumefaciens</i> TERHADAP EKSPLAN SEMASA KO-KULTUR	30
4.3	UJIAN HISTOKIMIA GUS	31
	4.3.1 Perbandingan Ujian GUS Terhadap Eksplan Pada Ko-kultur Yang Ditetapkan Dan Pra-kultur Yang Berlainan.	31
	4.3.2 Perbandingan Ujian GUS Terhadap Eksplan Pada Pra-kultur Yang Ditetapkan Dan Ko-kultur Yang Berlainan.	39
4.4	PENJANAAN SEMULA	44
BAB 5	PERBINCANGAN	45



5.1	PERATUSAN PERCAMBAHAN	45
5.2	FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KEPUTUSAN UJIAN HISTOKIMIA GUS	45
5.3	PENJANAAN SEMULA	50
BAB 6	KESIMPULAN	52
	RUJUKAN	53
	LAMPIRAN A	57
	LAMPIRAN B	58
	LAMPIRAN C	59
	LAMPIRAN D	60
	LAMPIRAN E	62
	LAMPIRAN F	63
	LAMPIRAN G	64
	LAMPIRAN H	65



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Klasifikasi <i>C. roseus</i> .	4
4.1 Peratusan percambahan	30
4.2 Peratusan dan kualiti warna biru selepas ujian histokimia GUS	32
4.3 Peratusan penjanaan semula	44



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Tumbuhan <i>C. roseus</i> yang digunakan dalam kajian	4
2.2 Pembentukan vinblastine	7
2.3 Biosintesis untuk strictosidine	9
2.4 Struktur asetosiringon	11
2.5 Pengaktifan kawasan virulen	12
2.6 Pemindahan T-DNA ke dalam sel tumbuhan	13
2.7 Penerangan perwakilan angka di belakang pCAMBIA	14
2.8 Struktur umum pCAMBIA	15
4.1 Proses percambahan biji benih hingga dipotong untuk pra-kultur	29
4.2 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variati bunga yang berlainan terhadap tempoh pra-kultur yang berlainan dengan ko-kultur selama 3 hari	34
4.3 Perbandingan ujian histokimia GUS terhadap eksplan yang telah dipra-kultur pada tempoh hari yang berlainan dan ko-kultur selama 3 hari	35
4.4 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variati bunga yang berlainan terhadap tempoh pra-kultur yang berlainan dengan ko-kultur selama 6 hari	37
4.5 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variati bunga yang berlainan terhadap tempoh pra-kultur yang berlainan dengan ko-kultur selama 9 hari	37
4.6 Perbandingan ujian histokimia GUS terhadap eksplan yang pra-kultur pada hari berlainan dan ko-kultur selama 6 hari	38
4.7 Perbandingan ujian histokimia GUS terhadap eksplan yang pra-kultur pada hari berlainan dan ko-kultur selama 9 hari	38
4.8 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variati bunga yang berlainan terhadap tempoh ko-kultur	



yang berlainan tanpa pra-kultur	42
4.9 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variasi bunga yang berlainan terhadap tempoh ko-kultur yang berlainan dengan pra-kultur selama 4 hari	42
4.10 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variasi bunga yang berlainan terhadap tempoh ko-kultur yang berlainan dengan pra-kultur selama 8 hari	43
4.11 Perbandingan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS bagi variasi bunga yang berlainan terhadap tempoh ko-kultur yang berlainan dengan pra-kultur selama 12 hari	43



SENARAI SINGKATAN

%	=	Peratusan
α	=	Alfa
β	=	Beta
$^{\circ}$	=	Darjah
g	=	Gram
μg	=	Mikrogram
L	=	Liter
gL^{-1}	=	Gram per liter
M	=	Kemolaran
mM	=	Milimolar
μM	=	Mikromolar
min	=	Minit
BAP	=	6-benzyladenine
NAA	=	α -naphthaleneacetic acid
PCR	=	Reaksi Kitar Polimeras



SENARAI LAMPIRAN

LAMPIRAN A

Komposisi unsur-unsur media Murashige dan Skoog (1962)

LAMPIRAN B

Senarai virus-virus yang boleh menyerang *C. rosues*

LAMPIRAN C

Senarai media

LAMPIRAN D

Peratusan percambahan dalam tiga kali percambahan

Bilangan eksplan semasa pra-kultur

Bilangan dalam setiap rawatan sebelum ko-kultur

Bilangan eksplan sebagai kawalan

LAMPIRAN E

Cara pengiraan percambahan biji benih

Cara pengiraan bar.

LAMPIRAN F

Bilangan dan peratusan eksplan yang berwarna biru selepas ujian GUS

LAMPIRAN G

Bilangan dan peratusan penjanaan semula

LAMPIRAN H

Bahan dan radas yang digunakan



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

C. roseus dari famili Apocynaceae yang mengandungi lebih kurang 150 alkaloid amat berguna dalam bidang perubatan (Dewick, 2002). Alkaloid yang terhasil dikenali sebagai alkaloid vinca yang tergolong dalam jenis alkaloid tripofan. Sejak zaman 50-an, *C. roseus* telah menarik perhatian ahli sains mengkaji bagaimana untuk meningkatkan lagi penghasilan kandungan alkaloid melalui teknik kultur tisu dan kejuruteraan genetik. Transformasi dengan menggunakan cara *Agrobacterium* (Garnier *et al.* 1999) dan senapang biolistik (Hilliou *et al.*, 1999; Zárate *et al.*, 1999) telah digunakan untuk memasukkan gen asing ke dalam tumbuhan ini.

Sungguhpun tumbuhan ini telah lama dikaji, penjanaan semula pucuk *C. roseus* yang telah ditransformasi dengan *A. tumefaciens* daripada transgenik kalus dan sel ampaijan dilaporkan gagal. Ini mungkin disebabkan oleh ciri tumbuhan ini yang susah untuk dijana semula (Zárate *et al.*, 1999). Sehingga kini, penjanaan semula *C. roseus* yang berjaya dengan menggunakan teknik kultur tisu tanpa transformasi hanya sedikit, walau bagaimanapun keputusannya semakin memuaskan (Constabel *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1994, Lee *et al.* 2003).



Kebanyakan transformasi *C. roseus* dijalankan bertujuan untuk meningkatkan kandungan alkaloid dan jarang sekali untuk tujuan lain. Keputusan terhadap kajian kultur tisu dan transformasi *C. roseus* adalah berlainan bergantung kepada fenotip tumbuhan. Tumbuhan *C. roseus* yang berlainan warna bunga memberi keputusan yang berlainan terhadap tindakan hormon (Lee *et al.* 2003) dan bakteria yang berlainan.

1.2 OJEKTIF KAJIAN

Kajian ini bertujuan untuk:

- membangunkan satu sistem transformasi untuk *C. roseus*,
- mengkaji pengaruh tempoh masa pra-kultur dan ko-kultur yang berlainan terhadap transformasi ke atas *C. roseus*, dan
- mengkaji kebolehan transformasi strain *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 terhadap *C. roseus* yang berlainan warna bunga.



BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 *Catharanthus roseus*

C. roseus (Rajah 2.1) yang juga digelar dalam nama saintifik yang lain sebagai *Vinca rosea*, *Lochnera rosea*, *Ammocallis rosea*. Dalam bahasa Greek, *katharas* bermaksud tulen manakala *anthus* bermaksud bunga. Tumbuhan ini dipercayanya berasal dari Madagascar dan tersebar ke banyak negara tropik. Antara nama umum tumbuhan ini termasuk Madagascar periwinkle, rosy periwinkle, old maid, kemunting cina, tahi anjing, chang chun hua dan lain-lain (Umberto Quattrocchi, 2000; Wiersema dan León, 1999). *C. roseus* tergolong dalam famili Apocynacea (Jadual 2.1). Tumbuhan ini renek, batangnya berkayu dan ia dapat tumbuh sehingga ketinggian satu hingga dua kaki. Daunnya kira-kira satu hingga dua inci panjang, berwarna hijau gelap, ringkas dengan margin yang licin, tumbuh bertentangan, berlignin pada bahagian bawah daun. Jika batangnya dilukakan, lateks akan mengalir keluar. Bunganya mempunyai 5 kelopak dan mempunyai pelbagai jenis warna yang menarik. Buahnya berbentuk panjang, lampai, dan berpasangan. Biasanya penjanaan semula tumbuhan ini melalui bijih benih atau menggunakan batangnya (Dewick, 2002; Wiart, 2000). Taksonomi tumbuhan ini dinyatakan pada Jadual 2.1.



Jadual 2.1 Klasifikasi *C. roseus*

Alam	: Planta
Sub-alam	: “Tracheobionta” (Bervaskular)
“Superdivision”	: “Spermatophyta” (Berbijig bernih)
Divisi	: “Magnoliophyta” (Berbunga)
Kelas	: “Magnoliopsida” (Dikotileton)
Sub-kelas	: “Asteridae”
Order	: “Gentianales”
Famili	: “Apocynaceae”
Genus	: <i>Catharanthus</i>
Spesies	: <i>Catharanthus roseus</i>

**Rajah 2.1** Tumbuhan *C. roseus* yang digunakan dalam kajian. A) Bunga berwarna merah jambu, B) bunga berwarna putih, C) bunga berwarna ungu.

Tumbuhan ini biasa ditanam sebagai tumbuhan hiasan di sekitar rumah ataupun bandar. Ini disebabkan tumbuhan ini mempunyai ketahanan yang sangat tinggi terhadap cuaca yang panas. Kepelbagaian warna bunga, ketahanan bunga dan kemampuan ia berbunga sepanjang tahun membolehkan tumbuhan ini dijadikan tumbuhan hiasan. Malangnya, tumbuhan ini mudah diserang penyakit yang disebabkan virus (Lampiran B).

2.2 KEGUNAAN *C. roseus* DALAM BIDANG PERUBATAN TRADISIONAL DAN MODEN

Selain daripada mencantikkan persekitaran, ia juga adalah herba yang berguna. Ia mengandungi kira-kira 150 jenis alkaloid tersebar di bahagian berlainan pada seluruh tumbuhan (Dewick, 2002). Alkaloid merupa salah satu hasil metabolisma sekunder. Kebanyakan hasil metabolisma sekunder ialah bertujuan untuk mempertahankan tumbuhan daripada serangan bakteria, haiwan, serangga dan lain-lain organisma kerana bertoksik atau bertujuan untuk menarik perhatian agen pendebungaan kerana berbau wangi dan fungsi-fungsi lain, tetapi jarang sekali membantu pertumbuhan. Van der Heijden *et al.*(1989) telah menyenaraikan alkaloid-alkaloid yang diasing melalui teknik kultur sel dan tisu *C.roseus* dalam siasatan literatur mereka. Sebanyak 55 jenis alkaloid dan 9 jenis hasil metabolisma sekunder yang lain tersenarai di dalam.

Kandungan alkaloid yang pelbagai jenis menyebabkan tumbuhan ini digunakan untuk mengubati pesakit sejak dahulu. Tumbuhan ini bukan saja digunakan dalam perubatan tradisional, ia juga amat berguna dalam perubatan moden.

2.2.1 Perubatan Tradisional

Dalam perubatan tradisional di Tanah Melayu, ia biasa digunakan sebagai ubat untuk mengubati penyakit kencing manis, cirit-birit, bengkak usus, penyakit darah tinggi, kesakitan semasa haid, merawat luka yang disebabkan oleh terbakar, tercalar, bengkak dan lain-lain lagi. Negara-negara yang biasa menggunakan tumbuhan ini sebagai ramuan untuk mengubati penyakit kencing manis adalah seperti negara-negara Asia



Tenggara, India, dan Afrika Selatan. Berdasarkan kegunaan herba ini dalam perubatan tradisional sebagai ubat penyakit kencing manis, *C. roseus* telah dibawa oleh sekumpulan saintis Kanada untuk membuat kajian antidiabitik daripada ekstrak tumbuhan ini pada tahun 60an (Wiert, 2000).

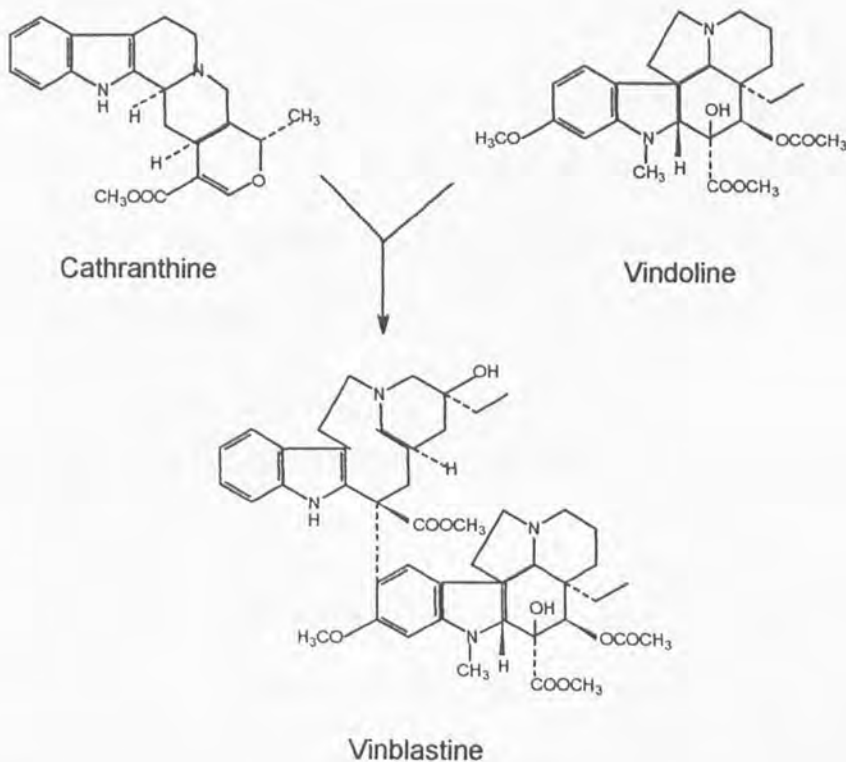
2.2.2 Perubatan Moden

Pada mulanya, tumbuhan ini diuji potensinya terhadap aktiviti hipoglicaemik, tetapi ekstrak tumbuhan ini tidak memberi sebarang tindakan terhadap tahap gula dalam darah. Sebaliknya ekstrak daun didapati berkebolehan untuk menentang sel darah putih yang ada pada tikus. Penyelidik-penyelidik dari syarikat Eli Lilly, syarikat pengeluar ubat, telah membuat kajian lanjut terhadap kandungan fitokimia tumbuhan ini. Ekstrak tumbuhan ini didapati berpotensi untuk mengubati kanser. Dengan itu, dalam perubatan moden tumbuhan ini digunakan untuk mengubati beberapa jenis kanser (Wiert, 2000).

Alkaloid-alkaloid yang unik dalam tumbuhan ini ialah vinblastine dan vincristine yang digunakan sebagai kimoterapi dalam kanser. Vinblastine yang terutama digunakan untuk merawat penyakit *Hodgkin*, serta kanser yang mempengaruhi nodul limpa, limpa, dan hati. Vincristine adalah antitumor yang kuat berbanding dengan vinblastine dan neurotoksik. Ia amat berguna untuk mengubati leukemia pada peringkat kanak-kanak. Selain itu, ia turut diguna untuk pesakit limfomas, kanser paru sel kecil (*small cell lung cancer*), serta kanser serviks dan buah dada. Biasanya, ia disuntik masuk ke dalam badan pesakit dengan kombinasi ubat anti-kanser yang lain (Dewick, 2002).



Malangnya alkaloid di bahagian daun ini adalah amat sedikit dan susah dihasilkan melalui teknik kultur tisu terutama vincristine. Ia memerlukan lebih kurang 500 kg tumbuhan ini untuk mendapat 1g vincristine dan sehingga kini, vincristine tidak dapat dihasilkan melalui teknik kultur tisu. Walau bagaimanapun, ia dapat dihasilkan dengan menukar vinblastine ke vincristine dengan kawalan pengoksidaan asid kromik atau melalui N-demethylation dengan *Streptomyces albogriseolus*. Memandangkan hasil vinblastine yang terhad dalam tumbuhan ini, penyelidik telah mensintesisasikan vincristine daripada catharanthine dan vindoline. Kedua-dua alkaloid ini merupakan “precursor” kepada vincristine dan vinblastine (Garnier *et al.*, 1999) dan kandungan kedua-dua alkaloid ini tinggi dalam tumbuhan tersebut (Rajah 2.2). Oleh itu, mereka digunakan mensintesisasikan vincristine dan juga vinblastine (Dewick, 2002).



Rajah 2.2 Pembentukan vinblastine (Sumber: Moreno *et al.*, 1995)

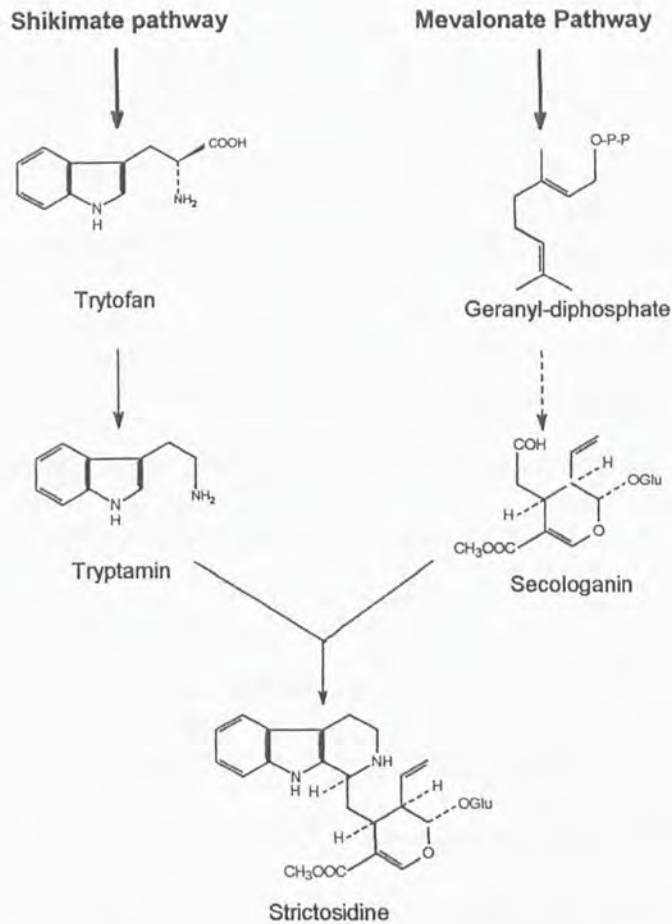
Setiap bahagian di seluruh *C. roseus* mengandungi jenis dan kandungan alkaloid yang berlainan. Menurut penyelidikan yang telah dibuat, ramai ahli sains telah menggunakan bahagian berlainan pada tumbuhan untuk kajian (Moreno *et al.*, 1995; Garnier *et al.*, 1999).

Daripada siasatan literatur yang dibuat oleh Van der Heijen *et al.* (1989) sehingga tahun 1988 dan Moreno *et al.* (1995) dari tahun 1988 hingga 1993 serta Ganapathi dan Kargi (1990) merumuskan faktor-faktor yang menjejaskan biosintesis metabolisma sekunder dalam *C.roseus* untuk menghasilkan alkaloid-alkaloid. Faktor-faktor yang menjejaskan penghasilan metabolisma sekunder termasuk kandungan nitrogen, fosfat, sukrosa, dan mineral yang lain dalam medium, kombinasi hormon, pH, cahaya, suhu, pengudaraan, dan tekanan. Kandungan sitokinin (hormon) sahaja dapat meningkatkan penghasilan alkaloid dalam tumbuhan ini (Garnier *et al.*, 1999; Decendit *et al.*, 1992). Selain daripada itu, hasil gabungan daripada “shikimate pathway” dan “mevalonate pathway” iaitu strictosidine (Canel *et al.*, 1998), “precursor” pertama dalam biosintesis bagi terpenoid indol alkaloid (Rajah 2.3) juga dapat meningkatkan hasil alkaloid dalam tumbuhan (Van der Heijen *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1995; Ganapathi, 1990).

2.3 TRANSFORMASI DENGAN MENGGUNAKAN *A tumefaciens*

Transformasi menggunakan *A. tumefaciens* bukan satu teknik yang baru. *A. tumefaciens* adalah bakteria tanah yang membabitkan dalam pembentukan bengkak pada tempat luka. Ia dapat menjangkit kebanyakan tumbuhan dikotiledon berbanding dengan tumbuhan monokotiledon. *A. tumefaciens* boleh mengakibatkan pembentukan





Rajah 2.3 Biosintesis untuk strictosidine. Anak panah jelas menunjukkan hanya sekali tindakan enzim. Anak panah terputus-putus menunjukkan beberapa kali tindakan enzim. (Sumber Canel *et al.*, 1998)

tumor manakala *A. rhizogenes* mengakibatkan pembentukan akar dengan banyak (Draper dan Scott, 1994). Ia telah lama digunakan oleh ahli sains untuk mengkaji tindak balas tumbuhan terhadap gen asing yang dibawa oleh bacteria ini. *A. tumefaciens* membawa plasmid Ti yang akan mengakibatkan pembentukan tumor. Secara umumnya plasmid Ti adalah berbentuk bulat dan mempunyai empat kawasan umum iaitu T-DNA, permulaan replikasi, konjugasi plasmid, dan kawasan virulen.

RUJUKAN

- Almeida, W. A. B., Mourão Filho, F. A. A., Pino, L. E., Boscarol, R. L., Rodriguez, A. P. M., dan Mendes, B. M. J., 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbesk. *Plant Science* **164**, 203-211.
- Archilletti, T., Lauri, P., dan Damiano, C., 1995. Agrobacterium-mediated transformation of leaf pieces. *Plant Cell Report* **14**, 267-272.
- Canel, C., Inês Lopes-Cardoso, M., Whitmer, S., Van der Fits, L., Pasquali, G., Van der Heijden, R., Hoge, J. H. C., dan Verpoorte, R., 1998. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell culture of *Catharanthus roseus*. *Planta* **205**, 414-419.
- Cervera, M., Juárez, J., Navorro, A., Pina, J. P., Duran-Vila, N., Navorro, L., dan Peña, L., 1998. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research* **7**, 51-59.
- Constabel, F., Gaudet-Laprairie, P., Kurz, K. G. W., Kutney, J. P., 1982. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don IV: Variation in alkaloid spectra of cell lines derived from one single leaf. *Plant Cell Report* **1**, 139-1423
- Draper, J. dan Scoot, R., 1994. Gene Transfer to Plant. Dlm: Grierson, D. (eds), *Plant Biotechnology Series Volume 1: Plant Genetic Engineering*. Blackie Academic and Professional Glasgow, United Kingdom.
- Decendit, A., Lui, D., Ouelhazi, L., Doireau, P., Mérillon, J. M., dan Rideau, M., 1992. Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures - The factors affecting the cytokinin response. *Plant Cell Reports* **11**, 400-403.



- Dewick, P. M., 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthesis Approach*. Ed. ke-2. John Wiley & Son, London, 356-357 ms.
- Gamborg, O. L., dan Philips, G. C. (eds), 1995. *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods*. Springer-Verlag, New York.
- Ganapathi, B., dan Kargi, F., 1990. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *Journal of Experimental Botany* **41**, 259-267.
- Garnier, F., Hamdi, S., Label, P. dan Rideau, M., 1999. Genetic Transformation of *Catharanthus roseus* (Periwinkle). Dlm: Bajaj, Y. P. S. (eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry volume 45: Transgenic Medical Plants*. Springer-Verlag, New York, 88-102 ms.
- Grant, J. E., Dommissie, E. M., Christey, M. C. dan Conner, A.J., 1993. Gene Transfer to Plants Using *Agrobacterium*. Dlm: Murray, D. R. (eds), *Biotechnology in Agriculture No. 4: Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*. C. A. B. International, British, 50-67 ms.
- Hillou, F., Christou, P. dan Leech, M. J., 1999. Development of an efficient transformation system for *Catharanthus roseus* cell cultures using particle bombardment. *Plant Science* **140**, 179-188.
- Kim, S. W., Song, N. H., Kwak, S. S., dan Lui, J.R., 1994. High frequency plant regeneration from anther-derived cell suspension cultures via somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* **13**, 319-322
- Le, V. Q., Belles-Isles, J., Dusabenyagasani, M., dan Trembly, F. M., 2001. An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2089-2095.



- Lee, S. Y., Choi, P. S., Chung, H. J., In, D. S., Choi, D. W., dan Lui, J. R., 2003. Comparison of adventitious shoot formation in petiole explant cultures of 20 cultivars of *Catharanthus roseus*. *Journal Plant Biotechnology* **5** (1), 59-61.
- Moreno, P. R. H., Van der Heijden, R. dan Verpoorte, R., 1995. Cell and tissue cultures of *Catharanthus rosues*: a literature survey II. Updating from 1988 to 1993. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**, 1-25.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Schrott, M., 1995. Selectable Marker and Reporter Genes. Dlm: Potrykus, I. dan Spangenberg, G. (eds), *Gene Transfer to Plants: Springer Lab Manual*. Springer-Verlag, New York, 325-332 ms.
- Shirsat, A. H., Gatehouse, J. A., dan Robinson, N. J., 1999. Regulation of Gene Expression. Dlm: Lea, P. J. dan Leegood, R. C. (eds), *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. ke-2. John Wiley & Son, London, 261-285 ms.
- Umberto Quattrochi, F.L.S., 2000. *CRC World Dictionary of Plant Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms , and Etymology*. Volume A-C. CRC Press, Boca Raton.
- Van der Heijden, R., Verpoorte, R., dan Ten Hoopen, H.J.G., 1989. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **18**, 231-280.
- Wiert, C., 2000. *Medical Plants of Southeast Asia*. Pelanduk , Selangor, 111-112 ms.
- Wiersema, J. H. dan León, B., 1999. *World Economic Plants: A Standard Reference*. CRC Press, Boca Rotan, 114 ms.



Yu, T. A., Yeh, S. D., dan Yang, J. S., 2001. Effects of carbenicillin and cefotaxim on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **42**, 281-286.

Zárate, R., Memelink, J., Van der Heijden, R. dan Verpoorte, R., 1999. Genetic transformation via particle bombardment of *Catharanthus roseus* plant through adventitious organogenesis of buds. *Biotechnology Letters* **21**, 997-1002.

