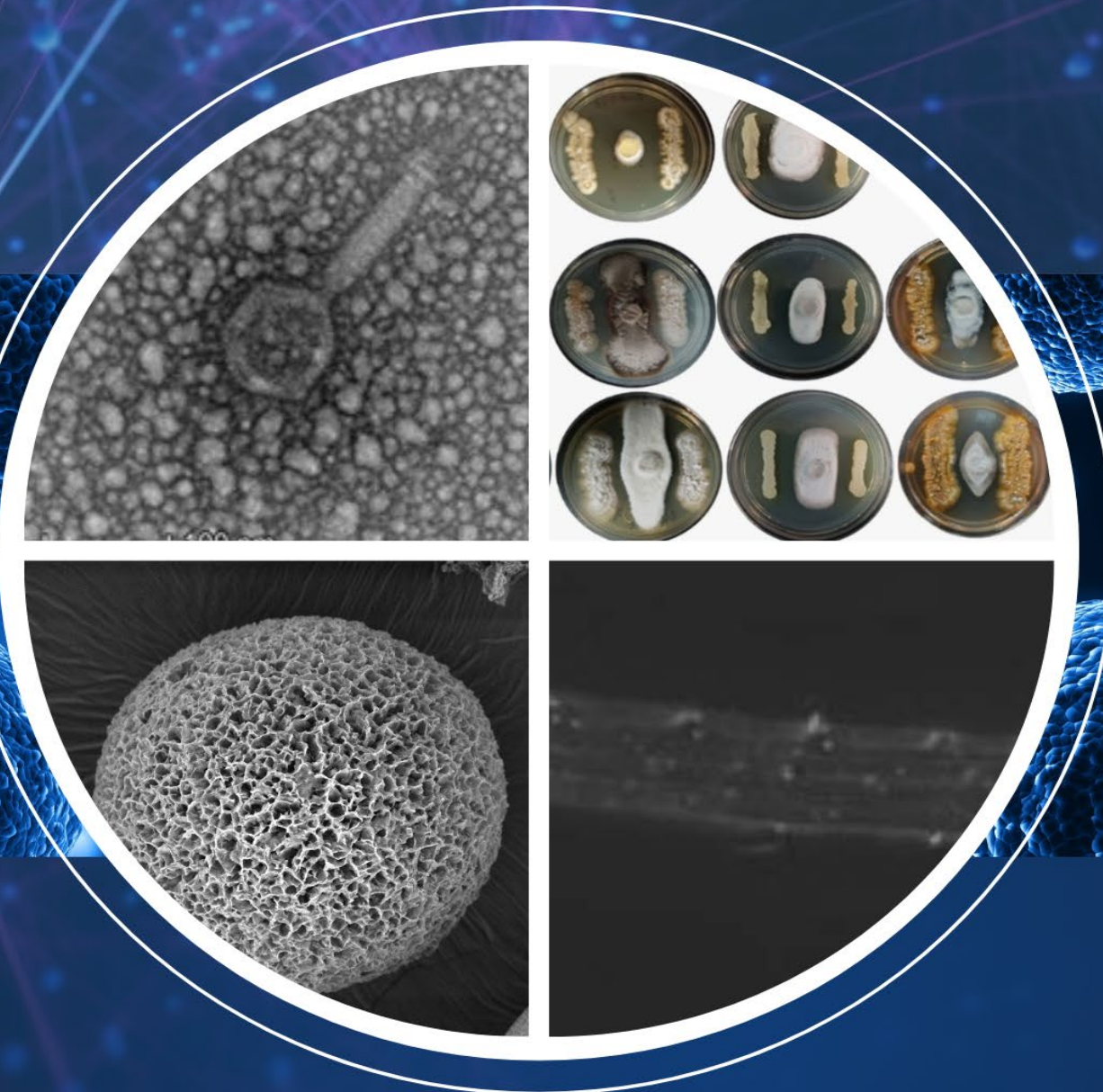


Undergraduate Research Journal for
**Biological Sciences and
Biotechnology**
Jurnal Penyelidikan Prasiswazah
Sains Biologi dan Bioteknologi

Undergraduate Research Journal for Biological Sciences and Biotechnology Jurnal Penyelidikan Prasiswazah Sains Biologi dan Bioteknologi

Volume 1 October 2025



Undergraduate Research Journal for Biological Sciences and Biotechnology

Jurnal Penyelidikan Prasiswazah untuk Sains Biologi dan
Bioteknologi

Editorial Board

Dr. Mohammad Saiful Mansor (Editor-in-Chief)

Dr. Izwan Bharudin

Dr. Mohd Asif Mohd Sukri

Dr. Amirah Mohammad Sidik

Dr. Fariza Juliana Nordin

Journal Scope

The Undergraduate Research Journal for Biological Sciences and Biotechnology publishes original scientific articles across all fields of biology and related disciplines, featuring research conducted by undergraduate students as part of their academic requirements. For Volume I, the journal highlights four key fields: Microbiology, Genetics, Biotechnology, and Biochemistry. Manuscripts are considered based on originality, significance of findings, clarity of presentation, and scientific accuracy, and may include novel data, innovative ideas, or new interpretations that contribute to scientific knowledge. All submissions undergo peer review by referees appointed by the Editorial Board, and only original, previously unpublished work will be accepted. Authors are responsible for obtaining written permission to reproduce any materials from other sources, including figures, tables, and illustrations.

Open Access

The journal is an open-access publication freely available online. Users may read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full text of its articles without prior permission from the publisher or the authors.

Copyright

Any reproduction of figures, tables, or illustrations requires written permission from the Editor-in-Chief (urjbsbt@ukm.edu.my). No part of this journal may be reproduced in any form without prior authorization from the Editor-in-Chief.

Image Credits

Cover photo: Muhammad Ashraf Shahidan, Izwan Bharudin and Amirah Mohammad Sidik

The journal is published by:
Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Printed in Malaysia by
UKM Publisher
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

The journal is published biannually

eISSN 3120-306X

Article	Title	Page
1	Design of sgRNA and in vitro cleavage assay targeting PMR4 gene <i>How Di Shen & Zamri Zainal</i>	1-8
2	Analisis Kelimpahan Gen cbbLR dan mcrA serta Komuniti Mikrob yang Terlibat dalam Kitar Karbon dan Metanogenesis dalam Enapan Bakau <i>Lee Yee Lynn I, Nur Ain Natasha I, Nur Hazlin Hazrin-Chong</i>	9-19
3	Kajian Sistematik Dan Penentuan Kumpulan Haplo Berdasarkan Mutasi Hotspot Di Gen MT-ND1 Pada DNA Mitokondria Manusia <i>Vaishnave A/P Loga Raju, Siti Zahidah Binti Zahari, Shahrul Hisham Zainal Ariffin, Rus Dina Rus Din, Intan Zarina Zainol Abidin & Rohaya Megat Abdul Wahab</i>	20-28
4	Pengekspresan gen mengekod asid lemak desaturase <i>Phenoliferia glacialis</i> <i>Adilah Faqihah Abdul Kadir, Ain Nur Afifah Azman & Izwan Bharudin</i>	29-35
5	Penilaian Semula Ubat untuk Pengenalpastian Agen Anti-Jangkitan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Nabila Umairah Binti Isham Alwady, Levyashini G Subashandar, How Shu Sian & Sylvia Chieng</i>	36-44
6	Pemencilan dan Pencirian Bakteriofaj terhadap Bakteria Patogen dari Sampel Air Loji Rawatan Kumbahan UKM, Kampus Bangi <i>Ainul Mardiah, Farisha Farahanim, Nur Neesa Athirah & Nazlina Ibrahim</i>	45-53
7	Pemencilan dan Pencirian Bakteria Pencurai Lemak, Minyak dan Gris (FOG) Dari Air Sisa Restoran <i>Nur Farzana Haziqah Abu Samah, Nurfatehah Khairul Anuar, Nor Hidayu Abu Bakar, Nur Husna Mohamad & Fareed Sairi</i>	54-61
8	Ekstrak air <i>Polygonum minus</i> (kesum) menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap <i>Helicobacter pylori</i> rintang antibiotik <i>Aina Yasirah Yahya, Asif Sukri, Alfizah Hanafiah, Noraziah Mohamad Zin, Nazlina Ibrahim & Wan Syaidatul Aqma</i>	62-68
9	Kesan penyebuan <i>Bacillus</i> spp. terhadap percambahan biji benih padi UKMRC2 di bawah tekanan abiotik <i>Wan Nur Farah Ain Wan Di, Farah Arina Abdul, Ahmad Razi Othman & Noor Liyana Sukiran</i>	69-76
10	Kesan Efluen Kilang Kelapa Sawit (POME) Terhadap Pertumbuhan dan Populasi Proteobakteria Tanah Tanaman Pokok Cili <i>Atiqah Farhana Binti Azri & Nurul Yuziana Mohd Yusof</i>	77-84
11	Kesan Kulat Entomopatogen (EPF) Terhadap Pengawalan Afid <i>Toxoptera citricida</i> Pada Tanaman Limau Kasturi <i>Citrofortunella macrocarpa</i> <i>Nurul Lisa Zulfakri, Muhammad Shahrul Haqimi Mohd Faizal, Mohamad Ruzi Abdul Rahman & Johari Jalinis</i>	85-98

12	Characterisation of protease and xylanase from <i>Bacillus subtilis</i> SUNGB2 <i>Yvonne Yve Wen Thoe, Farah Nazirah Rostam & Izyanti Ibrahim</i>	99-106
13	Penentuan Aktiviti Antibakteria Bagi Ekstrak Gaharu <i>Aquilaria malaccensis</i> Aruhan Semula Jadi <i>Siti Shazleena Abdul Aziz, Yashirdisai Sampasivam & Roohaida Othman</i>	107-114
14	Pemencilan dan Pencirian Rizobakteria Penggalak Pertumbuhan Tumbuhan (PGPR) Daripada Rizosfera Pokok Bunga di Malaysia <i>Nur Hanis Solehah Norizam, Mona Fatin Syazwanee Mohamed Ghazali & Abdul Munir Abdul Murad</i>	115-124
15	The Impact of Salinity Stress on The Growth of NMR IS21 and NMR 191 Rice Varieties <i>Liong Ee Yan, Wan Asrina Wan Yahya, Sobri Hussein & Nurulhikma Md Isa</i>	125-133
16	Extracellular ATP and ADP Signalling Molecules Influence <i>Arabidopsis thaliana</i> Root Growth Under Salinity Stress <i>Wan Aimi Nabilah Wan Marzuki & Amirah Mohammad-Sidik</i>	134-142
17	Ecotoxic Effects of Titanium Dioxide (TiO₂) in Sun Protection Against Removal of Symbiotic Algae <i>Anemonia majano</i> <i>Siti Nuraisyah Zailani & Herryawan Ryadi Eziwar Dyari</i>	143-148
18	Intervensi Fitoterapeutik <i>Moringa oleifera</i> Dan <i>Nigella sativa</i> Terhadap Parameter Kesuburan Tikus Jantan Aruhan Obesiti <i>Nur Amilyn Batrisyia Raffi, Farah Najihah Ismail & Mahanem Mat Noor</i>	149-157
19	Kesan Penambahan Protein Lengai Terhadap Pemegunan Glukosa Oksidase (GOx) pada Nanobunga Hibrid Organik-Tak Organik (HNF) <i>Naga Darsshini Manickavasakam & Muhammad Ashraf Shahidan</i>	158-164
20	Instructions for Authors	165-167

Design of sgRNA and *in vitro* cleavage assay targeting *PMR4* gene

How Di Shen & Zamri Zainal*

*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti
Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: zz@ukm.edu.my*

Abstract: The CRISPR/Cas9 technology is a genome editing tool that has revolutionized molecular biology by enabling precise manipulation of genetic sequences. This study aimed to design and validate single guide RNAs (sgRNAs) targeting the *PMR4* gene in *Solanum lycopersicum*, a gene associated with susceptibility to powdery mildew. Three sgRNAs were designed using bioinformatic prediction tools. The selection of sgRNA was based on bioinformatic analysis using tools such as CHOPCHOP and CRISPR-GE 2.0. The efficiency of the designed sgRNA was tested through *in vitro* cleavage assays. Gel electrophoresis analysis showed specific cleavage at the *PMR4* sequence, producing two fragments from the targeted double stranded DNA genome fragments which were amplified via polymerase chain reaction (PCR) with forward and reverse primers to produce fragment size about 904 bp. The result of sgRNA-Cas9 *in vitro* cleavage assays show high precision and efficiency which successfully cut into two different fragment sizes (541 bp and 363 bp) as expected. This study highlights the importance of designing optimal sgRNA to reduce off-target mutations, enhance genome editing efficiency and confirm the potential of the designed sgRNAs for downstream genome-editing applications in tomato, providing a foundation for developing powdery mildew-resistant varieties.

Keywords: CRISPR/Cas9; sgRNA; *PMR4* gene; tomato plant

Abstrak: Teknologi CRISPR/Cas9 merupakan teknologi penyuntingan genom yang telah merevolusikan bidang biologi molekul dengan keupayaan untuk memanipulasi jujukan genetik secara spesifik. Dalam kajian ini, RNA panduan tunggal (sgRNA) telah direka bentuk dan disah untuk menyasarkan gen *PMR4* pada tomato, *Solanum lycopersicum*, yang berkaitan dengan kerentanan terhadap penyakit kulupuk berdebu. Tiga sgRNA telah dipilih berdasarkan analisis bioinformatik menggunakan perisian seperti CHOPCHOP dan CRISPR-GE 2.0. Kecekapan sgRNA telah diuji melalui analisis pengasaan pembelahan secara *in vitro*, di mana analisis gel elektroresis menunjukkan belahan spesifik pada jujukan gen *PMR4* dengan menghasilkan dua fragmen daripada fragmen genom DNA bebenang ganda dua yang diamplifikasikan melalui tindak balas berantai polimerase (PCR) yang menghasilkan fragmen genom DNA bersaiz 904 bp melalui reka bentuk primer hadapan dan belakang. Hasil ini membuktikan kejayaan sgRNA-Cas9 untuk pengasaan pembelahan *in vitro* adalah tepat dan cekap di mana berjaya memotong dua saiz fragmen yang berbeza (541 bp dan 363 bp) yang dijangkakan. Kajian ini menekankan pentingnya reka bentuk sgRNA yang optimum untuk mengurangkan mutasi luar sasaran, meningkatkan keberkesanan penyuntingan genom dan mengesahkan potensi sgRNA yang direka untuk aplikasi penyuntingan genom selanjutnya dalam tomato, serta menyediakan asas untuk pembangunan varieti tomato yang tahan terhadap penyakit kulupuk berdebu.

Kata kunci: CRISPR/Cas9; sgRNA; gen *PMR4*; tumbuhan tomato

1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important crops worldwide, including in Malaysia, due to its rich content of lycopene, vitamins, and minerals, which contribute valuable nutrients to the human diet (Zhu et al. 2018; Zhu & Qian 2020). However, its production is affected by powdery mildew disease caused by the fungus *Oidium neolycopersici*, a widespread disease that threatens tomato production (Jones et al. 2001; Lebeda et al. 2014). The impact of powdery mildew disease can lead to stunted growth, reduced fruit quality, and lower yields. If not managed at an early stage, it can result in severe economic losses (Aumentado et al. 2023). Previous studies have shown that the *PMR4* gene plays a crucial role in callose deposition at the pathogen penetration sites in the cell wall, which is essential for plant defense mechanisms (Eggert et al. 2014). The absence of this gene's expression in tomatoes can enhance resistance through activating the salicylic acid (SA) signaling pathway (Ellinger et al. 2013).

Genome editing is a biotechnological technique that enables precise modification of an organism's DNA, including in plants, bacteria, and animals. It allows targeted genetic changes to facilitate the study of gene functions and to develop improved crop varieties. Genome editing systems such as Zinc Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) are cutting-edge technologies used for precise genetic modifications and have demonstrated effectiveness in targeted organisms. The CRISPR-Cas9 system adapted from the adaptive immune mechanisms found in bacteria and archaea was discovered in the 1980s (Adli, 2018). CRISPR consists of repetitive elements separated by non-repetitive DNA sequences known as spacers (Adli, 2018). The CRISPR genome editing system consists of two main components: single-guide RNA (sgRNA) and the Cas (Cas9) nuclease enzyme. The sgRNA guides the Cas9 enzyme to a specific location in the genome, where it introduces double-stranded breaks (DSBs) in the DNA. The plant's natural repair mechanisms then respond to these breaks. Non-homologous end joining (NHEJ) can lead to small insertions or deletions of nucleotides at the target site, while homologous recombination (HR) can result in precise gene replacements or the insertion of new DNA sequences (Bahariah et al. 2023).

Genome editing to enhance tomato resistance against powdery mildew can be performed through four basic protocols: designing the sgRNA construct, assembling the sgRNA expression cassette into the CRISPR/Cas9 binary vector, transformation processes, and sequence analysis for targeted mutations. These two RNAs (tracrRNA and crRNA) are combined into a single-guide RNA (sgRNA) with a dual tracrRNA-crRNA secondary structure which is effectively used in genome editing (Miao et al. 2013). However, this study specifically focuses on the identification and selection of target sequences, followed by the design and production of sgRNA.

2. Materials and Methods

2.1 Seedling preparation

Tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds were germinated using moist tissue as a medium. Seeds were spaced adequately to minimize competition for nutrients. Germination took place for one to three days before seedlings were transferred to soil-filled containers.

2.2 Identification and characterization of *pmr4* gene sequences in databases and *sgRNA* selection

The target DNA sequence of the *PMR4* gene was retrieved from genomic databases such as NCBI (accession number: NC_015444.3), which provides comprehensive information on gene annotation and structure. This data was crucial in designing specific and accurate sgRNAs for the CRISPR/Cas9 system.

2.3 *sgRNA* candidates sequence identification analysis using bioinformatics tools

Online tools, CHOPCHOP, were utilized to refine target sequences and generate a list of potential sgRNAs, ranked based on efficiency, GC content, self-complementarity scores, and off-target

mutation score. Additional bioinformatics tools such as CRISPR-GE 2.0, UNAFold, and NCBI-BLAST were used to validate secondary structures and homologous sequences.

2.4 Primer design for *PMR4* gene fragment

The *PMR4* gene sequence of tomato (*S. lycopersicum*) was obtained from NCBI (accession number: NC_015444.3) and used for primer design. Primers were generated with CHOPCHOP and validated using Primer-BLAST for efficiency, specificity, and off-target analysis.

2.5 Amplification of sgRNA coding template

PCR amplification of the sgRNA coding template was performed using the Guide-it IVT RNA kit. The reaction mixture contained 2X PrimeSTAR Max Premix, a 1.0 μ M guide-it template, and forward primer in a total reaction volume of 25 μ L. PCR was conducted for 33 cycles at 98°C for 10 seconds and 68°C for 10 seconds. The amplified products were analyzed using 2.0% agarose gel electrophoresis and one replicate was performed.

2.6 In Vitro Transcription (IVT) of sgRNA

Following template amplification, sgRNA was transcribed *in vitro* using the Guide-it IVT RNA polymerase. The IVT reaction mixture, comprising the amplified sgRNA template, IVT buffer, T7 RNA polymerase, and RNase-free water, was incubated at 37°C for 8 hours. After transcription, recombinant DNase I added to degrade the DNA template. The reaction was further incubated and centrifuged to ensure complete digestion. The transcribed sgRNA was purified using the Guide-it™ RNA Clean-Up Kit and one replicate was performed.

2.7 Purification and quantification of sgRNA

The sgRNA was purified using phenol extraction to eliminate contaminants. Purified RNA was resuspended in RNase-free water. The concentration and purity of the transcribed sgRNA were measured using a spectrophotometer.

2.8 Amplification of *PMR4* gene fragment

Primers for *PMR4* gene fragments amplification were designed using CHOPCHOP, ensuring optimal GC content, melting temperature, fragment size, and minimal off-target effects. Genomic DNA was extracted using a modified CTAB protocol from young tomato leaves. DNA purity and concentration were determined using a spectrophotometer. PCR amplification of the *PMR4* gene fragments was conducted with 2X Terra PCR buffer, concentration of 10 μ M forward and reverse primers respectively, and concentration of 250ng gDNA in a 50 μ L reaction. PCR conditions included an initial denaturation at 98°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation (98°C for 15 sec), annealing (60°C for 30 sec), and extension (68°C for 1 min/kb). Amplicons were verified using 1.5% agarose gel electrophoresis and one replicate was performed.

2.9 In vitro cleavage assay of *PMR4* gene

The cleavage assay was performed using a reaction mixture containing concentration of 50ng sgRNA, concentration of 250ng Cas9 nuclease, cleavage buffer, and concentration of 200 ng *PMR4* gene fragment in a total volume of 15 μ L. The sgRNA-Cas9 complex was pre-incubated at 37°C for 5 minutes before adding the DNA template. The cleavage reaction proceeded at 37°C for 1 hour and was inactivated at 80°C for 30 minutes. The digestion products were analyzed using 1.5% agarose gel electrophoresis and one replicate was performed.

3. Results and Discussion

3.1 Search and characterization of the *PMR4* gene sequence from the database

This study utilized the CRISPR/Cas9 system to enhance resistance to Powdery Mildew disease in *Solanum lycopersicum* cultivar Heinz 1706. The *PMR4* gene was selected to evaluate the efficiency of sgRNA in performing specific *in vitro* cleavage assay, which supports subsequent *in vivo* applications. The *PMR4* gene sequence was retrieved from the NCBI genomic database (accession number: NC_015444.3). It is located on chromosome seven and consists of three exons, as illustrated in Figure 1.

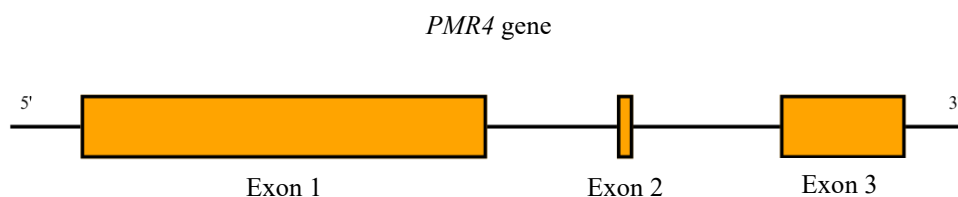


Figure 1. The location of exons in the *PMR4* gene sequence.

3.2 Search and characterization of sgRNA sequences and analysis of sgRNA candidates by using bioinformatic tools

The coding sequence (CDS) from the first exon of *PMR4* gene was used to design three candidate sgRNAs. Three sgRNAs (sgRNA1, sgRNA2, and sgRNA3) were selected based on their high-ranking positions generated by the CHOPCHOP web tool (Table 1). Among these, sgRNA2 exhibited the highest GC content (60%), while sgRNA1 and sgRNA3 had GC contents of 45% and 50% respectively. The optimal GC content range is between 30% and 80%, and all three candidates fell within this range, indicating high efficiency (Doench et al., 2014; Liu et al., 2016). Further analysis using CRISPR-GE 2.0 confirmed the absence of off-target mutations and homologous sequences, reinforcing the specificity of the selected sgRNAs (Table 1).

Table 1. List of sgRNA candidates selected from CHOPCHOP web tool according to the highest ranking and analysis by CRISPR-GE 2.0.

CHOPCHOP			CRISPR-GE 2.0		
sgRNA	Sequence	Rank	GC (%)	Off-score	Number of Homologous Sequences
sgRNA1	AGAGAGTCAATATTGTCCGG	2	45	0.1999	No
sgRNA2	GGAGACCTCCATTTGCACCG	3	60	0.1418	No
sgRNA3	TCCTTCTCTACGTTTCCCTG	5	50	0.3197	No

3.3 *In vitro* transcription (IVT) of sgRNA

The IVT process, which included amplification, *in vitro* transcription, and purification of sgRNA1, was critical for ensuring efficient and precise cleavage. Analysis using Nanodrop revealed that sgRNA1 had a high concentration and low contamination levels with concentration of 906.40 ng/μl, A260/280 reading of 2.34 and A260/230 reading of 2.60. Gel electrophoresis confirmed the integrity of sgRNA1, with a single band observed at ~130 bp, indicating successful transcription and purification (Figure 2). The absence of primer dimers and secondary structures further validated the efficiency of sgRNA1.

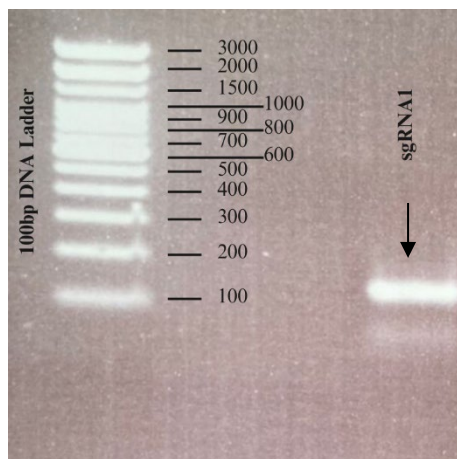


Figure 2. Analysis of 2.0% agarose gel electrophoresis for purified sgRNA1 sample.

3.4 Amplification of the *PMR4* gene fragments

3.4.1 Primer design and efficiency analysis

Primers for amplifying the *PMR4* gene fragments were designed using the CHOPCHOP web tool. The selected forward and reverse primers had melting temperatures (T_m) of 60.1°C and 60.0°C, respectively, and GC contents of 55%, ensuring stability and specificity according to Primer-BLAST (Table 2). Secondary structure analysis confirmed the stability of the primers, with no significant dimer formation observed.

Table 2. Analysis of forward and reverse primer efficiency for amplifying the *PMR4* gene fragments using Primer-BLAST application.

	Forward Primer	Reverse Primer
Sequences (5'-3')	TACACACAAAAGGGGATTTTC	GTCTTTCCAACCTTCTTTCCT
Melting Temperature	56.79°C	58.17°C
GC Content (%)	40.91%	45.45%
Secondary Structure	Not Stable	Not Stable
Formation of Primer		
Dimer at 3' End	3	0

3.4.2 Genomic DNA extraction

Two tomato genomic DNA samples were successfully extracted, with concentrations of 1824.3 ng/μl and 4305.2 ng/μl, respectively. Both samples exhibited high purity, with A260/280 readings at 2.17 and 2.15, A260/230 readings at 2.30 and 2.24 respectively within the optimal ranges. Gel electrophoresis confirmed the presence of intact genomic DNA, although some RNA contamination was detected, which was subsequently treated with RNase (Figure 3).

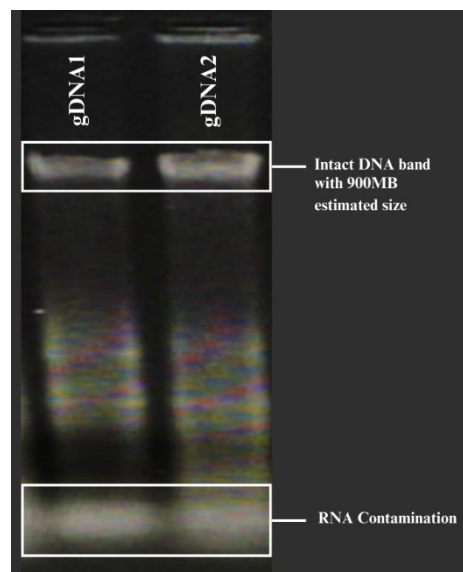


Figure 3. Analysis of 1.0% agarose gel electrophoresis for genomic DNA sample.

3.4.3 PCR amplification of the *PMR4* gene fragments

The amplified *PMR4* gene fragments were analyzed using Nanodrop and gel electrophoresis. The fragments showed high concentration with 906.40 ng/μl, A260/280 reading was 2.34 and A260/230 reading was 2.60 indicate high purity, with a single band indicating successful amplification (Figure 3).

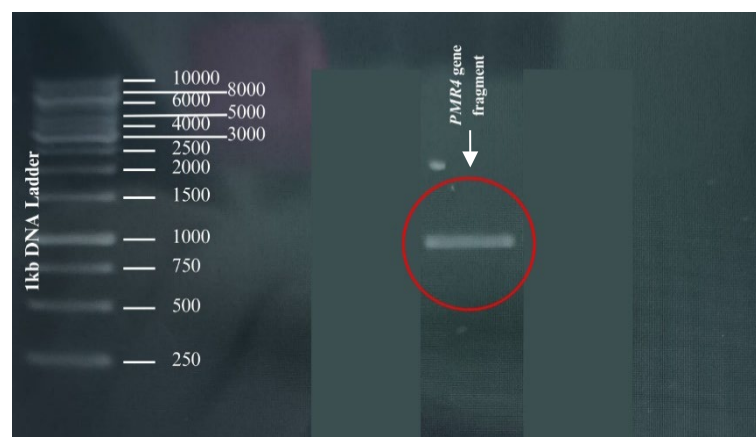


Figure 4. Analysis of 1.0% agarose gel electrophoresis for amplified *PMR4* gene fragments.

3.5 *In vitro* cleavage assay of the *PMR4* gene by Cas9

3.5.1 Analysis of sgRNA cleavage efficiency

The efficiency of sgRNA1 in guiding Cas9 to cleave the *PMR4* gene fragments was confirmed through gel electrophoresis. The appearance of two distinct bands (541 bp and 363 bp) indicated precise cleavage at the target site (Figure 4). The illustration of combined fragment size of 904 bp matched the expected size, confirming the specificity and efficiency of sgRNA1 (Figure 5). The result demonstrated that sgRNA1 effectively guided Cas9 to cleave the *PMR4* gene at the intended target site, validating its potential for further *in vivo* applications.

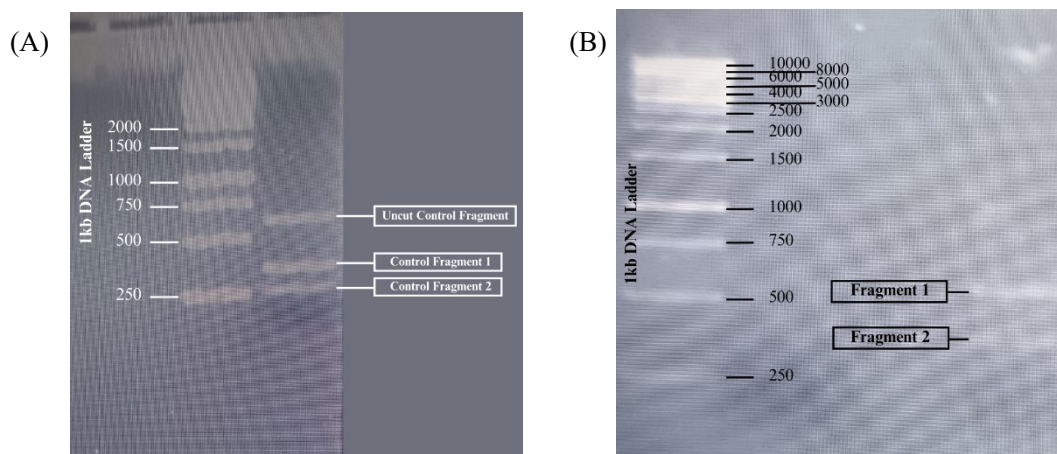
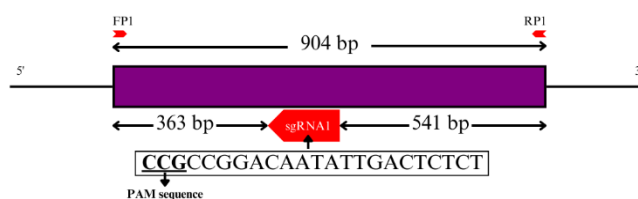


Figure 5. (A) Analysis of 1.5% agarose gel electrophoresis for kit control sgRNA to verify the function of Cas9 enzyme (B) Analysis of 1.5% agarose gel electrophoresis for Cleavage Assay of *PMR4* gene with sgRNA1.

(A) Cleavage Assay of *PMR4* gene



(B) Products After Cleavage Assay of *PMR4* gene

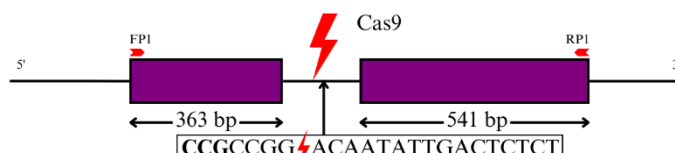


Figure 6. (A) Schematic illustration of sgRNA1 targeting the *PMR4* gene fragment (B) The products after cleavage assay performed by Cas9 with the guide of sgRNA1.

4. Conclusion

This study successfully designed and validated sgRNAs targeting the *PMR4* gene in *S. lycopersicum*, with in vitro assays confirming their efficiency and specificity in directing Cas9-mediated cleavage. These findings provide an essential foundation for applying CRISPR/Cas9 to develop tomato varieties with enhanced resistance to powdery mildew. By demonstrating the feasibility of precise gene targeting, this work supports future efforts in tomato genetic improvement and highlights the potential of genome editing as a tool for sustainable crop protection.

Acknowledgements

This work was supported by grant (FRGS/1/2022/STG01/UKM/01/2) from Ministry of Higher Education (MOHE). Besides, I am grateful to the Department of Biological Sciences & Biotechnology (JSBB) from Faculty of Science and Technology (FST), MBM and MBT for laboratory services and support.

References

- Adli, M. 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. In *Nature Communications*. *Nature Publishing Group* 9(10).
- Aumentado, H. D. R., Guerrero, J. J. G., & Balendres, M. A. O. 2023. Powdery mildew in Southeast Asia: host range, impact, and sources of resistance. *Technology in Agronomy* 3(1): 0–0.
- Bahariah, B., Masani, M. Y. A., Fizree, M. P. M. A. A., Rasid, O. A., & Parveez, G. K. A. 2023. Multiplex CRISPR/Cas9 gene-editing platform in oil palm targeting mutations in EgFAD2 and EgPAT genes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 21(1).
- Eggert, D., Naumann, M., Reimer, R., & Voigt, C. A. 2014. Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. *Scientific Reports* 4.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., & Voigt, C. A. 2013. Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology* 161(3): 1433–1444.
- Jones, H., Whipps, J. M., & Gurr, S. J. 2001. The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. In *Molecular Plant Pathology* 2(6): 303-309.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Petřivalský, M., Luhová, L., Špundová, M., Sedlářová, M., Nožková-Hlaváčková, V., & Pink, D. A. C. 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. In *European Journal of Plant Pathology* 138(3): 569-596.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., & Qu, L. J. 2013. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. In *Cell Research* 23(10): 1233-1236.
- Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., Lin, T., Qin, M., Peng, M., Yang, C., Cao, X., Han, X., Wang, X., van der Knaap, E., Zhang, Z., Cui, X., Klee, H., Fernie, A. R., Luo, J., & Huang, S. 2018. Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding. *Cell* 172(1–2), 249-261.
- Zhu, L., & Qian, Q. 2020. Gain-of-function mutations: Key tools for modifying or designing novel proteins in plant molecular engineering. In *Journal of Experimental Botany* 71(4): 1203-1205.

Analisis Kelimpahan Gen *cbbLR* dan *mcrA* serta Komuniti Mikrob yang Terlibat dalam Kitar Karbon dan Metanogenesis dalam Enapan Bakau

(Abundance of *cbbLR* and *mcrA* gene and Microbial Communities Associated with Carbon Cycling and Methanogenesis in Mangrove Sediment)

Lee Yee Lynn, Nur Ain Natasha & Nur Hazlin Hazrin-Chong*

Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia
* e-mail of corresponding author: hazlin@ukm.edu.my

Abstract: Ekosistem hutan paya bakau merupakan takungan penyimpanan karbon biru yang turut merupakan sumber pembebasan gas metana. Kajian ini bertujuan untuk mengkaji kelimpahan gen *cbbLR* dan *mcrA* relatif yang hadir di dalam enapan bakau Taman Alam Kuala Selangor pada kedalaman berbeza melalui kaedah tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR). Gen *cbbLR* mengekod enzim ribulosa-1,5- bisfosfat karboksilase oksigenase (RuBisCO) yang berperanan dalam pengikatan karbon manakala gen *mcrA* pula mengekod enzim metil-koenzim M reduktase yang penting untuk metanogenesis. Analisis taksonomi dijalankan untuk mengenalpasti kepelbagaian mikrob pengitar karbon dan metana dalam enapan bakau. Selain itu, korelasi antara sifat-sifat fizikokimia tanah dengan kelimpahan gen tersebut pada lapisan permukaan, tengah dan dasar turut dikaji melalui analisis koresponden kanonik (CCA). Hasil dapatan kajian mendapati bahawa kelimpahan gen *cbbLR* paling tinggi di lapisan permukaan (0-10 cm) manakala gen *mcrA* paling tinggi di lapisan tengah (10-50 cm). Komuniti mikrob yang membawa gen *cbbLR* majoritinya adalah daripada famili yang tidak diklasifikasi, *Rhizobiaceae*, *Stappiaceae*, *Paracoccaceae*, *Nitrobacteraceae* dan *Caulobacteraceae* manakala yang membawa gen *mcrA* adalah arkaea metanogen (order Methanobacteriales dan Methanomicrobia) dan kumpulan bakteria seperti order Lactobacillales dan Pseudomonadales. Kelimpahan gen *cbbLR* yang tinggi pada lapisan permukaan dipengaruhi oleh pH, kandungan karbon organik dan nitrogen manakala kelimpahan gen *mcrA* pada lapisan pertengahan tidak dipengaruhi oleh mana-mana faktor yang dikaji. Hasil kajian ini membantu dalam usaha pemuliharaan ekosistem karbon biru serta mengawal pembebasan gas metana.

Keywords: *cbbLR*; *mcrA*; enapan bakau; qPCR; taksonomi

Abstrak: The mangrove forest ecosystem is a blue carbon storage reservoir which is also a source of methane gas release. This study aims to examine the relative abundance of *cbbLR* and *mcrA* genes present in the mangrove sediments from Taman Alam Kuala Selangor at different depths through the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method. The *cbbLR* gene encodes the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO) enzyme that important in carbon fixation while the *mcrA* gene encodes the methyl-coenzyme M reductase enzyme catalyzing methanogenesis. Taxonomic analysis was conducted to identify the diversity of microbes that function in the carbon and methane cycle in mangrove sediments. In addition, the correlation between soil physicochemical properties and the gene abundance in the surface, middle and bottom layers was also studied through canonical correspondence analysis (CCA). The results of these study found that the abundance of the *cbbLR* gene was highest in the surface layer (0-10 cm) while the *mcrA* gene was highest in the middle layer (10-50 cm). Most microbial communities carrying the *cbbLR* gene are from unclassified families, *Rhizobiaceae*, *Stappiaceae*, *Paracoccaceae*, *Nitrobacteraceae* and *Caulobacteraceae* while those carrying the *mcrA* gene are methanogenic archaea (orders Methanobacteriales and Methanomicrobia) and bacterial groups such as the orders Lactobacillales and Pseudomonadales. The high abundance of the *cbbLR* gene in the surface layer was affected by pH, organic carbon and nitrogen content while the abundance of the *mcrA* gene in the middle layer was not affected by any of the studied factors. The results of this study help in efforts to conserve the blue carbon ecosystem as well as control the release of methane gas.

Kata kunci *cbbLR*; *mcrA*; mangrove sediment; qPCR; taxonomy

1. Pengenalan

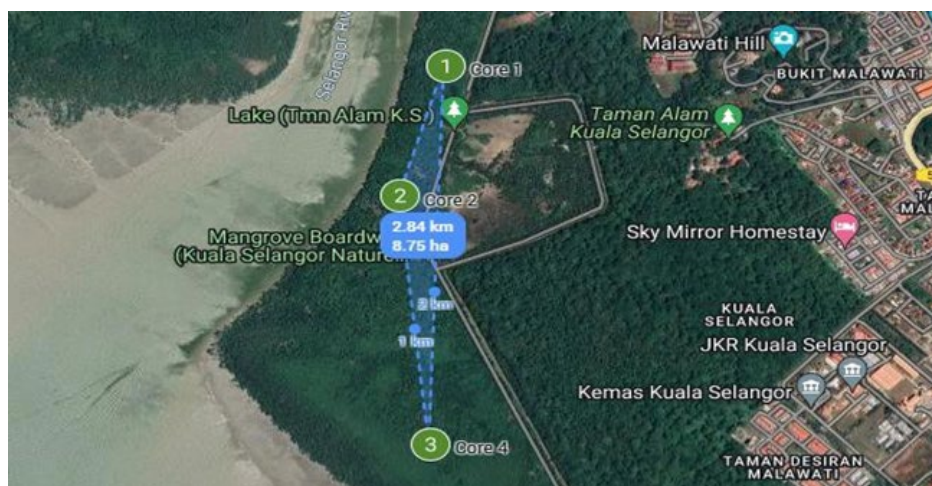
Ekosistem hutan paya bakau merupakan antara ekosistem persisiran pantai yang paling produktif menyerap simpan karbon biru (Kementerian Sumber Asli Dan Alam Sekitar 2014). Kecekapan ekosistem hutan paya bakau sebagai takungan penyimpanan karbon berkait rapat dengan kelimpahan mikrob yang terlibat dalam pelbagai kitaran biogeokimia terutamanya kitar karbon (Palit et al. 2022). Namun, kajian lain juga mendapati bahawa ekosistem hutan paya bakau turut membebaskan sejumlah gas metana dari enapan bakau ke atmosfera secara semula jadi melalui kitar metana oleh komuniti mikrob metanogenik dan metanotrofik (Hu et al. 2024).

Kini, hutan paya bakau semakin terganggu akibat aktiviti pembangunan dan perindustrian, menyebabkan fungsinya sebagai takungan karbon biru terjejas (Macreadie et al. 2019). Kajian lepas turut menjangkakan bahawa pembebasan gas metana daripada enapan paya bakau akan melangkaui kadar penyimpanan karbon biru sebanyak 20% (Rosentreter et al. 2018) sekiranya pemusnahan hutan paya bakau tidak dibendung dengan baik (Arai, Inubushi & Chiu 2021; Zhang et al. 2020). Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mengkuantiti kelimpahan mikrob yang terlibat dalam kitar karbon dan metana, khususnya melalui penyasaran terhadap gen *cbbLR* yang mengekod enzim RuBisCO yang berfungsi dalam pengikatan karbon dalam keadaan aerobik, serta gen *mcrA* yang mengekod enzim metil-koenzim M reduktase (MCR) yang penting dalam penghasilan gas metana di peringkat akhir penguraian bahan organik dalam keadaan anaerobik.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Perolehan sampel enapan bakau dan data fizikokimia tanah

Persampelan enapan bakau dijalankan di Taman Alam Kuala Selangor (TAKS) (3.340197, 101.237342), Selangor, Malaysia (Mohamad Khairi, komunikasi peribadi). TAKS dipilih sebagai kawasan kajian kerana ia merupakan satu-satunya takungan karbon yang masih berbaki di kawasan hutan paya bakau banjar Selatan (Anon 2022). Sampel enapan bakau diambil melalui teknik coring dengan menggunakan gerimit tanah besi sedalam 100 cm. Sebanyak 3 teras diambil daripada tiga titik persampelan yang berbeza (C1, C2 dan C4) seperti dalam Rajah 1. Setiap teras tanah dibahagi kepada tiga lapisan kedalaman yang berbeza, iaitu lapisan permukaan (0 hingga 10 cm), tengah (10 hingga 50 cm) dan dasar (50 hingga 100 cm).



Rajah 1. Lokasi persampelan tanah di Taman Alam Kuala Selangor (TAKS).

Sembilan parameter fizikokimia tanah yang merangkumi suhu, pH, kemasinan, kekonduksian, kedalaman tanah, jumlah pepejal terlarut (TDS), jumlah penyimpanan nitrogen (N), jumlah penyimpanan karbon organik (OC), dan kelembapan tanah pada setiap kedalaman tanah dianalisis.

2.2 Pengekstrakan gDNA daripada sampel enapan bakau

Pengekstrakan DNA genomik (gDNA) daripada sampel enapan bakau dilakukan dengan menggunakan kit pengekstrakan DNA tanah PrimeWay (Apical Scientific, Singapura) mengikut protokol yang disediakan.

2.3 Pengkuantitian gen *cbbLR* dan *mcrA* pada kedalaman tanah berbeza

Tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR) relatif yang menyasarkan gen *cbbLR* dan *mcrA* dijalankan. Jumlah isipadu bagi satu tindak balas adalah 20 μ L. Setiap tindak balas mengandungi 10 μ L THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix 2 x (Apical Scientific, Singapura), pencetus kehadapan dan pencetus kebelakang berkepekatan 10 μ M, templat gDNA dengan kepekatan antara 1-100 ng dan air steril bergred molekul. Dalam qPCR kuantitatif relatif, gen *gyrB* yang mengekod enzim DNA gyrase (Liu et al. 2021) dan *hsp60* yang mengekod protein kejutan haba 60 (Hu et al. 2018) digunakan sebagai gen rujukan. Pengiraan kaedah Livak digunakan bagi mengkuantiti kelimpahan gen pada kedalaman tanah berbeza.

2.3.1 Protokol qPCR bagi gen *cbbLR*

Pencetus kehadapan *cbbLR*IF (5'-AAGGAYGACGAGAACATC-3') dan pencetus kebelakang *cbbLR*IR (5'-TCGGTCGGSGTGTAGTTGAA-3') berdasarkan kajian Selesi, Schmid & Hartmann (2005). Protokol ditetapkan dengan kitaran pertama iaitu penyahaslian awal pada 95°C bagi 4 minit, diikuti kitaran kedua sebanyak 40 kitaran berulangan pada 95°C bagi 30 saat, 57°C bagi 30 saat dan 72°C bagi 1 minit. Pada kitaran ketiga, analisis takat lebur dijalankan dengan penetapan peningkatan suhu 1°C pada setiap saat, dari suhu 51°C hingga 95°C selama 15 saat.

2.3.2 Protokol qPCR bagi gen *mcrA*

Pencetus kehadapan ME3Mf (5'-ATGTCNGGTGGHGTMGSTTYAC-3') dan pencetus kebelakang ME2r' (5'-TCATBGCRTAGTTDGGRTAGT-3') digunakan (Nunoura et al. 2008). Protokol ditetapkan dengan kitaran pertama iaitu penyahaslian awal pada 95°C bagi 4 minit, diikuti kitaran kedua sebanyak 40 kitaran berulangan pada 95°C bagi 1 minit, 53°C bagi 1 minit dan 72°C bagi 1 minit. Pada kitaran ketiga, analisis takat lebur dijalankan dengan penetapan peningkatan suhu 1°C pada setiap saat, dari suhu 51°C hingga 95°C selama 15 saat.

2.4 Analisis taksonomi komuniti mikrob dengan gen *cbbLR* dan *mcrA*

Hanya 1 sampel gDNA pada lapisan permukaan bagi gen *cbbLR* dan lapisan dasar bagi gen *mcrA* yang mempunyai kuantiti dan kualiti paling baik dipilih bagi analisis ini. Amplifikasi jujukan gen sasaran dalam gDNA dijalankan melalui tindak balas berantai polimerase (PCR). Jumlah isipadu bagi satu tindak balas adalah 20 μ L. Setiap tindak balas mengandungi 10 μ L Thermo Scientific PCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat), 0.5 μ L pencetus kehadapan dan pencetus kebelakang berkepekatan 10 μ M, 1 μ L templat gDNA dan air steril bergred molekul. 2 μ L albumin serum lembu (BSA) berkepekatan 4 mg/ μ L ditambah ke dalam tindak balas PCR bagi gen *mcrA*. Protokol PCR bagi kesemua gen adalah sama seperti qPCR, kecuali tiada analisis takat lebur yang dijalankan bagi PCR.

Setelah amplikon PCR tulen diperoleh melalui pengekstrakan gel agarosa menggunakan kit pengekstrakan gel PrimeWay (Apical Scientific, Singapura), penjujukan metagenomik rawak yang memfokuskan DNA dengan berat molekul rendah dijalankan oleh Macrogen Asia Pacific Pte. Ltd., Singapura dengan menggunakan platform Illumina MiSEQ, dengan penjujukan *paired-end* sebanyak 300 bp dan jumlah data penjujukan yang terjana adalah sebanyak 3 Mb. Persediaan pustaka DNA dijalankan mengikut protokol kit TruSeq DNA Low Molecular Weight.

Setelah data penjujukan diperoleh, perisian Cutadapt (v3.2) digunakan untuk memotong urutan penyesuaian dan jujukan pencetus. Kemudiannya, DADA2 (v1.18.0) digunakan bagi penapisan kualiti, penghapusan bunyi latar belakang, penggabungan bacaan *paired-end* dan pembuangan Chimera untuk menjana urutan DNA beresolusi tinggi (Amplicon Sequence Variant, ASV) yang mewakili takson

mikrob unik. ASV disimpan dalam format FASTA. Kemudiannya, perisian R digunakan untuk penapisan panjang ASV. Pangkalan data yang digunakan untuk mendapatkan jujukan gen rujukan ialah NCBI_NT melalui algoritma BLAST (v2.12.0+). Dengan menggunakan Mafft (v7.475), penjajaran jujukan berbilang terhadap jujukan ASV dijalankan.

Walaupun gen *16S rRNA* lazimnya digunakan sebagai penanda universal dalam analisis kepelbagaian bakteria, kajian ini menggunakan gen fungsi seperti *mcrA* dan *cbbLR* untuk mengkaji kepelbagaian kumpulan mikrob tertentu yang menjalankan fungsi khusus dalam persekitaran. Gen *mcrA* telah digunakan secara meluas sebagai penanda molekul bagi kajian kepelbagaian arkea metanogen (Luton et al. 2002; Steinberg & Regan, 2008). Manakala gen *cbbLR*, digunakan dalam kajian kepelbagaian bakteria autotrof (Selesi et al. 2005). Oleh itu, penggunaan kedua-dua gen ini dalam kajian ini bertujuan untuk menilai kepelbagaian komuniti mikrob berdasarkan fungsi masing-masing.

2.5 Analisis statistik sampel enapan bakau mengikut kedalaman tanah berbeza

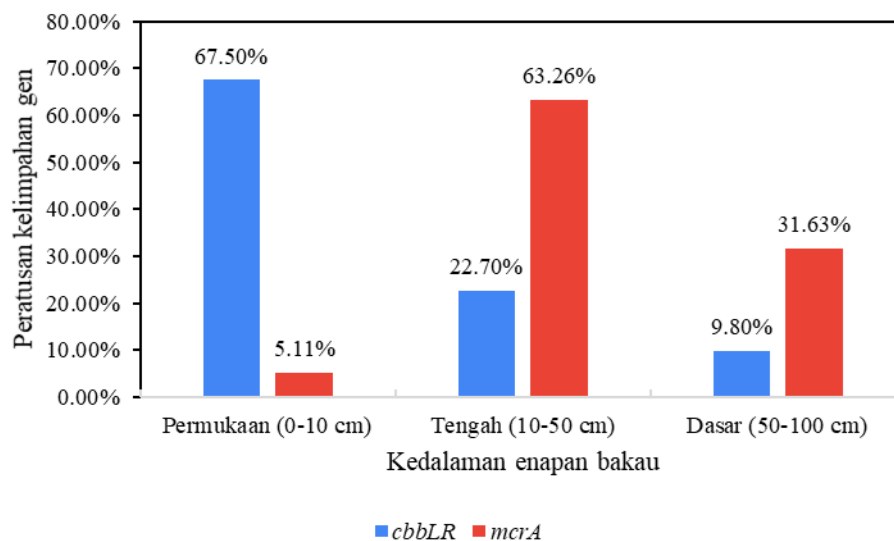
Bagi mengkaji korelasi antara sifat fizikokimia tanah dengan kelimpahan mikrob yang mempunyai gen *cbbLR* dan *mcrA* di dalam enapan bakau, data analisis fizikokimia tanah dan kelimpahan gen pada kedalaman tanah yang berbeza dikumpulkan. Kemudiannya, Analisis Korespondan Kanonikal (CCA) dilakukan dengan menggunakan perisian PAST. Bagi mengesahkan dapatan kajian yang diperoleh daripada analisis CCA, analisis korelasi Pearson dilakukan dengan menggunakan perisian MS Excel.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Analisis qPCR gen *cbbLR* dan *mcrA*

Berdasarkan Rajah 2, kedalaman tanah permukaan (0-10 cm) mencatatkan kelimpahan gen *cbbLR* yang tertinggi iaitu sebanyak 67.50%, diikuti dengan kedalaman pertengahan (10-50 cm) iaitu 22.70% manakala kedalaman dasar (50-100 cm) merekodkan kelimpahan yang terendah iaitu sebanyak 9.80%. Corak ini menunjukkan bahawa komuniti mikrob yang terlibat dalam pengikatan karbon lebih dominan pada lapisan permukaan, selaras dengan kajian oleh Xiao et al. (2014) yang melaporkan kelimpahan gen *cbbLR* lebih tinggi pada permukaan tanah berbanding lapisan yang lebih dalam. Hal ini kerana, komuniti mikrob yang terlibat dalam kitar karbon adalah lebih dominan pada permukaan tanah kerana ketersediaan bahan organik yang lebih tinggi yang mampu menyokong pertumbuhan bakteria autotrof yang menggunakan enzim RuBisCO dalam proses pengikatan karbon (Jiao et al. 2021). Selain itu, kajian oleh Shen et al. (2016) turut menunjukkan corak yang sama, di mana kelimpahan gen *cbbLR* menurun seiring dengan peningkatan kedalaman tanah.

Bagi gen *mcrA* pula, kajian mendapati bahawa sampel tanah pada kedalaman tengah mempunyai peratusan kelimpahan gen yang paling tinggi iaitu sebanyak 63.26%, diikuti dengan kedalaman dasar iaitu 31.63% dan akhirnya kedalaman permukaan dengan 5.11%. Dapatan kajian ini adalah disokong oleh kajian Lee et al. (2015) yang mendapati bahawa kelimpahan metanogen adalah paling tinggi pada tanah rizosfera yang berkedalaman 3-20 cm berbanding kedalaman tanah sawah padi yang melebihi 30 cm. Ini adalah kerana kepekatan metana didapati berkurang apabila kedalaman tanah melebihi 30 cm. Kajian ini turut mengesahkan bahawa kelimpahan mikrob yang membawa gen *mcrA* adalah paling rendah pada lapisan permukaan berkedalaman 0-10 cm. Hal ini boleh dikaitkan dengan pembebasan gas oksigen daripada akar pokok bakau di lapisan permukaan enapan bakau semasa respirasi yang menyebabkan potensi redoks pada lapisan permukaan menjadi tinggi. Ini menghadkan aktiviti metanogen yang memerlukan persekitaran anoksik untuk pertumbuhan (Sánchez-Carrillo et al. 2021; Zhou et al. 2015).



Rajah 2. Peratusan kelimpahan gen *cbbLR* dan *mcrA* pada kedalaman enapan bakau yang berbeza.

3.2 Analisis taksonomi gen *cbbLR* dan *mcrA*

Analisis kepelbagaian mikrob ke atas sampel *mcrA* dan *cbbLR* menunjukkan kedua-duanya memiliki komuniti mikrob yang kompleks, kaya dan pelbagai seperti yang ditunjukkan di dalam Jadual 1.

Jadual 1. Indeks kepelbagaian mikrob dan bilangan variasi jujukan amplicon bagi gen *cbbLR* dan *mcrA*.

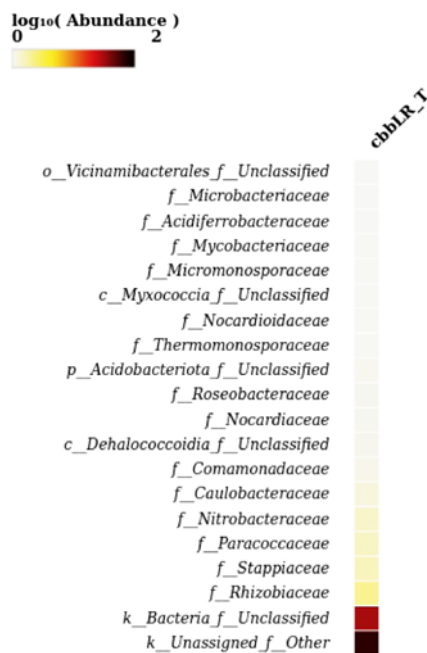
Sampel	Indeks Shannon	Indeks Gini-Simpson	Kepelbagaian Filogenetik	Variasi Jujukan Amplicon (ASV)
<i>cbbLR</i>	7.48	0.983	278.79	872
<i>mcrA</i>	5.48	0.942	187.79	470

Mikrob yang memiliki gen *mcrA* mencatatkan nilai Indeks Shannon sebanyak 5.48, manakala mikrob dengan gen *cbbLR* mencatatkan nilai yang lebih tinggi iaitu 7.48, menunjukkan bahawa kedua-dua komuniti ini mempunyai kepelbagaian spesies yang tinggi, namun mikrob dengan gen *cbbLR* lebih dominan daripada segi kepelbagaian. Indeks Gini-Simpson turut menunjukkan pola yang sama, dengan nilai 0.942 bagi mikrob dengan gen *mcrA* dan 0.983 bagi mikrob dengan gen *cbbLR*, membuktikan bahawa kedua-dua komuniti mempunyai peluang yang tinggi bagi dua individu rawak berasal daripada spesies yang berbeza. Selain itu, daripada segi kepelbagaian filogenetik, mikrob dengan gen *mcrA* mencatatkan nilai sebanyak 187.79, manakala mikrob dengan gen *cbbLR* mencatatkan nilai yang lebih tinggi iaitu 278.79, menandakan bahawa komuniti mikrob dengan gen *cbbLR* mengandungi lebih banyak keturunan evolusi berbanding komuniti mikrob dengan gen *mcrA*. Di samping itu, bilangan Variasi Jujukan Amplicon (ASV) bagi gen *mcrA* adalah sebanyak 470, manakala bagi gen *cbbLR* sebanyak 872, menunjukkan kekayaan spesies yang lebih tinggi dalam komuniti mikrob yang memiliki gen *cbbLR*.

Seterusnya, hasil analisis taksonomi menunjukkan kepelbagaian famili mikrob yang memiliki gen *cbbLR* dan terlibat dalam laluan metabolik pengikatan karbon dioksida seperti dalam Rajah 3. Perbezaan kelimpahan mikrob ini mungkin dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan karbon organik dan pH tanah (Xiao et al. 2014). Majoriti mikrob yang mempunyai gen *cbbLR* adalah daripada famili yang tidak terklasifikasi yang menunjukkan bahawa wujud kumpulan mikrob yang kurang dikaji tetapi penting di dalam ekosistem paya bakau.

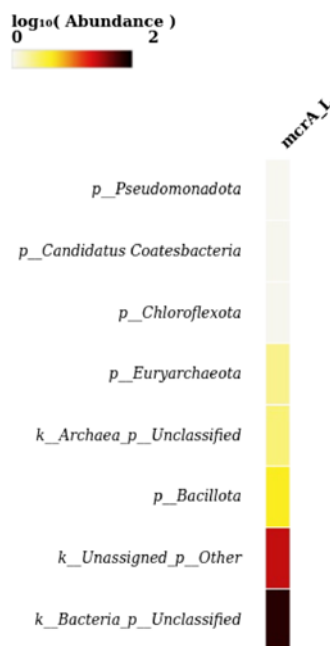
Selain itu, terdapat beberapa famili mikrob yang hadir dalam jumlah yang sederhana iaitu *Rhizobiaceae*, *Stappiaceae*, *Paracoccaceae*, *Nitrobacteraceae* dan *Caulobacteraceae*. Mikroorganisma daripada famili *Rhizobiaceae* berfungsi dalam pengikatan nitrogen melalui hubungan simbiotik dengan tumbuhan legum serta menjalankan pengikatan karbon melalui kehadiran enzim RuBisCO yang dikodkan oleh gen *cbbLR* (Alves et al. 2014). Seterusnya, terdapat strain daripada

famili *Stappiaceae* yang mengandung gen *cbbLR* dan berupaya untuk melakukan pengikatan karbon (King & Weber 2007). Selain itu, menurut kajian yang telah dijalankan oleh Hameed et al. (2023) penjujukan DNA beberapa ahli daripada famili *Paracoccaceae* dijalankan untuk mendapatkan gambaran yang lebih mendalam tentang peranannya dalam kitar karbon dan mendapati terdapat kehadiran gen yang mengekod enzim RubisCO yang berfungsi dalam pengikatan karbon atmosfera hadir dalam mikroorganisma tersebut. Seterusnya, mikroorganisma di dalam famili *Nitrobacteraceae* berupaya mengikat karbon melalui kitar Calvin sebagai sumber utama karbon sel untuk memperoleh tenaga (Watson et al. 1981). Selain itu, famili *Caulobacteraceae* yang dapat diperhatikan pada peta haba hadir dalam pelbagai habitat terutamanya dalam habitat akuatik tetapi ada juga yang hadir di dalam persekitaran tanah dan berupaya untuk hidup di dalam persekitaran karbon yang tinggi (Abraham, Rohde & Bennasar 2014).



Rajah 3. Peta haba kelimpahan famili mikrob dengan gen *cbbLR*.

Berdasarkan analisis taksonomi komuniti mikrob dengan gen *mcrA* dalam Rajah 4 pula, kajian mendapati bahawa terdapat sebanyak 68.61% daripada komuniti mikrob dengan gen *mcrA* adalah bakteria tidak terkultur, manakala selainnya termasuklah bakteria daripada filum Bacillota (*Limosilactobacillus fermentum*), *Candidatus Coatesbacteria*, Chloroflexota (*Dehalococcoidales bacterium*), Pseudomonadota (*Salmonella enterica* dari famili Enterobacteriaceae dan *Pseudomonas aeruginosa* dari famili Pseudomonadaceae). Hanya minoriti iaitu sebanyak 2.71% adalah mikrob daripada kingdom arkaea.



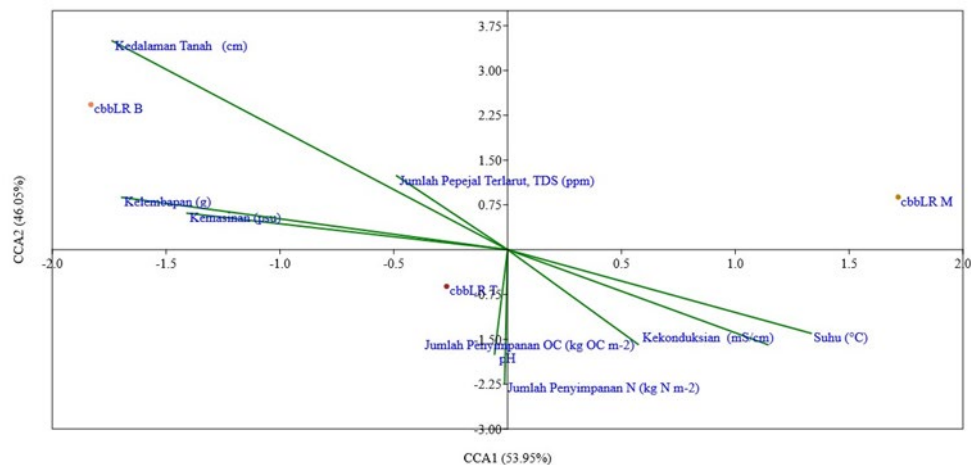
Rajah 4. Peta haba kelimpahan filum mikrob dengan gen *mcrA*.

Terdapat sebanyak 1.50% daripadanya adalah arkaea tidak terkultur, manakala selainnya adalah berasal daripada filum utama arkaea, iaitu filum Euryarchaeota. Sebanyak 0.07% adalah Euryarchaeota tidak terkultur, 1% adalah metanogenik tidak terkultur, dan selainnya merupakan arkaea metanogenik dari order Methanobacteriales (*Methanobacterium paludis* dan *Methanobacterium petrolearium*) serta order Methanomicrobia (*Methanobolus* sp., *Methanosaeta pelagica* dan *Methanosaeta* tidak terkultur). Dapatan kajian ini berpadanan dengan kajian lepas yang menyimpulkan bahawa Methanomicrobiales merupakan antara taksa order metanogen yang dominan dalam sedimen paya bakau (Zhang et al. 2020; Zhou et al. 2014). Daripada taksonomi spesies, kajian mendapati bahawa kebanyakan metanogen yang hadir di TAKS adalah metanogen hidrogenotrofik dan asetiklastik. *Methanobacterium paludis* dan *Methanobacterium petrolearium* merupakan metanogen hidrogenotrofik manakala *Methanosaeta pelagica* dan *Methanosaeta* tak terkultur pula merupakan metanogen asetiklastik.

Setakat pengetahuan kini, gen *mcrA* merupakan penanda gen yang spesifik bagi pengesanan kumpulan mikrob arkaea metanogenik dan metanotrofik anaerobik (ANME). Kajian lepas di mendapan air mata panas telah menemukan filum arkaea baru yang turut mengekspreskan gen *mcrA* selain filum Euryarchaeota iaitu filum Verstraetearchaeota dan Bathyarchaeota, menunjukkan evolusi arkaea dalam metanogenesis (McKay et al. 2017). Terdapat juga kajian yang menemui bakteria metanotrof seperti *Methylobacterium methanica* dan *Methylococcus capsulatus* yang boleh mengoksidakan metana kepada metanol dengan menggunakan enzim lain iaitu metana monoksigenase (Ahmadi & Lackner 2024). Namun, tiada kajian yang melaporkan penemuan bakteria seperti order Lactobacillales, Dehalococcoidales, Enterobacteriales, Pseudomonadales dan filum Candidatus Coatesbacteria yang mengekspreskan gen *mcrA*. Kebanyakan bakteria daripada spesies *Pseudomonas* didapati berperanan dalam kitar nitrogen sebagai agen denitrifikasi dan penurunan sulfur (Qian et al. 2023). Oleh itu, kajian ini menyediakan data asas bagi kajian selanjutnya, sama ada wujudnya pemindahan gen *mcrA* secara mendatar antara arkaea dan bakteria di dalam enapan, ataupun terdapat interaksi baru dalam kalangan komuniti mikrob dalam enapan bakau. Kajian ini juga tidak meniadakan kemungkinan berlakunya kontaminasi silang antara mikrob yang membawa gen *mcrA* dengan mikrob lain yang wujud di persekitaran sewaktu persampelan enapan bakau dilakukan. Justeru itu, kajian lanjut wajar dilakukan bagi mengenalpasti mikrob yang berkebolehan menghasilkan metana dalam enapan bakau.

3.3 Analisis korelasi

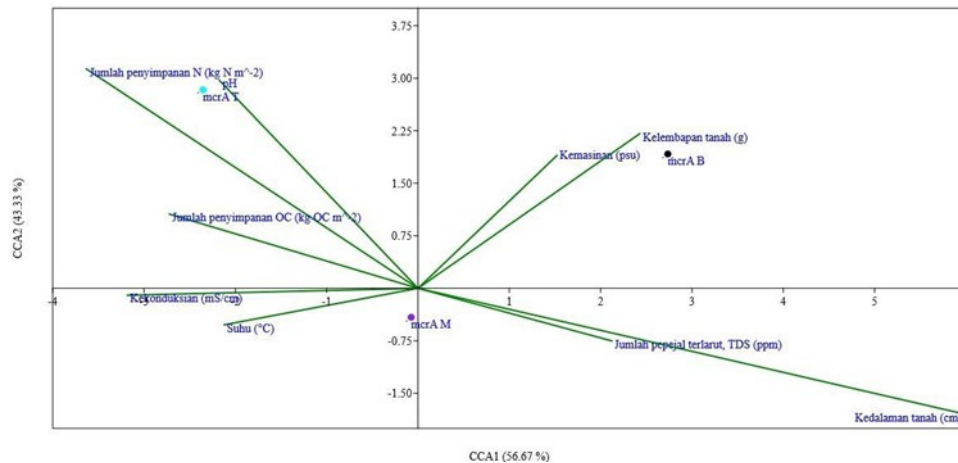
Analisis CCA telah dijalankan untuk menentukan hubungan antara pengekspresan gen *cbbLR* dan *mcrA* dalam komuniti mikrob dengan parameter fizikokimia tanah paya bakau. Berdasarkan Analisis Korespondan Kanonikal (CCA) yang ditunjukkan dalam Rajah 5, hubungan antara kelimpahan gen *cbbLR* dengan sifat fizikokimia tanah dapat diperhatikan. Sampel *cbbLR* T (permukaan tanah) menunjukkan korelasi positif dengan pH (nilai pekali korelasi = 0.57), mencadangkan bahawa faktor pH memainkan peranan penting dalam kelimpahan gen *cbbLR* di permukaan tanah. Sampel *cbbLR* M (tanah pertengahan) menunjukkan kedudukan yang lebih hampir dengan suhu (T), menunjukkan potensi pengaruh suhu terhadap kelimpahan gen ini di lapisan pertengahan. Sebaliknya, *cbbLR* B (dasar tanah) terletak jauh daripada faktor-faktor utama dan lebih berkaitan dengan kedalaman (D) (nilai pekali korelasi = 0.88), menunjukkan bahawa kelimpahan gen *cbbLR* semakin berkurang dengan peningkatan kedalaman tanah, sejajar dengan pengurangan bahan organik dan oksigen. Faktor-faktor seperti kekonduksian (C) dan jumlah pepejal terlarut (TDS) juga menunjukkan sumbangan terhadap variasi antara lapisan tanah tetapi dengan kesan yang berbeza terhadap setiap kedalaman. Keputusan ini mencerminkan bahawa persekitaran tanah yang kaya dengan bahan organik dan nutrien di permukaan lebih kondusif kepada mikroorganisma yang memiliki gen *cbbLR*, manakala keadaan tanah yang lebih dalam mungkin kurang sesuai untuk aktiviti mikrob yang terlibat dalam kitaran karbon autotrofik.



Rajah 5. Plot CCA di antara sifat fizikokimia tanah dan nisbah kelimpahan relatif gen *cbbLR* pada kedalaman tanah yang berbeza.

Bagi analisis CCA untuk gen *mcrA* dalam Rajah 6 pula, kajian mendapati bahawa nisbah kelimpahan gen *mcrA* pada lapisan permukaan adalah dipengaruhi oleh faktor pH (nilai pekali korelasi = 0.64), jumlah nitrogen (nilai pekali korelasi = 0.63) dan jumlah karbon organik (nilai pekali korelasi = 0.58). Ia juga berkorelasi secara negatif dengan faktor jumlah pepejal terlarut (nilai pekali korelasi = -0.57) dan kedalaman tanah (nilai pekali korelasi = -0.53). Kajian menjangkakan bahawa kebanyakan mikrob dengan gen *mcrA* pada lapisan permukaan adalah kumpulan arkaea anaerobik metanotrofik (ANME) yang menggunakan gas metana daripada udara sebagai substrat untuk menjalankan pengoksidaan metana. Bagi kelimpahan gen *mcrA* pada lapisan tengah, didapati ianya tidak banyak terpengaruh oleh mana-mana faktor. Manakala kelimpahan gen *mcrA* pada lapisan dasar pula lebih banyak dipengaruhi secara positif oleh faktor kedalaman tanah (nilai pekali korelasi = 0.69), kelembapan tanah (nilai pekali korelasi = 0.67), jumlah pepejal terlarut (nilai pekali korelasi = 0.64) dan kemasinan (nilai pekali korelasi = 0.62). Ia juga sangat berkorelasi dengan negatif dengan faktor suhu (nilai pekali korelasi = -0.80), kekonduksian (nilai pekali korelasi = -0.77) dan jumlah karbon organik (nilai pekali korelasi = -0.62). Menerusi analisis taksonomi, kajian telah mengenalpasti bahawa antara mikrob yang mempunyai gen *mcrA* di lapisan dasar adalah arkaea metanogen dan bakteria spesifik. Kajian ini membuktikan bahawa metanogen lebih selesa hidup di persekitaran yang sejuk, tinggi kelembapan dan kemasinan serta hanya rendah kekonduksian tanah dan kepekatan karbon organik. Dapatan kajian ini disokong oleh kajian lepas yang menyatakan bahawa suhu yang rendah dan kekonduksian tanah yang tinggi adalah sesuai untuk arkaea metanotrof tetapi tidak sesuai bagi metanogen (Wang et al.

2023). Keperluan metanogen terhadap kepekatan karbon organik yang rendah adalah disebabkan penggunaan substrat seperti karbon dioksida, hidrogen dan asetat untuk menghasilkan metana. Substrat yang diperlukan oleh metanogen ini didapati lebih banyak terdapat di kawasan yang rendah kepekatan karbon organik (Buan 2018).



Rajah 6. Plot CCA di antara sifat fisikokimia tanah dan nisbah kelimpahan relatif gen *mcrA* pada kedalaman tanah yang berbeza.

4. Kesimpulan

Kajian ini menunjukkan bahawa kelimpahan gen *cbbLR* adalah lebih tinggi di lapisan permukaan tanah dan semakin berkurang dengan peningkatan kedalaman. Analisis korelasi di antara kelimpahan gen *cbbLR* dan fisikokimia tanah pula menunjukkan bahawa kelimpahan gen *cbbLR* di permukaan tanah berkorelasi positif dengan pH, kandungan karbon organik dan nitrogen manakala suhu berpotensi mempengaruhi kelimpahan di lapisan pertengahan. Sebaliknya, kedalaman merupakan faktor utama yang berkaitan dengan pengurangan kelimpahan gen *cbbLR* di dasar tanah sejajar dengan pengurangan oksigen dan bahan organik. Selain itu, analisis taksonomi menunjukkan bahawa mikroorganisma yang memiliki gen *cbbLR* terdiri daripada filum bakteria yang tidak dikultur serta kumpulan utama seperti *Rhizobiaceae*, *Stappiaceae*, *Paracoccaceae*, *Nitrobacteraceae*, dan *Caulobacteraceae*, yang memainkan peranan penting dalam kitaran karbon di ekosistem paya bakau. Kajian ini juga mendapati bahawa kelimpahan gen *mcrA* adalah tertinggi di lapisan tengah berkedalaman 10-50 cm berbanding permukaan dan dasar, dan majoriti komuniti mikrob yang membawa gen *mcrA* adalah daripada kingdom bakteria, terutamanya bakteria yang tidak terkultur dan hanya minoriti daripada komuniti mikrob adalah metanogen seperti yang dijangkakan. Analisis korelasi pula mendapati bahawa ANME mungkin hidup pada lapisan permukaan enapan bakau yang tinggi kepekatan nitrogen dan karbon organik, manakala arkea metanogen pula berpotensi hidup pada lapisan dasar enapan bakau yang lembap dan rendah karbon organik. Kajian ini menyediakan data asas bagi mengenalpasti mikrob yang berperanan dalam pengitaran karbon dan metana di enapan bakau, serta memberi gambaran asas tentang kadar penyimpanan dan pembebasan karbon dan gas metana di lokasi kajian. Ini penting bagi memastikan keseimbangan mikrob di enapan bakau di samping memastikan fungsi hutan paya bakau sebagai takungan penyimpanan karbon biru masih terpelihara.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh geran *Fundamental Research Grant Scheme* (FRGS) dari Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia (FRGS/1/2021/WAB02/UKM/02/4). Lee Yee Lynn menerima tajaan oleh Program Ijazah Dalam Negara (PIDN) dari Jabatan Perkhidmatan Awam dan Nur Ain Natasha adalah ditaja oleh Program Penajaan Pengajian Tertiar (TESP) dari Majlis Amanah Rakyat.

Rujukan

- Abraham, W.R., Rohde, M. & Bennasar, A. 2014. The Family Caulobacteraceae. *The Prokaryotes* 12(9): 179-205.
- Ahmadi, F. & Lackner, M. 2024. Recent findings in methanotrophs: genetics, molecular ecology, and biopotential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 108(60): 1–21.
- Alves, L., Sauza, J., Varani, A. & Lemos, E. 2014. The family Rhizobiaceae. *The Prokaryotes* 5: 419-437. Anon. 2022. Apa nasib Taman Alam Kuala Selangor? Harakah daily, 16 Jun: 1.
- Arai, H., Inubushi, K. & Chiu, C.Y. 2021. Dynamics of methane in mangrove forest: Will it worsen with decreasing mangrove forests? *Forests* 12(9): 1–11.
- Buan, N.R. 2018. Methanogens: Pushing the boundaries of biology. *Emerging Topics in Life Sciences* 2(4): 629–646.
- Hameed, A., Suchithra, K.V. & Lin, S.Y. 2023. Genomic potential for inorganic carbon sequestration and xenobiotic degradation in marine bacterium *Youngimonas vesicularis* CC-AMW-ET affiliated to family Paracoccaceae. *Antonie van Leeuwenhoek* 116: 1247–1259.
- Hu, R., He, Z. & Wang, C. 2024. Rethinking microbially driven methane formation in mangrove wetlands. *Trends in Microbiology* 32(9): 832–835.
- Hu, Y., Sun, F. & Liu, W. 2018. The heat shock protein 70 gene as a new alternative molecular marker for the taxonomic identification of *Streptomyces* strains. *AMB Express* 8(144): 1–8.
- Kementerian Sumber Asli Dan Alam Sekitar. 2014. Kajian penilaian outcome program penanaman pokok bakau dan spesies-spesies yang sesuai di persisiran. Malaysia: Jabatan Perhutanan.
- King, G. & Weber, C. 2007. Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 5: 107-18.
- Lee, H.J., Jeong, S.E., Kim, P.J., Madsen, E.L. & Jeon, C.O. 2015. High resolution depth distribution of Bacteria, Archaea, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy. *Frontiers in Microbiology* 6(639): 1–13.
- Liu, Y., Pei, T., Yi, S., Du, J., Zhang, X., Deng, X., Yao, Q., Deng, M.R. & Zhu, H. 2021. Phylogenomic analysis substantiates the *gyrB* gene as a powerful molecular marker to efficiently differentiate the most closely related genera *Myxococcus*, *Corallococcus*, and *Pyxidicoccus*. *Frontiers in Microbiology* 12(11): 1–13.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J. & Riley, P.W. 2022. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.
- Macreadie, P.I., Anton, A., Raven, J.A., Beaumont, N., Connolly, R.M., Friess, D.A., Kelleway, J.J., Kennedy, H., Kuwae, T., Lavery, P.S., Lovelock, C.E. & Smale, D.A. 2019. The future of Blue Carbon science. *Nature Communications* 10(3998): 1–13.
- McKay, L.J., Hatzenpichler, R., Inskeep, W.P. & Fields, M.W. 2017. Occurrence and expression of novel methyl-coenzyme M reductase gene (*mcrA*) variants in hot spring sediments. *Scientific Reports* 7(7252): 1–12.
- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, J., Miyashita, A., Imachi, H. & Takai, K. 2008. Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 64(1996): 240–247.
- Palit, K., Rath, S., Chatterjee, S. & Das, S. 2022. Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. *Environmental Science and Pollution Research* 29(1): 32467–32512.
- Qian, L., Yu, X., Gu, H., Liu, F., Fan, Y., Wang, C., He, Q., Tian, Y., Peng, Y., Shu, L., Wang, S., Huang, Z., Yan, Q., He, J., Liu, G., Tu, Q. & He, Z. 2023. Vertically stratified methane, nitrogen and sulphur cycling and coupling mechanisms in mangrove sediment microbiomes. *Microbiome* 11(71): 1–19.
- Rosentreter, J.A., Maher, D.T., Erler, D. V., Murray, R.H. & Eyre, B.D. 2018. Methane emissions partially offset “blue carbon” burial in mangroves. *Science Advances* 4(6): 1–11.
- Sánchez-Carrillo, S., Garatuza-Payan, J., Sánchez-Andrés, R., Cervantes, F.J., Bartolomé, M.C., Merino- Ibarra, M. & Thalasso, F. 2021. Methane production and oxidation in mangrove soils assessed by stable isotope mass balances. *Water* 13(13): 1867.
- Selesi, D., Schmid, M. & Hartmann, A. 2005. Diversity of green-like and red-like ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes (*cbbL*) in differently managed agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 175-184.
- Steinberg, L.M. & Regan, J.M. 2008. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 74(21): 6663-6671.
- Wang, S., Sun, P., Liu, J., Xu, Y., Dolfing, J. & Wu, Y. 2023. Distribution of methanogenic and methanotrophic consortia at soil-water interfaces in rice paddies across climate zones. *iScience* 26(1): 105851.
- Watson, S.W., Valois, F.W. & Waterbury, J.B. 1981. The Family Nitrobacteraceae. *The Prokaryotes* 5(2): 1005-1022.

- Xiao, X.Y., Wang, M.W., Zhu, H.W., Guo, Z.H., Han, X.Q. & Zhen, P. 2017. Response of soil microbial activities and microbial communities' structure to vanadium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 200-206.
- Yao, Y., Shen, X.L., Wang, L.L., Zhao, J.N., Gong, L.X., Wang, S., Wu, L.Y., Gang, L., Xiu, W.M. & Zhang, G.L. 2023. Effects of tillage management on cbbL-carrying bacteria and soil organic carbon dynamics across aggregate size classes in the farmland of North China Plain. *Ecological Indicators* 150: 110213.
- Zhang, C.J., Pan, J., Liu, Y., Duan, C.H. & Li, M. 2020. Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments. *Microbiome* 8(94): 1– 12.
- Zhou, Z., Chen, J., Cao, H., Han, P. & Gu, J.D. 2015. Analysis of methane-producing and metabolizing archaeal and bacterial communities in sediments of the northern South China Sea and coastal Mai Po Nature Reserve revealed by PCR amplification of mcrA and pmoA genes. *Frontiers in Microbiology* 5(789): 1– 15.
- Zhou, Z., Han, P. & Gu, J.D. 2014. New PCR primers based on mcrA gene for retrieving more anaerobic methanotrophic archaea from coastal reedbed sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(10): 4663–4670.

Kajian Sistematis dan Penentuan Kumpulan Haplo Berdasarkan Mutasi Hotspot di Gen *MT-ND1* Pada DNA Mitokondria Manusia

(Systematic Review and Haplogroup Determination Based on Hotspot Mutation in *MT-ND1* Gene of Human Mitochondrial DNA)

Vaishnave A/P Loga Raju¹, Siti Zahidah Binti Zahari¹, Shahrul Hisham Zainal Ariffin^{1*}, Rus Dina Rus Din², Intan Zarina Zainol Abidin³ & Rohaya Megat Abdul Wahab⁴

¹Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Jabatan Sains Forensik, Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

³Jabatan Sains Farmaseutikal, Fakulti Farmasi, Universiti Cyberjaya, Cyberjaya, Selangor, Malaysia

⁴Jabatan Ortodontik, Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

* e-mail of corresponding author: hisham@ukm.edu.my

Abstrak: DNA Mitokondria (mtDNA) merupakan komponen unik dalam genom manusia yang sesuai untuk mengkaji evolusi manusia disebabkan ciri-cirinya yang tersendiri, termasuk sifat pewarisan melaluketurunan ibu, kadar mutasi yang tinggi, kekurangan proses rekombinasi, dan bilangan salinan yang banyak. Namun demikian, kebanyakan kajian sebelum ini memfokuskan pada kawasan bukan pengekodan, iaitu *D-loop*. Oleh itu, tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk menentukan kumpulan haplo berdasarkan mutasi "hotspot" pada kawasan pengekodan iaitu gen *MT-ND1*. Dalam kajian ini, pencarian artikel telah dijalankan berdasarkan garis panduan PRISMA menggunakan lima pangkalan data elektronik iaitu *Medline*, *Nature*, *PubMed*, *Science Direct* dan *Scopus*. Selain itu, kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR) telah dijalankan dan hasil penjujukan yang diperolehi dianalisis menggunakan perisian BLASTn dan MITOMAP-Mitomaster. Hasil analisis kajian sistematik mendapati bahawa terdapat 43 varian SNP, termasuk C3497T dan G3531A pada gen *MT-ND1*, yang dikelaskan di bawah kumpulan haplo sub B4f dan M39b1a. Walau bagaimanapun, hasil analisis kajian amplifikasi PCR ke atas sampel S1 menunjukkan tiada SNP hadir, termasuk C3497T dan G3531A pada gen *MT-ND1*. Justeru, ia tidak dapat dikelaskan di bawah kumpulan haplo sub B4f dan M39b1a. Kesimpulannya, gen *MT-ND1* adalah kurang sesuai untuk digunakan dalam kajian yang berkaitan dengan penentuan kumpulan haplo.

Kata kunci: Gen manusia; hotspot; mitokondria; kumpulan haplo; keturunan

Abstract: Mitochondrial DNA (mtDNA) is a unique component of the human genome, suitable for studying human evolution due to its distinct characteristics, including maternally inherited nature, high mutation rate, lack of recombination, and high copy number. However, most of the previous studies have focused on non-coding regions, the *D-loop*. Therefore, this study aims to determine haplogroups by analyzing hotspot mutations within the coding region, specifically the *MT-ND1* gene. In this study, a systematic article search was conducted based on PRISMA guidelines using five electronic databases: *Medline*, *Nature*, *PubMed*, *Science Direct* and *Scopus*. Furthermore, experimental analysis, such as the polymerase chain reaction (PCR) method was conducted, and the sequencing results obtained were analyzed using BLASTn and MITOMAP-Mitomaster software. The results from the systematic study analysis revealed that there were 43 SNP variants, including C3497T and G3531A on the *MT-ND1* gene, which were classified under subhaplogroups B4f and M39b1a. In contrast, the experimental PCR analysis of the S1 sample revealed an absence of these specific SNPs (C3497T and G3531A). Therefore, they cannot be classified under subhaplogroups B4f and M39b1a. In conclusion, these findings suggest that the *MT-ND1* gene may be less suitable for haplogroup determination studies compared to other regions of the mtDNA genome.

Keywords: Human gene; hotspot; mitochondria; haplogroup; ancestry

1. Pendahuluan

Asid deoksiribonukleik (DNA) merupakan molekul asas dalam semua organisma yang mengandungi maklumat genetik bagi tujuan pengekodan protein untuk pelbagai fungsi biologi. Sehubungan itu, DNA bukan sekadar molekul yang menyimpan maklumat genetik malah ia adalah penting dalam mekanisme evolusi. Sebagai contoh proses seperti mutasi, hanyutan genetik dan pemilihan semula jadi akan menyebabkan kemunculan ciri dan penyesuaian baharu yang mendorong kepada perubahan evolusi. Secara umumnya, DNA terdiri daripada DNA nuklear (nDNA), DNA mitokondria (mtDNA) dan DNA kloroplas (cpDNA). Namun demikian, hanya nDNA dan mtDNA yang boleh didapati dalam sel-sel manusia. Dalam kajian ini, mtDNA lebih difokuskan berbanding dengan nDNA memandangkan mtDNA adalah lebih unik dan mudah untuk dikaji. Sebagai contoh, mtDNA mempunyai ciri-ciri yang unik seperti kadar polimorfisme yang tinggi, tiada intron dan boleh didapati dalam salinan yang banyak.

Dalam skop mtDNA, saiz mtDNA adalah berbeza antara spesies (15 000 - 17 000 pb), tetapi agak konsisten pada manusia (~ 16 569 pb). Selain itu, mtDNA mengandungi 37 gen serta mempunyai dua bebenang yang dikenali sebagai bebenang H (*heavy strand*) yang mengekodkan sebanyak 28 gen dan bebenang L (*light strand*) yang mengekodkan sebanyak sembilan gen (Chinnery et al. 2013). Gen-gen pada bebenang H dan L ini berfungsi bagi mengekodkan 22 *transfer RNA* (tRNA), 2 *ribosomal RNA* (rRNA), 13 gen pengekodan dan kawasan *displacement loop* (D-loop) (Wang et al. 2022; Yamamoto et al. 2020). D-loop adalah kawasan bukan pengekodan yang terdiri daripada kawasan hipervariasi satu (HVR1), hipervariasi dua (HVR2) dan hipervariasi tiga (HVR3) yang mempunyai kadar polimorfisme yang tinggi berbanding dengan kawasan pengekodan. Oleh itu, banyak kajian seperti Al-Rashedi et al. (2015) dan Yudianto et al. (2022) telah menggunakan D-loop untuk menentukan kumpulan haplo suatu populasi. Namun begitu, kawasan gen pengekodan juga perlu dianalisis bagi mendapatkan maklumat dan hasil yang munasabah.

Dalam kajian ini, kajian sistematik telah dijalankan bagi menentukan gen pengekodan yang sering digunakan sebagai penanda dalam artikel-artikel yang berfokuskan penentuan kumpulan haplo. Berdasarkan gen-gen pengekodan yang dilaporkan daripada artikel-artikel tersebut, gen *MT-ND1* telah dipilih secara rawak bagi tujuan penentuan kumpulan haplo melalui pengesanan kewujudan polimorfisme nukleotida tunggal (SNP). Bagi menjalankan kajian ini, lima individu yang berlainan bangsa telah dijadikan sebagai subjek kajian bagi menguji potensi gen *MT-ND1* dalam penentuan kumpulan haplo. Sampel darah daripada lima individu ini telah menjalani proses tindak balas rantaian polimerase (PCR) untuk tujuan pengoptimuman pencetus *MT-ND1* bagi mengamplifikasikan jujukan *MT-ND1*. Kemudian analisis penjujukan ke atas produk PCR dilakukan dengan membandingkan jujukan yang diperolehi dengan jujukan yang terdapat pada pangkalan data *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Perisian seperti MITOMAP-Mitomaster juga digunakan bagi menentukan kumpulan haplo varian SNP yang berlaku di gen *MT-ND1* pada genom mitokondria.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Kajian sistematik

2.1.1 Strategi carian

Kajian sistematik telah dijalankan dengan menggunakan kata kunci seperti *human gene*, *hotspot*, *mitochondria*, *haplogroup* dan *ancestry* dalam pencarian enjin pangkalan data elektronik iaitu *Medline*, *Nature*, *PubMed*, *Science Direct* dan *Scopus*.

2.1.2 Proses penyaringan data

Proses penyaringan data dijalankan berdasarkan garis panduan PRISMA. Tajuk dan abstrak artikel disaring bagi menyingkirkan kajian-kajian yang tidak mempunyai parameter seperti kajian manusia, DNA mitokondria, mutasi *hotspot* serta kumpulan haplo. Dalam kajian sistematik ini, hanya kajian DNA mitokondria yang berkaitan dengan penentuan kumpulan haplo berdasarkan mutasi *hotspot* akan disertakan. Sebaliknya, kajian yang menggunakan DNA nukleus tidak akan dipertimbangkan.

2.2 Kajian amplifikasi PCR

2.2.1 Pemencilan DNA daripada sampel darah

Bagi mengendalikan kajian ini, DNA mitokondria diperoleh daripada sampel darah tiga orang pelajar perempuan dan dua orang pelajar lelaki yang berumur dalam lingkungan 22 hingga 23 tahun. Proses pengambilan darah telah disemak dan diluluskan oleh Pengarah Pusat Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Bangi (UKM PPI/111/8/JEP-2019-214). Sebanyak 3 mL sampel darah telah diambil oleh pegawai perubatan yang terlatih di Pusat Kesihatan UKM dan disimpan di dalam tiub *vacutainer* yang mengandungi EDTA. Bagi melakukan pemencilan DNA, kit komersial iaitu *PrimeWay Genomic II DNA Extraction Kit* (1st Base, Singapura) telah digunakan.

2.2.2 Tindak balas rantaian polimerase (PCR)

Kaedah PCR digunakan bagi mengamplifikasikan genom DNA mitokondria yang telah diekstrak daripada sampel darah manusia. Bagi menentukan kesahihan gen *MT-ND1* dalam penentuan kumpulan haplo, sepasang pencetus berdasarkan kawasan gen *MT-ND1* telah digunakan dalam kaedah ini. Jujukan kehadapan bagi pencetus ini ialah 5' CTACGGGCTACTACAACCCTTCG 3' manakala jujukan berbalik ialah 5' GCCGATCAGGGCGTAGTT 3'. Fragmen jujukan bagi pencetus *MT-ND1* ini bersaiz 268 pasangan bes (pb).

Produk PCR yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan kaedah elektroforesis gel agarosa 1.7% (w/v) pada 75 V selama 60 min bersama-sama penanda DNA H3 RTU 100 pb (GeneDirex, Taiwan). Kehadiran jalur DNA yang telah diamplifikasi dikenal pasti dengan menganalisis hasil elektroforesis menggunakan mesin pengimejan *AlphaImager* dan melalui sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Selepas itu, produk PCR yang diperoleh akan ditulenkan menggunakan kit penulenan *PrimeWay Gel Extraction/PCR Purification Kit* (1st BASE, Singapura) dan dihantar ke Apical Scientific Sdn Bhd (Selangor Darul Ehsan, Malaysia) bagi tujuan penjujukan.

2.2.3 Analisis bioinformatik

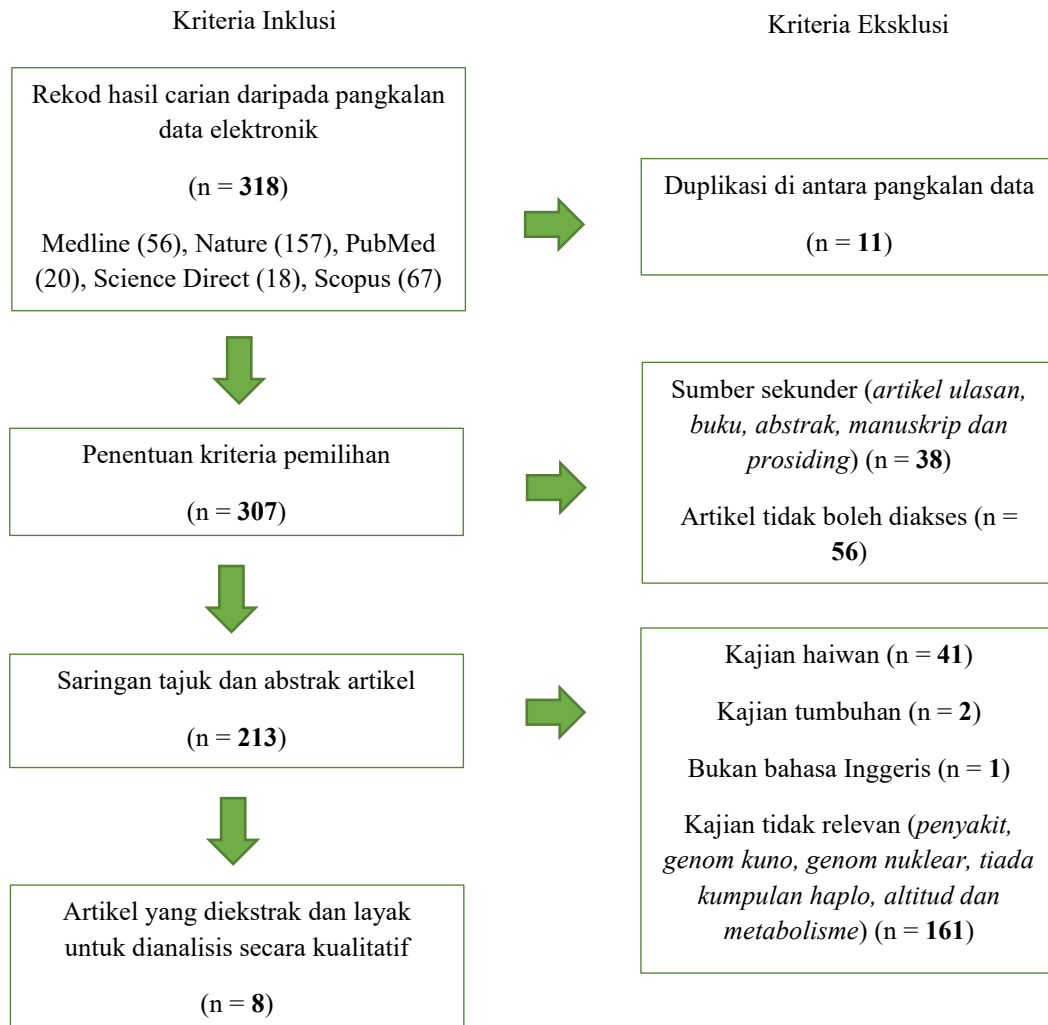
Perisian *BioEdit* telah digunakan bagi menganalisis dan menyunting hasil jujukan yang diperoleh di mana perisian ini akan menghasilkan lakaran elektroferogram. Selepas itu, jujukan sampel ini dibandingkan dengan jujukan genom mitokondria manusia pada pangkalan data NCBI (nombor akses NC_012920.1) sebagai rujukan dalam mengenal pasti peratusan identiti di antara kedua-dua jujukan tersebut dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Sequence Tool* (BLASTn). Bagi penentuan kumpulan haplo, sistem komputer yang dikenali sebagai *Mitomaster* telah digunakan. Sistem ini boleh didapati di dalam pangkalan data MITOMAP melalui laman sesawang <https://www.mitomap.org/mitomaster/index.cgi>.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Kajian sistematik

3.1.1 Hasil penyaringan data

Strategi carian menggunakan lima kata kunci dalam lima pangkalan data elektronik telah menghasilkan sebanyak 318 artikel. Penyaringan artikel dilakukan berpanduan garis panduan PRISMA dan hanya sebanyak lapan artikel yang layak digunakan. Hal ini kerana, artikel-artikel ini telah memenuhi kriteria kelayakan iaitu kajian berasaskan sample manusia serta mempunyai kaitan dengan tajuk kajian. Sehubungan itu, lapan artikel ini layak digunakan kerana merupakan artikel dalam bahasa Inggeris dengan teks penuh percuma yang diterbitkan antara tahun 2014 hingga 2024. Berikut adalah carta alir proses penyaringan artikel (Rajah 1).



Rajah 1. Carta alir penyaringan artikel berpandukan garis panduan PRISMA.

3.1.2 Klasifikasi kumpulan haplo berdasarkan varian SNP

Berdasarkan artikel-artikel yang telah disaringkan, sebanyak 43 varian SNP telah diperoleh. Berikut adalah jadual pengelasan kumpulan haplo berdasarkan varian SNP (Jadual 1).

Jadual 1. Pengelasan kumpulan haplo berdasarkan varian SNP.

Rujukan	Gen	Populasi	Kumpulan Haplo Makro	Varian SNP
Yamamoto et al. (2020)	<i>MT-ND1, MT-ND2, MT-CO1, D-loop</i>	Jepun	B	C3497T, A5127G, A6332G, A7389G, T7389C, C16168T
Sharma et al. (2018)	<i>MT-ND1, MT-ND2, MT-ND4, MT-ND5, MT-ND6, MT-ND4L, MT-CYB, MT-CO2, MT-CO3,</i>	India	A	C12603T, T16092C
			F	A234G
			K	A15799G
	<i>MT-ATP6, MT-TT, D-loop</i>		M	A9051G, A9218G, T152C, A7670C, T14208C, A15649G, T16234C, C7967T, G9254A, T15458C, T15479C, C3954T, T9833C, A15902G, T4500C, G10589A, C11203T, G3531A, T158A, A1446T, T16304C
			R	T11152C
			U	T15629C, C13934T, T4772C, C16188T, A16207G, T63C, C64T, G9554A, A15954G, G16213A
			W	G143A

3.2 Kajian amplifikasi PCR

3.2.1 Bacaan spektrofotometri

Berdasarkan kajian ini, nisbah penyerapan A260/280 bagi semua sampel DNA berada di dalam lingkungan yang ideal iaitu 1.8-2.0. Hal ini menunjukkan bahawa DNA yang diperolehi adalah tulen dan tiada kontaminasi protein atau fenol dalam sampel DNA. Namun demikian, nisbah penyerapan A260/230 bagi semua sampel DNA adalah kurang daripada 2.0 dan tidak berada di dalam lingkungan yang ideal iaitu 2.0-2.2. Ini mencerminkan bahawa sampel DNA telah mengalami kontaminasi

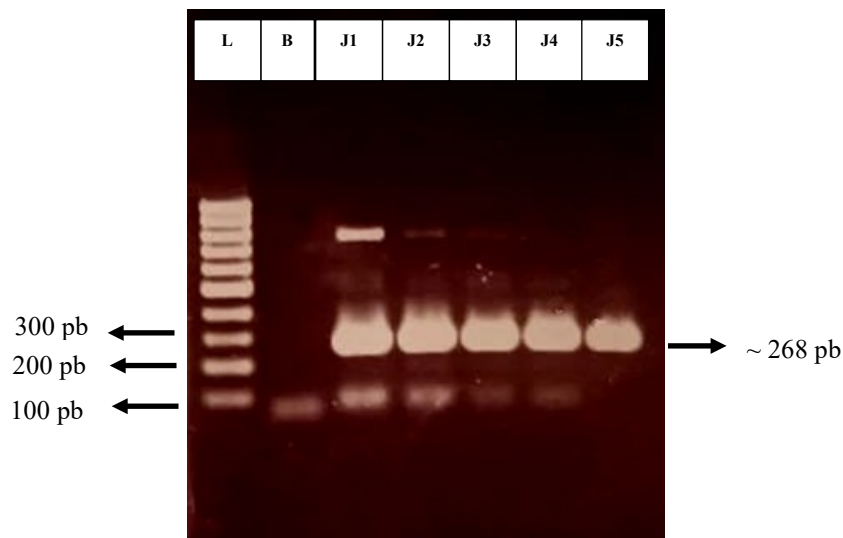
seperti protein, guanidin hidroklorida (digunakan untuk pengasingan DNA), EDTA, karbohidrat, lipid, garam atau fenol. Berikut adalah nilai A260/280 dan A260/230 yang terperinci bagi semua sampel DNA (Jadual 2).

Jadual 2. Bacaan spektrofotometri bagi kandungan sampel DNA

Sampel DNA	Kepekatan DNA (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
S1	31.2	1.90	1.59
S2	27.6	1.85	1.05
S3	33.3	1.80	0.90
S4	20.1	1.85	1.39
S5	24.5	1.96	1.81

3.2.2 Tindak balas rantaian polimerase (PCR)

Kajian ini memfokuskan kepada pencetus *MT-ND1* yang mempunyai mutasi hotspot dan ia dikenali sebagai pencetus P1. Pencetus P1 ini diamplifikasikan pada suhu penyepuhan yang berbeza. Rajah 2 menunjukkan pengoptimuman PCR bagi pencetus P1 iaitu pada suhu 50.5°C, 55.7°C, 59.3°C, 61.0°C dan 64.0°C. Berdasarkan rajah tersebut, suhu penyepuhan yang paling sesuai bagi pencetus P1 adalah pada suhu 64.0°C iaitu pada lajur 5 (J5). Hal ini sebab J5 menunjukkan jalur yang tunggal sahaja dan tiada pembentukan jalur sekunder seperti mana yang boleh dilihat pada J1 dan J2 yang menunjukkan bahawa pencetus P1 telah mengikat pada bebenang DNA secara spesifik. Sehubungan itu, suhu 64.0°C pada J5 adalah ideal kerana tiada *primer dimer* pada lajur tersebut seperti mana yang boleh dilihat pada J1, J2, J3 dan J4. Jalur-jalur yang terhasil bagi pencetus P1 adalah bersaiz ~268 pb.



Rajah 2. Profil elektroforesis 1.7% (w/v) gel agarosa menunjukkan pengoptimuman PCR suhu penyepuhan (L: penanda DNA H3 RTU 100 pb; B: blank; J1: 50.5°C; J2: 55.7°C; J3: 59.3°C; J4: 61.0°C; J5: 64.0°C)

3.2.3 Analisis polimorfisme

Dalam kajian ini, sampel S1 sahaja yang layak untuk dianalisis lanjutan. Sebaliknya, sampel S2, S3, S4 dan S5 tidak layak untuk dianalisis seterusnya disebabkan oleh pembentukan puncak elektroferogram yang rendah. Puncak ini terbentuk hasil daripada mesin penjujukan Sanger yang tidak dapat mengesan jujukan DNA sehingga menghasilkan latar belakang yang tinggi. Sebab utama kejadian ini berlaku adalah kuantiti DNA yang tidak mencukupi. Namun demikian, berdasarkan bacaan spektrofotometri, kepekatan DNA bagi sampel-sampel ini adalah melebihi 20.0 ng/μL (Jadual 2). Oleh itu, kejadian ini berkemungkinan berlaku disebabkan oleh kontaminasi dalam sampel DNA. Berdasarkan bacaan spektrofotometri, disebabkan nilai bagi nisbah A260/230 adalah bukan dalam lingkungan 2.0-2.2 maka berkemungkinan kontaminasi dalam sampel DNA ini ialah garam, karbohidrat atau fenol (Jadual 2). Selain itu, kejadian ini juga berkemungkinan berlaku disebabkan oleh pencetus P1 yang bias dan menyebabkan pengikatan yang lemah di antara pencetus P1 dan templat DNA (Ishii et al. 2001).

Di samping itu, perisian BLASTn telah digunakan bagi mengenal pasti nilai peratusan identiti (%) di antara jujukan sampel (*query*) dengan jujukan yang terdapat pada pangkalan data NCBI (*subject*) (nombor akses NC_012920.1) yang merujuk kepada *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS). Nilai ini adalah penting bagi menilai kualiti penjajaran jujukan. Sebagai contoh, peratusan identiti sebanyak 100% menunjukkan bahawa penjajaran jujukan adalah sangat berkualiti, di mana jujukan sampel dan jujukan rCRS adalah serupa. Sehubungan itu, perisian ini juga digunakan bagi menentukan nilai E. Nilai ini adalah sangat penting bagi menentukan signifikan penjajaran jujukan tersebut. Misalnya, nilai E yang kecil menunjukkan bahawa penjajaran jujukan tersebut adalah signifikan dan sebaliknya bagi nilai E yang besar. Berdasarkan hasil analisis daripada persisian BLASTn bagi sampel S1, peratusan identiti bagi jujukan sasaran dengan jujukan rCRS adalah sebanyak 100% dengan nilai E iaitu $2e-76$. Hal ini menunjukkan bahawa tiada mutasi pada jujukan gen *MT-ND1* bagi sampel S1.

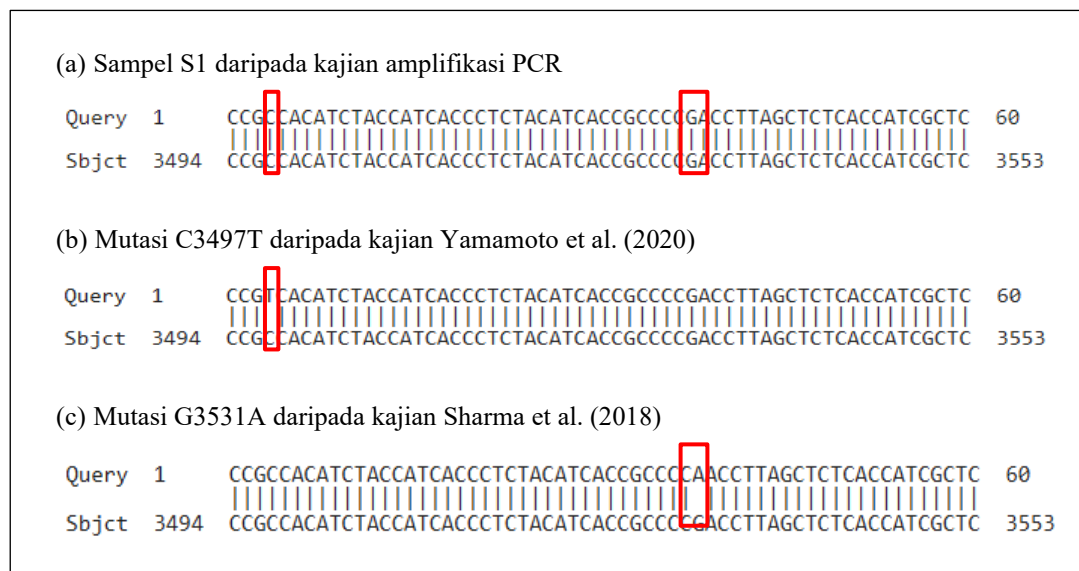
3.2.4 Penentuan kumpulan haplo

Perisian MITOMAP-Mitomaster telah digunakan dalam kajian ini bagi menentukan kumpulan haplo dan menilai potensi kepentingan biologi bagi setiap varian (Ruiz-Pesini et al. 2007). Dalam kajian ini, memandangkan sampel S1 tidak mengalami mutasi maka perisian MITOMAP-Mitomaster ini tidak dapat menentukan kumpulan haplo bagi sampel tersebut. Oleh itu, keseluruhan jujukan mtDNA perlu digunakan supaya perisian MITOMAP-Mitomaster akan memperoleh data-data yang mencukupi dan

berupaya untuk mengklasifikasikan sampel tersebut dengan tepat.

Berdasarkan kajian oleh Yamamoto et al. (2020), didapati bahawa terdapat mutasi peralihan di gen *MT-ND1* pada kedudukan nukleotida 3497 di mana berlakunya perubahan nukleotida sitosina kepada tiamina (C3497T). Mutasi ini banyak didapati dalam populasi Jepun dan diklasifikasikan di bawah kumpulan haplo sub B4f (kumpulan haplo makro B). Sehubungan itu, individu yang mempunyai mutasi C3497T lebih mudah untuk menghidap penyakit autoimun iaitu penyakit Graves'. Dengan ini, memandangkan sampel S1 tiada mutasi C3497T maka individu ini tidak boleh diklasifikasikan di bawah kumpulan haplo sub B4f. Tambahan pula, individu bagi sampel ini kurang berpotensi untuk menghidap penyakit Graves'.

Berdasarkan kajian oleh Sharma et al. (2018), didapati bahawa terdapat mutasi peralihan di gen *MT-ND1* pada kedudukan nukleotida 3531 di mana berlakunya perubahan nukleotida guanina kepada adenina (G3531A). Mutasi ini banyak didapati dalam populasi India dan ia diklasifikasikan di bawah kumpulan haplo sub M39b1a (kumpulan haplo makro M). Dengan ini, memandangkan sampel S1 tiada mutasi G3531A maka individu ini tidak boleh diklasifikasikan di bawah kumpulan haplo sub M39b1a. Walau bagaimanapun, ini tidak bermaksud bahawa individu ini tidak boleh diklasifikasikan di bawah kumpulan haplo makro B atau M. Hal ini sebab di bawah kumpulan haplo makro B dan M, masih terdapat banyak lagi cabang-cabang kumpulan haplo sub yang lain. Berikut adalah hasil perbandingan analisis mutasi di antara kajian amplifikasi PCR dan kajian sistematik (Rajah 3).



Rajah 3. Hasil perbandingan analisis mutasi di antara kajian amplifikasi PCR dan kajian sistematik.

4. Kesimpulan

Melalui kajian ini, didapati bahawa individu bagi sampel S1 tidak boleh diklasifikasikan di bawah kumpulan haplo sub B4f dan M39b1a memandangkan individu ini tiada varian SNP, C3497T dan G3531A. Oleh itu, gen *MT-ND1* didapati kurang sesuai untuk digunakan dalam kajian yang berkaitan dengan penentuan kumpulan haplo. Walau bagaimanapun, kajian lanjutan dicadangkan melibatkan gen *MT-ND1* menggunakan kawasan jujukan gen yang berbeza atau keseluruhan gen ini bagi menentukan kesesuaian gen *MT-ND1* untuk penentuan kumpulan haplo.

Penghargaan

Kajian Penyelidikan ini dibiayai oleh Universiti Kebangsaan Malaysia (GUP-2024-018).

Rujukan

- Aizpurua-Iraola, J., Abdeli, A., Benhassine, T., Calafell, F. & Comas, D. 2023. Whole mitogenomes reveal that NW Africa has acted both as a source and a destination for multiple human movements. *Scientific Reports* 13(1).
- Al-Rashedi, N.A.M., Jebor, M.A., Al-Saadi, A.H., Jebor, M.A., Mousa, T.A. & Al-Saadi, A.H. 2015. Mitochondrial dna haplogroups observed in iraqi population licensed under creative commons attribution cc by mitochondrial dna haplogroups observed in iraqi population. *Article in International Journal of Science and Research*, 4(12): 1424–1426.
- Cohen, T., Levin, L. & Mishmar, D. 2016. Ancient out-of-africa mitochondrial dna variants associate with distinct mitochondrial gene expression patterns. *PLoS Genetics* 12(11).
- Ishii, K. & Fukui, M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate pcr. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8): 3753–3755.
- Jaisamut, K., Pitiwararom, R., Sukawutthiya, P., Sathirapatya, T., Noh, H., Worrapitirungsri, W. & Vongpaisarnsin, K. 2023. Unraveling the mitochondrial phylogenetic landscape of Thailand reveals complex admixture and demographic dynamics. *Scientific Reports* 13(1).
- Khan, S.Y., Ali, M., Lee, M.C.W., Ma, Z., Biswas, P., Khan, A.A., Naeem, M.A., Riazuddin, S., Riazuddin, S., Ayyagari, R., Hejtmancik, J.F. & Riazuddin, S.A. 2020. Whole genome sequencing data of multiple individuals of Pakistani descent. *Scientific Data* 7(1).
- Kloss-Brandstätter, A., Summerer, M., Horst, D., Horst, B., Streiter, G., Raschenberger, J., Kronenberg, F., Sanguanserm, T., Horst, J. & Weissensteiner, H. 2021. An in-depth analysis of the mitochondrial phylogenetic landscape of Cambodia. *Scientific Reports* 11(1).
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. & Wallace, D.C. 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research* 35.
- Sharma, I., Sharma, V., Khan, A., Kumar, P., Rai, E., Bamezai, R.N.K., Vilar, M. & Sharma, S. 2018. Ancient human migrations to and through jammu kashmir- india were not of males exclusively. *Scientific Reports* 8(1).
- Silcocks, M., Farlow, A., Hermes, A., Tsambos, G., Patel, H.R., Huebner, S., Baynam, G., Jenkins, M.R., Vukcevic, D., Easteal, S., Leslie, S., Farlow, A., Hermes, A., Patel, H.R., Huebner, S., Baynam, G., Jenkins, M.R., Easteal, S. & Leslie, S. 2023. Indigenous Australian genomes show deep structure and rich novel variation. *Nature* 624(7992): 593–601.
- Wang, Y., Zhao, G., Fang, Z., Pan, H., Zhao, Y., Wang, Y., Zhou, X., Wang, X., Luo, T., Zhang, Y., Wang, Z., Chen, Q., Dong, L., Huang, Y., Zhou, Q., Xia, L., Li, B., Guo, J., Xia, K., Tang, B. & Li, J. 2022. Genetic landscape of human mitochondrial genome using whole-genome sequencing. *Human Molecular Genetics* 31(11): 1747–1761.
- Yamamoto, K., Sakaue, S., Matsuda, K., Murakami, Y., Kamatani, Y., Ozono, K., Momozawa, Y. & Okada, Y. 2020. Genetic and phenotypic landscape of the mitochondrial genome in the Japanese population. *Communications Biology* 3(1).
- Yudianto, A., Sosiawan, A., Palupi, R. & Novita, M. 2022. Sibling Analysis Using Mitochondrial Dna Displacement Loop (Mtdna D-Loop) Region In The Identification Of Madurese Population. *Sapporo Medical Journal*, 56(4).

Pengekspresan gen mengekod asid lemak desaturase *Phenoliferia glacialis*

Adilah Faqihah Abdul Kadir, Ain Nur Afifah Azman & Izwan Bharudin*

*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti
Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: ibb@ukm.edu.my*

Abstrak: *Phenoliferia glacialis* merupakan sejenis yis psikrofil dan mampu untuk bermandiri pada suhu sejuk. Kajian lalu telah berjaya mengenalpasti suhu optimum pertumbuhan yis ini adalah 15°C. Salah satu mekanisme adaptasi suhu sejuk bagi yis psikrofil adalah penghasilan asid lemak poli tak tepu yang dikawalatur oleh gen mengekod asid lemak desaturase (*FAD*). Namun begitu, maklumat berkaitan tahap pengekspresan gen mengekod asid lemak desaturase pada *P. glacialis* (*Pg_FAD*) masih belum diketahui. Kajian ini bertujuan untuk mengenalpasti gen mengekod *Pg_FAD* yang terlibat dalam adaptasi suhu sejuk serta tahap pengekspresannya pada suhu berbeza. Terdapat tiga gen *Pg_FAD* yang diperolehi melalui analisis jujukan transkriptom telah dipilih dan dilakukan analisis bioinformatik seperti analisis peramalan kefungsiian jujukan (BLASTx) dan analisis peramalan domain (InterProScan). Yis dikulturkan dalam media Yeast Peptone Dextrose (YPD) pada dua suhu berbeza iaitu 15°C dan 20°C. Kemudian, RNA jumlah diekstrak daripada setiap sampel menggunakan larutan TRIzol. Seterusnya, cDNA disintesis dan analisis qPCR dilakukan bagi melihat tahap pengekspresan satu gen *Pg_FAD*. Analisis lengkuk piawai RT-qPCR terhadap pencetus spesifik bagi gen penyelenggara aktin ialah 100.4% manakala bagi gen sasaran, *Pg_FAD* ialah 94.1%. Analisis pengekspresan gen pula menunjukkan tahap pengekspresan gen *Pg_FAD* adalah tinggi pada suhu rendah (suhu 15°C) berbanding suhu yang lebih tinggi (20°C). Hasil kajian ini mencadangkan kepentingan gen *Pg_FAD* sebagai salah satu mekanisme adaptasi terhadap suhu sejuk yang digunakan oleh yis ini.

Kata kunci: Antartika; adaptasi sejuk; pengekspresan gen; yis psikrofil

Abstract: *Phenoliferia glacialis* is a psychrophilic yeast that is able to survive at cold temperatures. Previous study have successfully identified the optimum growth temperature for this yeast at 15°C. One of the cold adaptation mechanisms of psychrophilic yeast is the production of polyunsaturated fatty acids regulated by the gene encoding fatty acid desaturase (*FAD*). However, information related to the expression level of the gene encoding fatty acid desaturase in *P. glacialis* (*Pg_FAD*) is still unknown. Therefore, this study aims to identify the gene encoding *Pg_FAD* involved in cold temperature adaptation as well as its expression level at different temperatures. Several *Pg_FAD* genes obtained through transcriptome sequence analysis were selected and bioinformatics analysis such as functional analysis (BLASTx) and domain prediction analysis (InterProScan) were performed. Yeast were cultured in different growth temperatures; 15°C and 20°C. Next, total RNA was extracted from both samples using TRIzol solution. cDNA was synthesized and qPCR analysis was performed to determine the expression level of the *Pg_FAD*. The RT-qPCR standard curve analysis using the specific primer for housekeeping gene (*Actin*) is 100.4% whereas for gene of interest, *Pg_FAD* is 94.1%. Gene expression analysis showed that the expression level of *Pg_FAD* gene was higher at lower temperature (15°C) compared to higher temperature (20°C). The results showed the importance of *Pg_FAD* as one of the cold adaptation mechanism of this yeast.

Keywords: *Antarctica; cold adaptation; gene expression; psychrophilic yeast*

1. Pengenalan

Mikroorganisma psikrofil merupakan mikroorganisma yang mampu hidup dan membiak dalam keadaan suhu yang rendah. Mikroorganisma ini boleh didapati pada kawasan yang mempunyai suhu sejuk yang kekal termasuk laut dalam, gunung dan kawasan berkutub (D'Amico et al. 2006). Akibat perubahan suhu yang mendadak terutamanya semasa musim panas di Antartika, tekanan dalam sel akan meningkat dan tekanan ini boleh menyebabkan tindak balas yang mengubah corak pengekspresan gen (Bharudin et al. 2018; Yusof et al. 2021).

Mikroorganisma psikrofil menggunakan beberapa strategi untuk beradaptasi dalam suhu yang sejuk seperti di Antartika. Antara mekanisme yang digunakan ialah penghasilan protein antibeku bagi melindungi molekul kriopelindung dari kesan negatif akibat suhu yang ekstrem sejuk serta penghasilan asid lemak poli tak tepu (*Poly Unsaturated Fatty Acid*, PUFA) yang berperanan dalam mengawal tahap kebendaliran membrannya (Firdaus-Raih et al. 2018). Asid lemak poli tak tepu yang terhasil disintesis oleh enzim asid lemak desaturase (*Fatty Acid Desaturase*, FAD). Terdapat beberapa jenis FAD yang mempunyai fungsi spesifik dalam penambahan ikatan tak tepu pada rantai asil (Czumaj & Śledziński 2020).

Yis Pheoliferia glacialis merupakan salah satu yis yang menunjukkan taburan yang luas di Antartika (de Souza et al., 2022). Analisis keupayaan metabolik menunjukkan bahawa strain ini menghasilkan enzim sejuk-aktif seperti lipase dan protease, yang berfungsi secara optimum pada suhu rendah. Enzim jenis ini mempunyai aplikasi industri yang luas termasuk dalam pemprosesan makanan sejuk dan biodegradasi dalam persekitaran suhu rendah (Cavicchioli et al. 2011). Namun begitu, sehingga kini tiada maklumat berkaitan gen-gen yang mengekod FAD pada *P. glacialis*. Kajian ini akan mengenalpasti bilangan gen *Pg_FAD* serta tahap pengekspresannya pada suhu berbeza.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Sampel kajian

Yis *Phenoliferia glacialis* yang digunakan dalam kajian ini telah dipencilkan dari Pusat Penyelidikan Casey, Antartika. Stok kultur *P. glacialis* yang digunakan ialah dari strain USM-PSY62 dan dibekalkan oleh Koleksi Kultur Mikrob Antartika, Fakulti Sains Hayat, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.

2.2 Kaedah penyelidikan

2.2.1 Analisis bioinformatik

Jujukan gen *Pg_FAD* telah dipilih berdasarkan jujukan transkriptom *P. glacialis*. Jujukan DNA tersebut telah dibandingkan dengan pangkalan data protein menggunakan alat bioinformatik *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTx) untuk memastikan jujukan yang dipilih adalah gen asid lemak desaturase. Jujukan gen yang diperoleh juga telah ditukarkan kepada jujukan asid amino menggunakan perisian bioinformatik *Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>). Jujukan asid amino yang diperoleh telah dianalisis menggunakan perisian *InterProScan* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) untuk mengenalpasti kehadiran domain yang terlibat dalam jujukan gen mengekod *Pg_FAD*.

2.2.2 Pengkulturan yis

Phenoliferia glacialis dikulturkan ke atas agar yis pepton dekstroza (YPD) yang mengandungi kanamisin (50 µg/mL) dan ampicilin (50 µg/mL) dan dieram selama 7 hari pada suhu 15°C. Antibiotik kanamisin dan ampicilin ditambahkan ke dalam medium pengkulturan untuk mengelakkan kontaminasi mikroorganisma lain terutamanya bakteria. Kemudian, koloni tunggal yis *P. glacialis* dikulturkan di dalam botol universal steril yang mengandungi 10 mL media YPD serta antibiotik pada suhu 15°C dan dieram selama 7 hari dengan penggoncangan pada 180 rpm. Selepas 7 hari, kultur tersebut dicerap di bawah mikroskop untuk memastikan tiada kontaminasi dengan mikroorganisma lain. Kemudian, kira-kira 50 µL kultur tersebut dipindahkan ke dalam kelalang kon bersaiz 250 mL yang mengandungi 50 mL YPD serta antibiotik. Kultur baharu tersebut dieram pada dua suhu berbeza

iaitu 15°C dan 20°C dengan goncangan 180 rpm sehingga mencapai fasa log (kira-kira 5 hari selepas pengkulturan). Eksperimen dijalankan secara triplikat.

2.2.3 Pengekstrakan RNA jumlah dan sintesis cDNA

Sel yis dituai melalui emparan pada 7,500 rpm selama 15 min pada suhu 4°C. Pengekstrakan RNA jumlah *P. glacialis* dilakukan menggunakan reagen TRIzol (Invitrogen) (Bharudin et al. 2014). RNA jumlah yang telah diekstrak ditentukan kuantiti dan kualitinya menggunakan spektrofotometer NanoDrop (*Thermo Scientific, USA*) dan elektroforesis gel agarosa 1%. Sebanyak 5 µg sampel RNA jumlah yang bebas kontaminasi digunakan sebagai templat untuk sintesis cDNA menggunakan kit *HiScript III 1st Strand Synthesis Kit* (*Vazyme, China*).

2.2.4 Tindak Balas Berantai Polimerase Kuantitatif Masa Nyata (RT-qPCR)

Tindak balas RT-qPCR dilakukan menggunakan kit *Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix* (*Vazyme, China*). Campuran tindak balas RT-qPCR adalah 10 µL *Taq pro Universal SYBR qPCR Master Mix*, 0.4 µL pencetus ke hadapan (10 µM), 0.4 µL pencetus ke belakang (10 µM), 2 µL templat cDNA dan 7.2 µL air suling-bebas RNase. Jujukan pencetus yang digunakan adalah seperti Jadual 1. Tetapan program bagi tindak balas RT-qPCR adalah seperti Jadual 2 yang dilakukan menggunakan mesin *iQTM 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (*Bio-Rad, USA*). Produk RT-qPCR yang terhasil dicerap menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% untuk memastikan bahawa hanya satu jalur terhasil dalam amplifikasi tersebut. Asai RT-PCR dijalankan dalam triplikat dan data yang diperolehi dianalisis. Analisis statistik ANOVA-1-hala dijalankan bagi mengkaji variasi antara sampel-sampel yang dikaji.

Jadual 1. Jujukan pencetus yang digunakan dalam amplifikasi gen sasaran bagi tindak balas RT-qPCR.

Pencetus	Jujukan (5' – 3')
Aktin_F	GGCGAGCTGACCGATAATCA
Aktin_R	TCCTCGCAGATGTGGTCAAC
Pg_FAD_F	CTTTCCGGGGGTTGAGTTGA
Pg_FAD_R	ACTCCCGTTCGCAATGATGT

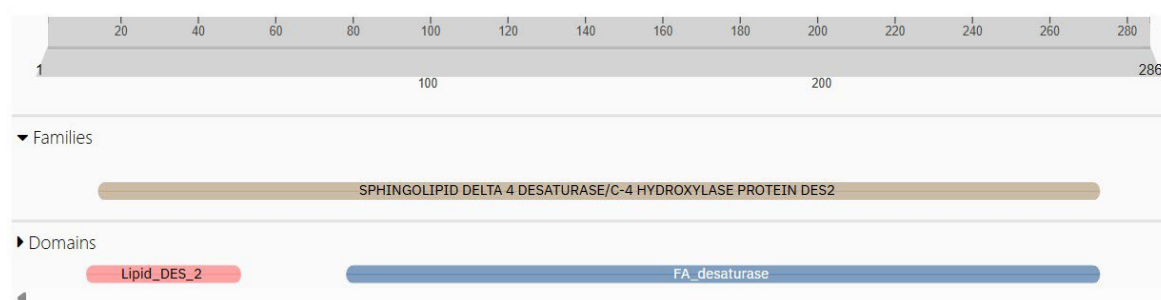
Jadual 2. Tetapan program mesin untuk pengasaan RT-qPCR.

Langkah	Suhu (°C)	Masa	Kitaran
Penyahhasilan awal	95.0	30 s	1
Penyahhasilan	95.0	10 s	40
Penyepuhan dan Pemanjangan	60.0	30 s	
Lengkuik peleburan	52.0-95.0	15 s	

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Analisis Bioinformatik

Pencirian jujukan asid amino *Pg_FAD* melalui analisis BLASTx dan InterProScan menunjukkan persamaan identiti yang tinggi dengan jujukan asid amino delta 4 asid lemak desaturase (Rajah 1). Analisis InterProScan menunjukkan jujukan yang diperolehi dalam kajian ini mempunyai domain asid lemak desaturase yang dikategorikan di dalam keluarga protein sphingolipid delta-4 desaturase. Ini menunjukkan bahawa berkemungkinan besar, *Pg_FAD* merupakan salah satu gen mengekod asid lemak dasaturase dalam *P. glacialis* dan terlibat di dalam mengawalatur kebendaliran membran yis ini pada suhu rendah.



Rajah 1. Hasil analisis *InterProScan* terhadap jujukan asid amino *Pg_FAD*. Didapati, jujukan *Pg_FAD* mempunyai persamaan yang tinggi dengan jujukan domain asid lemak desaturase.

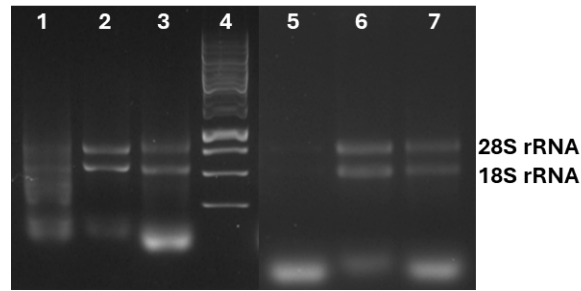
3.2 Pengekstrakan RNA Jumlah

Secara amnya, kepekatan dan ketulenan RNA jumlah bagi sampel 15°C lebih tinggi berbanding sampel 20°C. Selain itu, nisbah A_{260} / A_{280} dan A_{260} / A_{230} digunakan untuk mengukur kualiti dan ketulenan sampel. Nisbah yang baik adalah sekitar 2.0, namun kesemua sampel mempunyai nilai A_{260} / A_{230} yang rendah kerana berlaku kontaminasi. Nisbah A_{260} / A_{280} untuk sampel 15°C adalah 2.0 – 2.1, manakala untuk sampel 20°C adalah diantara 1.2 – 1.9 menandakan berlakunya kontaminasi daripada protein. Ringkasan hasil bagi sampel RNA jumlah ditunjukkan pada Jadual 3.

Jadual 3. Kepekatan dan ketulenan ekstrak RNA jumlah.

Sampel RNA	Kepekatan (ng/ μ L)	A_{260} / A_{280}	A_{260} / A_{230}
15°C (1)	2881.4	2.06	1.59
15°C (2)	2941.2	2.08	1.72
15°C (3)	813.0	2.02	1.71
20°C (1)	1046.2	1.51	0.41
20°C (8)	1180.9	1.24	0.36
20°C (9)	1210.3	1.97	0.84

Bagi menentukan kualiti RNA jumlah yang berjaya diekstrak, kira-kira 1 μ g sampel RNA jumlah tersebut dicerap melalui elektroforesis gel agarosa 1.5% (Rajah 2). Hasil tersebut menunjukkan kehadiran 2 jalur pada gel agarosa. Jalur yang berada di atas mewakili subunit 28S rRNA manakala jalur bawah merupakan subunit 18S rRNA manakala jalur mRNA tidak kelihatan (Bhavsar et al., 2010). Secara umumnya, mRNA adalah molekul yang ditranslasikan kepada protein dan saiz mRNA adalah lebih kecil daripada rRNA menyebabkan mRNA tidak dapat dilihat dan sukar untuk dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa. Oleh itu, kehadiran rRNA pada gel agarosa dijadikan sebagai petunjuk kerana kualiti dan integriti rRNA boleh dicerap. Kualiti dan integriti sampel RNA adalah rendah jika 2 jalur tidak kelihatan di dalam gel elektroforesis (Lajur 1 dan 5, Rajah 2). RNA yang berkualiti tinggi biasanya mempunyai 2 jalur rRNA pada elektroforesis gel agarosa (Lajur 2 dan 3, Rajah 2).



Rajah 2. Profil elektroforesis gel agarosa 1.5% bagi RNA jumlah *P. glacialis* yang diekstrak daripada sampel 15°C dan 20°C. Kelihatan dengan jelas kehadiran 2 jalur RNA iaitu 28S rRNA (jalur atas) dan 18S rRNA (jalur bawah). Lajur 1-3 merupakan sampel RNA jumlah 15°C; lajur 4 ialah penanda tetangga DNA *GeneRuler* 1 kb (Thermo Scientific, USA); lajur 5-7 merupakan sampel RNA jumlah 20°C.

3.3 Analisis RT-qPCR

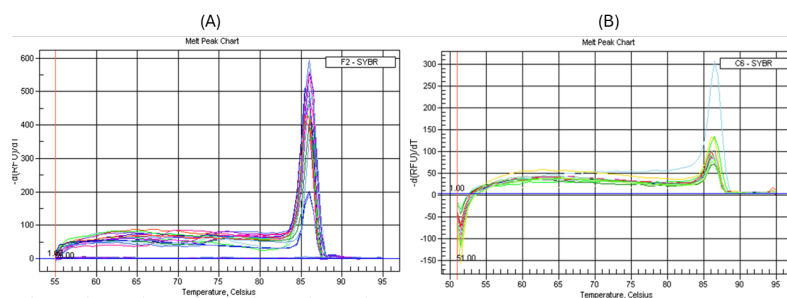
3.3.1 Penentuan kecekapan RT-qPCR melalui pembinaan lengkung piawai

Kecekapan RT-qPCR perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan kaedah penentuan relatif bagi setiap gen dengan menggunakan lengkung piawai untuk memastikan ketepatan asai yang dilakukan. Kecekapan amplifikasi ditentukan menggunakan kecerunan lengkung piawai yang diperoleh berdasarkan rumus:

$$E = 10^{(-1/\text{kecerunan})}$$

Nilai kecerunan lengkung piawai adalah penting kerana nilai peratusan kecekapan PCR dapat ditentukan melalui nilai ini. Kebiasaannya, nilai kecerunan yang diperoleh adalah negatif kerana kecerunan dibina berdasarkan nilai C_q daripada beberapa pencairan bersiri. Analisis lengkung piawai bagi gen penyelenggara aktin ialah 100.4% manakala bagi gen sasaran *Pg_FAD* ialah 94.1%. Kecekapan PCR bersamaan 100% menunjukkan jumlah produk yang dihasilkan berganda pada dua bagi setiap kitar. Namun begitu, peratus kecekapan antara 90% sehingga 110% juga diterima dalam proses RT-qPCR (Booth et al. 2010).

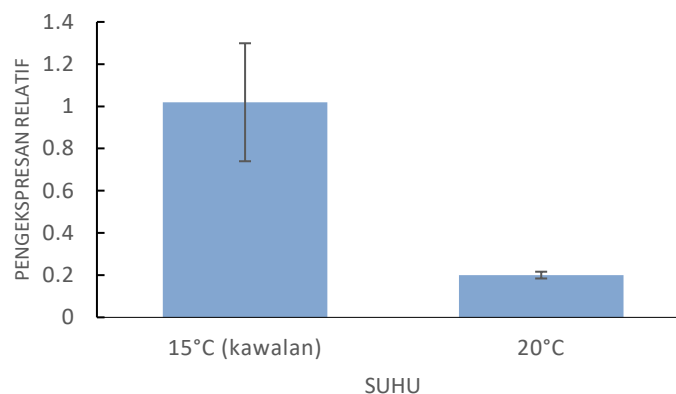
Setiap amplifikasi RT-qPCR juga telah dianalisis melalui lengkung peleburan (*melting curve*). Analisis lengkung peleburan memberi maklumat penting mengenai produk amplifikasi yang terhasil ketika proses RT-qPCR. Jika puncak tunggal yang terhasil, ia membawa maksud produk yang terhasil adalah spesifik. Analisis lengkung peleburan bagi kedua-dua gen iaitu gen penyelenggara, aktin dan gen sasaran *Pg_FAD* menunjukkan hanya satu sahaja puncak yang terhasil (Rajah 3).



Rajah 3. Kecerunan lengkung piawai yang diperoleh menggunakan nilai C_q daripada kepekatan cDNA *P. glacialis* yang berbeza. Kelihatan hanya satu sahaja puncak yang kelihatan menunjukkan hanya satu sahaja produk amplifikasi PCR yang terhasil dari setiap pasangan pencetus spesifik yang dibina. (A) *Aktin*; (B) *Pg_FAD*.

3.3.2 Asai RT-qPCR

RT-qPCR dijalankan untuk menentukan tahap pengekspresan relatif gen sasaran berbanding gen penyelenggara *P. glacialis*. Graf bar pengekspresan relatif gen *Pg_FAD* pada suhu 15°C dan 20°C ditunjukkan pada Rajah 4. Didapati tahap pengekspresan gen *Pg_FAD* pada suhu 20°C adalah rendah berbanding suhu 15°C. Ini menunjukkan bahawa tahap pengekspresan gen *Pg_FAD* adalah tinggi (1.0) pada suhu rendah dan menurun (0.2) pada suhu tinggi. Hasil yang sama juga diperolehi pada yis psikrofil *Glaciozyma antarctica*, di mana beberapa gen mengekod asid lemak desaturase menunjukkan tahap pengekspresan gen yang tinggi pada suhu rendah (-12°C) berbanding suhu tinggi (15°C) (Bharudin et al., 2018; Firdaus-Raih et al., 2018). Secara tidak langsung, ini menunjukkan bahawa gen *Pg_FAD* ini memainkan peranan yang penting sebagai salah satu mekanisme adaptasi terhadap suhu rendah *P. glacialis*.



Rajah 4. Tahap pengekspresan relatif gen sasaran *Pg_FAD* pada suhu 15°C dan 20°C. Didapati tahap pengekspresan *Pg_FAD* adalah tinggi pada suhu rendah (15°C) berbanding suhu tinggi (20°C).

4. Kesimpulan

Kajian ini telah mengenalpasti satu gen yang mengekod asid lemak desaturase (*Pg_FAD*) daripada yis psikrofil, *P. glacialis*. Analisis peramalan jujukan (BLASTx) dan peramalan domain (*InterProScan*) telah berjaya mengenalpasti bahawa gen *Pg_FAD* mempunyai fungsi yang sama seperti gen *desaturase* pada mikroorganisma psikrofil yang lain. Analisis asai RT-qPCR pada dua suhu berbeza juga mendapati bahawa tahap pengekspresan gen *Pg_FAD* adalah tinggi pada suhu rendah (15°C) berbanding suhu yang lebih tinggi (20°C).

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh Yayasan Penyelidikan Sultan Mizan (YPASM) (nombor geran ST-2021-012). Terima kasih diucapkan kepada Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia yang memberikan bantuan kewangan dan lokasi kajian kepada pelajar.

Rujukan

- Bharudin, I., Abu Bakar, M.F., Hashim, N.H.F., Mat Isa, M.N., Alias, H., Firdaus-Raih, M., Md Illias, R., Najimudin, N., Mahadi, N.M., Abu Bakar, F.D. & Abdul Murad, A.M. 2018. Unravelling the adaptation strategies employed by *Glaciozyma antarctica* PI12 on antarctic sea ice. *Marine Environmental Research* 137: 169-176.
- Bhavsar, R.B., Makley, L.N. & Tsonis, P.A. 2010. The other lives of ribosomal proteins. *Human Genomics* 4: 327.
- Booth, C.S., Pienaar, E., Termaat, J.R., Whitney, S.E., Louw, T.M. & Viljoen, H.J. 2010. Efficiency of the polymerase chain reaction. *Chemical Engineering Science* 65: 4996-5006.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., & Sowers, K.R. 2011. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 22(3): 352-361.

- Czumaj, A. & Śledziński, T., 2020. Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease, *Nutrients*.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G., Gerday, C. & Gerday, C. 2006. Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *EMBO reports* 7: 385-389-389.
- de Souza, L.M.D., Lirio, J.M., Coria, S.H., Lopes, F.A.C., Convey, P., Carvalho-Silva, M., de Oliveira, F.S., Rosa, C.A., Câmara, P.E.A.S. & Rosa, L.H. 2022. Diversity, distribution and ecology of fungal communities present in antarctic lake sediments uncovered by DNA metabarcoding. *Scientific Reports* 12: 8407.
- Firdaus-Raih, M., Hashim, N.H.F., Bharudin, I., Abu Bakar, M.F., Huang, K.K., Alias, H., Lee, B.K.B., Mat Isa, M.N., Mat-Sharani, S., Sulaiman, S., Tay, L.J., Zolkefli, R., Muhammad Noor, Y., Law, D.S.N., Abdul Rahman, S.H., Md-Illias, R., Abu Bakar, F.D., Najimudin, N., Abdul Murad, A.M. & Mahadi, N.M. 2018. The *Glaciozyma antarctica* genome reveals an array of systems that provide sustained responses towards temperature variations in a persistently cold habitat. *PLOS ONE* 13: e0189947.
- Yusof, N.A., Hashim, N.H. & Bharudin, I. 2021. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the antarctic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12. *Journal of Fungi* 7.

Penilaian Semula Ubat sebagai Rawatan Alternatif untuk *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*

(Drug Repurposing as Alternative Treatment for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*)

Nabila Umairah Binti Isham Alwady, Leviyashini G Subashandar, How Shu Sian & Sylvia Chieng*

Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: sylvia@ukm.edu.my

Abstrak: Kerintangan antimikrob merupakan ancaman kesihatan global yang serius, dengan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai patogen ESKAPE yang utama akibat kerintangan terhadap pelbagai ubat. Kajian ini menggunakan pendekatan *in silico* untuk mengenal pasti ubat sedia ada yang boleh digunakan semula sebagai rawatan alternatif. Gen penting dikenal pasti melalui kajian kepustakaan dan carian homologi, menghasilkan lima gen sasaran untuk *P. aeruginosa* (*lptD*, *bamA*, *ftsI*, *surA*, dan *tolB*) dan enam gen untuk *S. aureus* (*spsB*, *secD*, *mraY*, *divIB*, *ssaA2*, dan *tagG*). Ramalan dan pengesahan struktur protein dilakukan menggunakan AlphaFold dan analisis plot Ramachandran, manakala pelayan web Drug ReposER digunakan untuk mengenal pasti calon-calon ubat yang berpotensi. Pendokkan molekul menggunakan AutoDock Vina menunjukkan bahawa FtsI adalah sasaran ubat terbaik bagi *P. aeruginosa*, dengan *alectinib*, *tamibarotene* dan *dasatinib* menunjukkan keafinan pengikatan tertinggi. Bagi *S. aureus*, protein SecDF dikenal pasti sebagai sasaran utama, dengan *tamibarotene*, *amprenavir* dan *colchicine* menunjukkan potensi pengikatan yang kuat. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa penggunaan semula ubat boleh menjadi strategi berkesan dalam merawat jangkitan *P. aeruginosa* dan *S. aureus* yang rintang ubat, sekali gus menawarkan rawatan terapeutik alternatif dalam memerangi kerintangan antimikrob.

Kata kunci: Kerintangan antimikrob, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, anti-jangkitan

Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) is a major global health concern, with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* identified as priority ESKAPE pathogens due to their multidrug resistance. This study utilized *in silico* approaches to identify repurposed drugs as alternative treatments. Essential genes were identified through literature and homology searches, leading to the selection of five target genes for *P. aeruginosa* (*lptD*, *bamA*, *ftsI*, *surA*, and *tolB*) and six genes for *S. aureus* (*spsB*, *secD*, *mraY*, *divIB*, *ssaA2*, and *tagG*). Protein structure prediction and validation were performed using AlphaFold and Ramachandran plot analysis, while the Drug ReposER web server was used to identify potential drug candidates. Molecular docking, conducted using AutoDock Vina, revealed that FtsI was the optimal drug target for *P. aeruginosa*, with *alectinib*, *tamibarotene* and *dasatinib* showing the highest binding affinities. For *S. aureus*, SecDF was identified as the primary target, with *tamibarotene*, *amprenavir* and *colchicine* demonstrating strong binding potential. These findings highlight the potential of drug repurposing as an effective strategy to combat drug-resistant *P. aeruginosa* and *S. aureus* infections, offering promising therapeutic alternatives in the fight against AMR.

Keywords: Antimicrobial resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, anti-infective

1. Pengenalan

Berdasarkan Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO), pada tahun 2019 sahaja dijangkakan bahawa 4.95 juta kematian dikaitkan dengan jangkitan bakteria rintang antimikrob manakala 1.27 juta kematian adalah berpunca secara langsung daripada kerintangan antimikrob (Murray et al. 2022). Malah, kadar kemunculan strain bakteria rintang ubat adalah lebih cepat berbanding kadar penemuan antibiotik baru (Liu et al. 2021), dengan jangkaan 10 juta kematian disebabkan oleh AMR menjelang tahun 2050 (O'Neill 2016). Ketidakterkesan aktiviti antimikrob terhadap bakteria menjadi risiko dan kebimbangan kesihatan awam, dengan kajian menunjukkan peningkatan dalam kerintangan terhadap antibiotik di Malaysia sejak beberapa tahun lepas (Naeemudeen et al. 2021).

Kumpulan patogen yang diberikan keutamaan dalam penyelidikan di mana rawatan berkesan amat diperlukan dikenali sebagai patogen ESKAPE, yang terdiri daripada bakteria *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan spesies *Enterobacter* (Venkateswaran et al. 2023). *P. aeruginosa* merupakan antara penyebab utama jangkitan nosokomial seperti pneumonia dan *cystic fibrosis*. Namun, disebabkan oleh kemunculan strain yang rintang, maka pilihan rawatan efektif terhadap jangkitan *P. aeruginosa* adalah terhad (Wood et al. 2023). Bukan itu sahaja, isu kerintangan antibiotik di kalangan bakteria Gram positif, terutamanya *S. aureus*, yang menjadi ancaman besar kepada kesihatan awam global, turut menampakkan trend yang meningkat. *S. aureus*, adalah patogen oportunistik manusia yang kerap menyebabkan beberapa komplikasi serius. Jangkitan *S. aureus* adalah sukar dirawat dan memerlukan tempoh rawatan yang panjang, menyebabkan keperluan mendesak untuk pembangunan antibiotik baru yang lebih berkesan (Kourtis et al. 2019).

Penemuan ubatan baru merupakan proses yang memerlukan kos yang tinggi dan masa yang lama, dengan anggaran kos sebanyak 1 hingga 2 billion dolar US dan tempoh sehingga 10 ke 15 tahun. Ia juga memerlukan proses saringan yang ketat kerana perlu melalui 3 fasa percubaan klinikal (Sun et al. 2022). Strategi yang dicadangkan adalah penilaian semula ubat atau “*drug repurposing*” secara *in silico*. Penilaian semula ubat telah menghasilkan kejayaan dalam beberapa tahun terkini. Antaranya adalah *halicin* iaitu antibiotik yang dikenal pasti mempunyai struktur yang berbeza daripada antibiotik biasa dan mempunyai aktiviti bakterisidal terhadap spektrum patogen yang luas seperti *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacteriaceae* rintang-karbapenem dan *Escherichia coli* (Stokes et al. 2020). Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mengenal pasti ubat-ubatan sedia ada yang berpotensi untuk dijadikan rawatan alternatif bagi bakteria *P. aeruginosa* dan *S. aureus* rintang antimikrob.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Bahan

Perisian bioinformatik yang digunakan untuk analisis *in silico* diperolehi melalui pelayan web atas talian. Jujukan gen serta struktur protein didapati melalui pencarian di pangkalan data UniProt dan Protein Data Bank manakala maklumat tentang ubat sedia ada diperolehi menggunakan pangkalan data Drugbank. Perisian yang telah digunakan adalah R studio, Vaxign2, Vax Elan, PSORTb, CavityPlus, AlphaFold 3, SAVES 6.1, Drug ReposER, ChimeraX 1.8, Chimera 1.18, AutoDockVina dan Seam Dock.

2.2 Kaedah

2.2.1 Pengenalpastian dan penyaringan gen-gen penting

Pencarian gen-gen penting dilakukan berdasarkan kajian penyelidikan lepas menggunakan pangkalan data seperti Google Scholar dan PubMed. Gen penting adalah potensi sasaran ubat kerana kehilangan fungsi gen ini membawa kepada kematian sel dan ia lebih berkemungkinan untuk memainkan peranan dalam rawatan terapeutik tertentu berbanding gen tidak penting. Daripada senarai gen yang dikenalpasti, gen tersebut telah disenarai pendekkan kepada gen utama berdasarkan kriteria tertentu: (i) Kepentingan dalam kemandirian bakteria, (ii) Kawasan terpulihara antara strain berbeza, (iii) Tahap homologi dengan gen manusia, (iv) Lokasi subselel gen dan (v) Potensi dalam mengikat dan dimodulasi oleh ubat atau molekul seperti ubat (*druggability*) (Theuretzbacher et al. 2023).

2.2.2 Analisis struktur protein

Peramalan struktur protein dilakukan menggunakan pangkalan data PDB, UniProt, dan AlphaFold, diikuti dengan pengesahan struktur 3D menggunakan SAVES v6.1 dan AlphaFold 3. Analisis struktur protein ramalan telah dilakukan berdasarkan beberapa metrik seperti nilai pTM, pLDDT dan plot Ramachandran. Selain itu, perisian CavityPlus telah digunakan untuk meramal poket pengikatan dan tahap *druggability*, iaitu kebolehan struktur untuk mengikat dan dimodulasi oleh molekul.

2.2.3 Pengenalpastian calon-calon ubat

Pengenalpastian sasaran ubat dilakukan melalui Drug ReposER, yang mengenal pasti ubat berpotensi mengikat pada protein sasaran berdasarkan padanan residu asid amino antara struktur protein dan tapak ubat diketahui. Daripada senarai ubat, calon-calon ubat dipilih berdasarkan kriteria lebih daripada 3 padanan residu asid amino dan dianalisis dengan lebih lanjut berdasarkan pendokkan molekul.

2.2.4 Pendokkan molekul

Pendokkan dilakukan antara struktur molekul ubat dengan struktur protein menggunakan perisian AutoDock Vina melalui program Chimera dan CB-Dock. Persiapan struktur protein telah dilakukan terlebih dahulu dengan mengeluarkan ligan asal dan residu lain pada struktur protein. Struktur protein telah dioptimumkan dengan menjalankan peminimuman tenaga dan Dock Prep. Pendokkan antara molekul ubat dan protein dijalankan berdasarkan dimensi poket pengikatan yang telah diramal dalam langkah sebelum ini. Hasil pendokkan menjana kemungkinan konformasi dan orientasi ligan pada tapak pengikatan protein. Konformasi pendokkan yang terbaik iaitu yang memberikan nilai RMSD dan skor pendokkan terendah (nilai paling negatif) telah dipilih. Bagi setiap molekul ubat, pendokkan dilakukan sebanyak tiga kali dan purata skor diambil untuk memastikan kebolehpercayaan hasil.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Pemilihan *FtsI* dan *SecDF* sebagai protein penting *P. aeruginosa* dan *S. aureus*

Berdasarkan kajian Poulsen et al. (2019), didapati bahawa *P. aeruginosa* mempunyai 321 gen penting yang terpulihara merentasi pelbagai strain. Gen ini telah disenarai pendekkan lagi kepada lima calon gen utama berdasarkan kriteria tertentu iaitu homologi dengan protein hos, lokasi subselel dan fungsi gen. Berdasarkan analisis struktur ramalan (Jadual 1), protein *FtsI* *P. aeruginosa* mempunyai struktur dengan kualiti yang paling baik dan mencapai piawai struktur ramalan yang tepat. Ia secara konsisten mendapat markah yang terbaik antara calon protein penting lain untuk analisis pTM, pLDDT, plot Ramachandran dan MolProbity. Nilai ERRAT turut memenuhi kriteria struktur ramalan yang baik. Selain itu, *FtsI* mempunyai struktur protein yang telah dibuktikan melalui eksperimen (PDB ID : 7KIT) dan lebih yakin untuk digunakan dalam analisis pendokkan.

Protein *FtsI* telah dikenal pasti sebagai sasaran ubat untuk *P. aeruginosa* berdasarkan beberapa kriteria. Pertama adalah kepentingannya dalam kemandirian bakteria. Ia merupakan protein pengikat penisilin yang berperanan dalam sintesis peptidoglikan sel bakteria. Kepentingan protein ini dibuktikan melalui satu kajian gen 'knockout' di mana strain *P. aeruginosa* tanpa protein *FtsI* tidak berupaya untuk tumbuh, dan pertumbuhan dicerap apabila protein ini diekspreskan (Chen et al. 2016). Selain itu, didapati bahawa tiada homolog protein *FtsI* dalam manusia melalui hasil Vaxign2. Ini merupakan faktor pemilihan penting untuk mengelakkan kereaktifan silang di mana ubat mengikat dan bertindak balas ke atas protein manusia yang serupa, yang boleh membawa kepada kesan sampingan. Seterusnya, protein *FtsI* terletak di membran plasma. Protein pada membran merupakan sasaran untuk kebanyakan ubat kerana ia mudah diakses pada permukaan sel dan membolehkan tindakan ubat yang lebih efisien. Hasil daripada CavityPlus menunjukkan bahawa protein *FtsI* mempunyai kebolehpayaan untuk mengikat molekul dengan kuat. Kajian lepas juga menyokong penggunaan *FtsI* sebagai sasaran ubat. Contohnya, ubat *ceftobiprole* bertindak dengan merencat aktiviti protein ini dalam *P. aeruginosa* (Kumar et al. 2020). Berdasarkan hasil analisis struktur

protein dan kriteria pemilihan, gen *ftsI* yang mengekod protein FtsI telah dipilih sebagai sasaran ubat untuk *P. aeruginosa*.

Kajian ini menapis 351 gen penting bakteria berdasarkan empat kriteria utama iaitu kemandirian bakteria, pemuliharaan dalam strain bakteria, tahap homologi dengan gen manusia, dan lokasi subselular. Daripada jumlah ini, hanya enam gen utama dipilih kerana memenuhi semua kriteria dan mempunyai potensi sebagai sasaran pembangunan antibiotik. Dalam konteks ini, SecDF terletak dalam membran sitoplasma dengan skor penempatannya adalah 10. Analisis struktur 3D menggunakan AlphaFold dan plot Ramachandran menunjukkan bahawa protein membran eksport SecDF (Jadual 1) adalah sasaran terbaik kerana analisis plot Ramachandran menunjukkan sebanyak 95.1% dan skor pTM sebanyak 0.78. Selain itu, plot Ramachandran dengan lebih daripada 90% residu dalam kawasan digemari menunjukkan bahawa model tersebut hampir menyerupai struktur yang ditentukan secara eksperimen, yang menunjukkan ketepatan dan kebolehpercayaan ramalan tersebut. Skor pTM yang tinggi menunjukkan bahawa model tersebut kemungkinan besar stabil, dengan konformasi 3D yang tepat menggambarkan struktur sebenar protein. Model tersebut mempunyai integriti struktur yang mencukupi, dengan lipatan yang betul dan pelanggaran sterik yang diminimumkan, yang kritikal untuk memastikan kaitan biologi dan fungsi protein tersebut. Selain itu, skor pTM lebih daripada 0.5 juga menunjukkan bahawa model tersebut berkemungkinan menunjukkan interaksi yang bermakna dengan molekul lain, seperti sasaran ubat. Seterusnya, penyingkiran protein membran eksport protein SecDF pada transkripsi, pengawalaturan dan translokasi telah menjejaskan pembahagian sel, mengurangkan kerintangan dan mengganggu proses pengawalaturan, lantas mencadangkan fungsi penting SecDF dalam *S. aureus* (Quiblier et al. 2011).

Jadual 1. Analisis struktur protein FtsI dan SecDF.

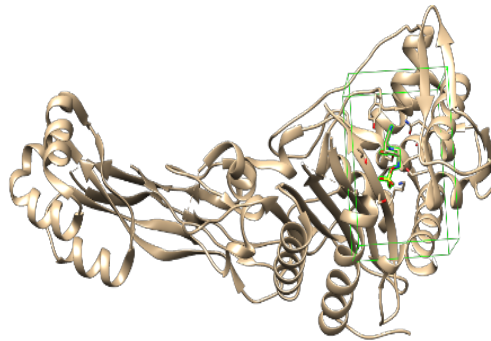
Protein	Skor pTM	Purata pLDDT	Skor plot Ramachandran	Skor Molprobit	Skor ERRAT
FtsI	0.9	90.9	93.9%	0.61	94.0109
SecDF	0.78	92.4	95.1%	-	-

3.2 Peramalan poket pengikatan pada struktur protein

Jadual 2 merujuk kepada kaviti atau poket pengikatan dengan markah DrugScore tertinggi serta tahap *druggability*. *Druggability* poket pengikatan dipengaruhi oleh ciri-ciri struktur dan fisiokimia seperti isipadu, kedalaman dan hidrofobisiti poket (Alzyoud et al. 2022; Kooistra et al. 2017). Protein FtsI turut menunjukkan kebolehan mengikat molekul yang baik. Ketepatan poket ramalan FtsI telah disahkan melalui superimposisi antara poket pengikatan ramalan bersama struktur eksperimen 7KIT (Rajah 1). Struktur 7KIT merupakan protein FtsI dengan ligan C8Y, di mana ligan tersebut ditunjukkan untuk mengikat pada protein pada poket pengikatan ramalan. Hasil ini menggambarkan bahawa poket pengikatan sebenar dan ramalan adalah sejajar. Berdasarkan kajian lepas, tapak pengikatan ligan ini dipercayai merupakan tapak aktif protein FtsI. Molekul lain seperti *zidebactam* dan *avibactam* turut dibuktikan untuk mengikat secara kovalen pada tapak yang sama (Rajavel et al. 2021). Poket pengikatan ramalan ini adalah lebih yakin untuk digunakan dalam langkah pendokkan bagi meramal konformasi pengikatan ligan pada poket pengikatan protein dengan lebih tepat.

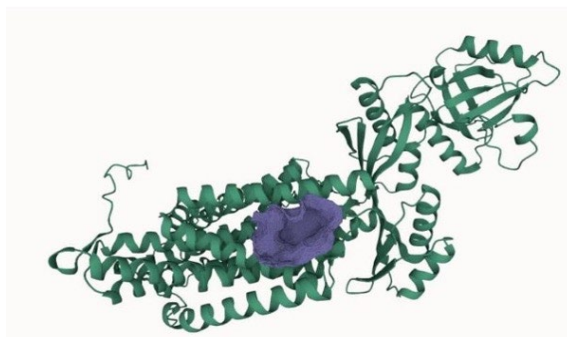
Jadual 2. Nilai DrugScore dan tahap druggability poket pengikatan ramalan struktur protein FtsI dan SecDF.

Protein	Nilai DrugScore	Druggability
FtsI	1594.00	Kuat
SecDF	3550	Kuat



Rajah 1. Superimposisi antara poket ramalan protein FtsI (kotak hijau) dan struktur 7KIT dengan ligan C8Y.

Seterusnya, sasaran dengan *druggability* yang baik cenderung untuk mempunyai tempat pengikatan yang sesuai bagi molekul ubat, yang membolehkan interaksi yang kuat dan spesifik, serta mengurangkan kesan sampingan. Hasil analisis menunjukkan bahawa nilai skor kebolegunaan dadah berbeza antara protein yang diuji, yang memberi petunjuk mengenai keupayaan pengikatan bagi setiap protein. Analisis terhadap protein membran eksport SecDF yang mempunyai skor kebolegunaan dadah tertinggi telah dilakukan untuk mengenal pasti tapak pengikatan dengan lebih lanjut. Nilai saiz kotak yang diperoleh adalah 17.5, 14.5, 19.5 dan titik pusatnya adalah 4.25, -11.75, 9.75 bagi protein membran eksport SecDF. Dengan ini ramalan poket adalah penting kerana ia membantu mengenal pasti tapak pengikatan yang berkeupayaan, atau "poket", pada protein di mana molekul kecil, seperti ubat, boleh berinteraksi. Poket ini penting untuk memahami bagaimana ubat boleh mengikat protein sasaran dan fungsinya. Peramalan poket pengikat protein adalah sangat penting untuk penemuan dan reka bentuk ubat. Rajah 2 menunjukkan ramalan poket protein bagi protein SecDF.



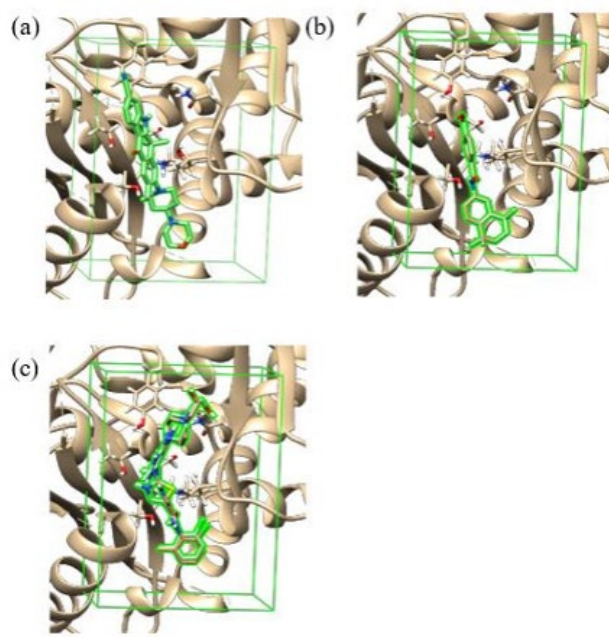
Rajah 2. Ramalan poket protein bagi protein membran eksport SecDF.

3.3 Pendokkan molekul ubat pada protein sasaran

Analisis Drug ReposER mengenal pasti molekul ubat yang berpotensi mengikat FtsI dan SecDF. Corak yang serupa antara tapak pengikatan ubat diketahui dengan tapak pada struktur protein sasaran mencadangkan bahawa ubat yang sama turut mempunyai potensi untuk mengikat protein tersebut. Kriteria pemilihan ubat adalah ubat yang mengikat pada tapak dengan padanan lebih dari 3 residu asid amino. Ini adalah untuk memastikan pengikatan ubat yang lebih spesifik terhadap protein bagi mengoptimumkan kesan ubat terhadap bakteria.

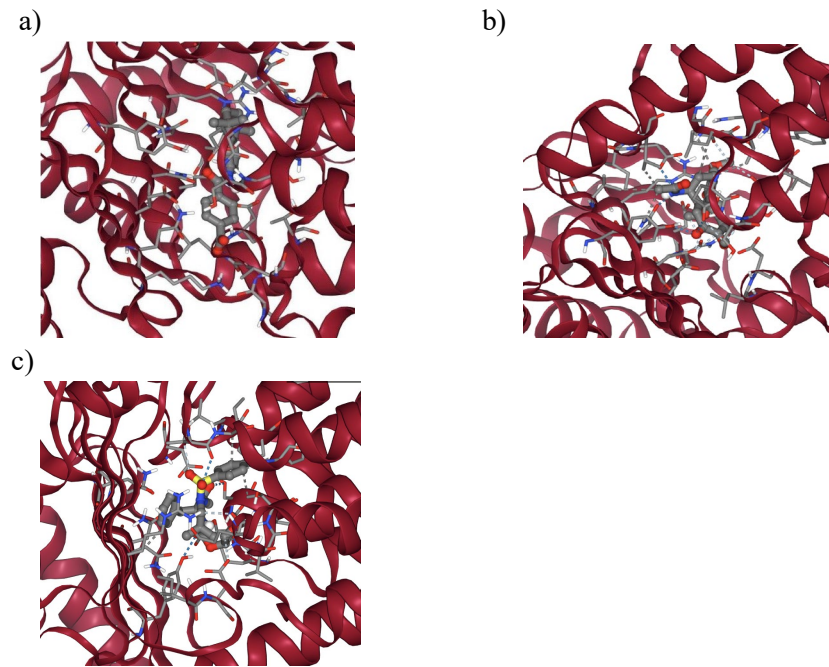
Bagi *P. aeruginosa*, terdapat 11 ubat yang telah dikenalpasti mengikat pada corak residu asid amino yang sama dengan residu pada protein FtsI. Keafinan ubat terhadap protein dinilai berdasarkan skor pendokkan, dengan nilai skor yang lebih rendah menggambarkan keafinan pengikatan yang lebih kuat pada protein. Daripada analisis pendokkan, dijangkakan bahawa molekul ubat yang mempunyai keafinan pengikatan tertinggi terhadap protein FtsI adalah *alectinib* (-9.6 kcal/mol), diikuti dengan *tamibarotene* (-8.8 kcal/mol) dan *dasatinib* (-8.1 kcal/mol). Hasil ini telah dibandingkan dengan skor

yang diperoleh apabila ligan asal C8Y didokkan semula pada FtsI, iaitu -6.8 kcal/mol. Maka, didapati bahawa ubat-ubat ini mengikat dengan keafinan yang lebih kuat berbanding pengikatan ligan asal. Mod pengikatan ketiga-tiga ubat ini dengan konformasi terbaik telah ditunjukkan dalam Rajah 3.



Rajah 3. Konformasi pendokkan terbaik antara protein FtsI dan ubat dengan keafinan pengikatan tertinggi iaitu (a) *alectinib*, (b) *tamibarotene*, dan (c) *dasatinib*. Molekul ubat ditandakan dengan warna hijau. Kotak hijau mewakili poket pengikatan ramalan.

Bagi *S. aureus*, terdapat 11 ubat yang telah dikenalpasti mengikat pada corak residu asid amino yang sama dengan residu pada protein SecDF. Berdasarkan analisis pemetaan molekul menggunakan perisian Autodock dan Autodock Vina, *tamibarotene* menunjukkan afiniti pengikatan tertinggi dengan -8.2 kcal/mol, diikuti oleh *amprenavir* (-6.4 kcal/mol) dan *colchicine* (-5.2 kcal/mol). Ketiga-tiga dadah ini dipilih kerana nilai afiniti pengikatannya yang menunjukkan potensi tinggi sebagai agen anti *S. aureus*. Rajah 4 menunjukkan konformasi pendokan terbaik antara SecDF dan ubat dengan keafinan pengikatan tertinggi. Walaupun *alectinib*, *tamibarotene*, *dasatinib*, *amprenavir* dan *colchicine* tidak digunakan sebagai preskripsi antibiotik, namun ubat bukan antibiotik masih berpotensi mempunyai aktiviti anti-bakteria pada dos tertentu (Maier et al. 2018). Pemahaman mekanisme ubat adalah penting untuk mengkaji bagaimana ubat yang dicadangkan ini mungkin bertindak ke atas bakteria. Faktor lain dalam interaksi antara kompleks sasaran-ligan seperti interaksi antara atom polar dan bukan polar, cincin aromatik dan atom karbon tidak tepu turut mempengaruhi pengikatan ubat pada sasaran dan hendaklah dikaji dengan lebih lanjut dalam penilaian semula ubat (Kenny 2022).



Rajah 4. Konformasi pendokkan terbaik antara protein SecDF dan ubat dengan keaifinan pengikatan tertinggi iaitu (a) *tamibarotene*, (b) *colchicine*, dan (c) *amprenavir*.

3.4 Kesesuaian penggunaan ubat secara sistemik dan potensi kesan sampingan

Walaupun *alectinib*, *tamibarotene*, *dasatinib*, *amprenavir* dan *colchicine* menunjukkan keaifinan yang tinggi terhadap protein-protein sasaran FtsI dan SecDF, penggunaan ubat-ubatan ini secara sistemik perlu dipertimbangkan dengan berhati-hati. *Alectinib* dan *dasatinib* adalah ubat anti-kanser yang diluluskan dan sering diguna untuk rawatan leukemia atau kanser paru-paru. Kedua-dua ubat ini boleh menyebabkan kesan sampingan seperti hepatotoksikiti jika digunakan dalam dos yang tinggi (Herden et al. 2018; Lindauer et al. 2018). *Tamibarotene* pula retinoid sintetik yang digunakan untuk rawatan leukemia promielositik akut, yang boleh menyebabkan kekeringan kulit dan membran mukosa (Iyer et al. 2023). *Colchicine* pula lazimnya digunakan untuk rawatan gout dan mempunyai kesan toksik terhadap sistem gastrousus dan hematopoietik pada dos yang tinggi (Angelidis et al. 2018). Walaupun merupakan sejenis anti-retrovirus yang digunakan secara sistemik, *amprenavir* boleh menyebabkan reaksi alahan (Conway et al. 2000). Oleh itu, walaupun ubat-ubatan ini diramalkan mempunyai potensi sebagai perencat protein-protein sasaran, namun penggunaan ubat-ubatan ini secara sistemik sebagai rawatan alternatif memerlukan penilaian lanjut dari segi profil farmakokinetik, ketersediaan biologi dan dos rawatan yang selamat.

4. Kesimpulan

Kajian ini yang menggunakan pendekatan *in silico* telah menggariskan potensi penilaian semula ubat sebagai strategi yang cekap untuk mengenal pasti rawatan alternatif bagi jangkitan *P. aeruginosa* dan *S. aureus* yang rintang ubat. Dengan mengenal pasti FtsI dan SecDF sebagai sasaran utama dan mencadangkan *alectinib*, *tamibarotene*, *dasatinib*, *amprenavir*, dan *colchicine* sebagai agen terapeutik yang berpotensi, kajian ini menyediakan asas yang penting untuk penyelidikan pada masa depan. Kajian *in vitro* dan *in vivo* selanjutnya adalah penting untuk mengesahkan penemuan ini, untuk memahami mekanisme tindakan ubat yang dicadangkan terhadap sasaran bakteria, dan akhirnya menterjemahkan penemuan ini kepada terapi antimikrob alternatif yang berkesan. Penyelidikan ini menyumbang kepada pemahaman yang semakin meningkat tentang bagaimana ubat-ubatan yang sedia ada boleh digunakan semula secara strategik untuk menangani ancaman kesihatan global yang kritikal akibat kerintangan antimikrob.

Penghargaan

Penghargaan diberikan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia di atas pembiayaan projek melalui geran DPKP-2024-002. Penghargaan juga diberikan kepada Fakulti Sains dan Teknologi, UKM atas kemudahan ruang, peruntukan dan peralatan yang disediakan sepanjang kajian ini.

Rujukan

- Alzyoud, L., Ghattas, M.A. & Atatreh, N. 2022. Allosteric binding sites of the sars-cov-2 main protease: potential targets for broad-spectrum anti-coronavirus agents. *Drug Design, Development and Therapy Volume* 16: 2463–2478.
- Angelidis, C., Kotsialou, Z., Kossyvakis, C., Vrettou, A., Zacharoulis, A., Kolokathis, F., Kekeris V. & Giannopoulos. 2018. Colchinice pharmacokinetics and mechanism of action. *Current Pharmaceutical Design* 24(6): 659-663.
- Chen, W., Zhang, Y.M. & Davies, C. 2016. Penicillin-binding protein 3 is essential for growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(1):e01651-16.
- Conway, B. & Shafran, S.D. 2000. Pharmacology and clinical experience with amprenavir. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9(2): 371-382.
- Herden, M. & Waller, C.F. 2018. Alectinib. Dlm. Martens, U. (pnyt.) *Small Molecules in Oncology*. Recent Results in Cancer Research vol 211, hlm. 247-256. Springer, Cham.
- Iyer, S.G., Elias, L., Stanchina, M. & Watts, J. 2023. The treatment of acute promyelocytic leukemia in 2023: paradigm, advances, and future directions. *Frontiers in Oncology* 12: 1062524.
- Kenny, P.W. 2022. Hydrogen-Bond Donors in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 65(21): 14261–14275.
- Kooistra, A.J. & Volkamer, A. 2017. Kinase-centric computational drug development. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 197–236.
- Kourtis, A.P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E., Nadle, J., Kainer, M.A., Dumyati, G., Petit, S., Ray, S.M., Ham, D., Capers, C., Ewing, H., Coffin, N., McDonald, L.C., Jernigan, J., Cardo, D. 2019. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections - United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 68(9):214-219.
- Kumar, V., Tang, C., Bethel, C.R., Papp-Wallace, K.M., Wyatt, J., Desarbe, E., Bonomo, R.A. & van den Akker, F. 2020. Structural insights into ceftobiprole inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64(5):e00106-20.
- Li, C., Matsuda, Y., Gao, H., Hu, D., Yao X. S. and Abe, I. 2016. Biosynthesis of LL-Z1272b: discovery of a new member of NRPS-like enzymes for aryl-aldehyde formation. *Chembiochem Communications* 17(10):904–907.
- Lindauer, M. & Hochhaus, A. 2018. Dasatinib. Dlm. Martens, U. (pnyt.) *Small molecules in Hematology*. Recent Results in Cancer Research vol 212, hlm. 29-68. Springer, Cham.
- Liu, Y., Tong, Z., Shi, J., Li, R., Upton, M. & Wang, Z. 2021. Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria. *Theranostics* 11(10): 4910-4928.
- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E.E., Brochado, A.R., Fernandez, K.C., Dose, H., Mori, H., Patil, K.R., Bork, P. & Typas, A. 2018. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 555(7698): 623–628.
- Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles, A.G., Gray, A. et al. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399(10325): 629-655.
- Naeemudeen, N.M., Ghazali, N.A.N.M., Bahari, H., Ibrahim, R., Samsudin, A.D. & Jasni, A.S. 2021. Trends in antimicrobial resistance in Malaysia. *The Medical Journal of Malaysia* 76(5): 698–705.
- O'Neill, J. 2016. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*. London. HM Government and Wellcome Trust.
- Poulsen, B.E., Yang, R., Clatworthy, A.E., White, T., Osmulski, S.J., Li, L., Penaranda, C., Lander, E.S., Shores, N. & Hung, D.T. 2019. Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(20): 10072–10080.
- Quiblier, C., Zinkernagel, A.S., Schuepbach, R.A., Berger-Bachi, B. & Senn, M.M. 2011. Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. *BMC Microbiology* 11: 72.
- Rajavel, M., Kumar, V., Nguyen, H., Wyatt, J., Marshall, S.H., Papp-Wallace, K.M., 55 Deshpande, P., Bhavsar, S., Yeole, R., Bhagwat, S., Patel, M., Bonomo, R.A. & van den Akker, F. 2021. Structural characterization of diazabicyclooctane β -lactam “enhancers” in complex with penicillin-binding proteins PBP2 and PBP3 of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 12(1).

- Stokes, J.M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N.M., MacNair, C.R., French, S., Carfrae, L.A., Bloom-Ackermann, Z., Tran, V.M., Chiappino-Pepe, A., Badran, A.H., Andrews, I.W., Chory, E.J., Church, G.M., Brown, E.D., Jaakkola, T.S., Barzilay, R. & Collins, J.J. 2020. A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell* 180(4): 688-702.e13.
- Sun, D., Gao, W., Hu, H. & Zhou, S. 2022. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharmaceutica Sinica B* 12(7): 3049–3062.
- Venkateswaran, P., Vasudevan, S., David, H., Shaktivel, A., Shanmugam, K., Neelakantan, P. & Solomon, A.P. 2023. Revisiting ESKAPE pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13: 1159798.
- Wood, S.J., Kuzel, T.M. & Shafikhani, S.H. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, animal modeling, and therapeutics. *Cells* 12(1): 199.

**Pemencilan dan Pencirian Bakteriofaj terhadap Bakteria Patogen dari
Sampel Air Loji Rawatan Kumbahan UKM, Kampus Bangi**
(Isolation and Characterization of Bacteriophages against Pathogenic Bacteria from Water
Samples of UKM Sewage Treatment Plant, Bangi Campus)

Ainul Mardiah, Farisha Farahanim, Nur Neesa Athirah & Nazlina Ibrahim*

*Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600,
Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: nazlina@ukm.edu.my*

Abstrak: Keberkesanan antibiotik yang semakin menurun akibat peningkatan bakteria yang rintang terhadap antibiotik menjadi cabaran utama dalam rawatan jangkitan bakteria patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Terapi bakteriofaj muncul sebagai alternatif yang berpotensi untuk mengawal populasi bakteria ini, terutama dalam persekitaran yang tinggi risiko jangkitan. Kajian ini bertujuan untuk mencirikan bakteria perumah serta bakteriofaj yang dipencilkan daripada sampel air kumbahan di Universiti Kebangsaan Malaysia, Kampus Bangi. Pencilan bakteria dilakukan menggunakan kaedah pengayaan selektif dan dikenal pasti berdasarkan ciri morfologi koloni serta ujian biokimia. Bakteriofaj dipencilkan menggunakan kaedah agar dua lapis dan ujian titik bagi menentukan kekhususan jangkitan terhadap bakteria perumah. Hasil kajian mendapati bahawa *S. aureus* dilisis oleh bakteriofaj daripada keluarga *Herelleviridae*, manakala *Salmonella spp.* dijangkiti oleh bakteriofaj daripada keluarga *Myoviridae*, dan *P. aeruginosa* pula dilisis oleh bakteriofaj dalam order *Caudovirales*. Secara keseluruhan, kesemua bakteriofaj yang dipencil menunjukkan potensi dalam mengawal pertumbuhan bakteria patogen dari air kumbahan. Kajian ini menyokong aplikasi bakteriofaj sebagai kaedah alternatif yang berkesan dan semula jadi dalam pengawalan bakteria rintang antibiotik, sekali gus memberi implikasi penting dalam bidang kesihatan awam dan rawatan jangkitan bakteria.

Kata kunci: Kerintangan antibiotik; biokawalan; bakteria patogen; air kumbahan

Abstract: The decreasing effectiveness of antibiotics due to the rise of antibiotic-resistant bacteria poses a major challenge in treating pathogenic bacterial infections such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriophage therapy has emerged as a promising alternative for controlling the population of these bacteria, particularly in high-risk infection environments. This study aims to characterise the host bacteria and bacteriophages isolated from sewage samples at Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi Campus. Bacterial isolation was carried out using selective enrichment methods and identified based on colony morphology and biochemical tests. Bacteriophages were isolated using the double-layer agar method and spot assay to determine their specificity towards host bacteria. The findings revealed that *S. aureus* was lysed by bacteriophages from the *Herelleviridae* family, while *Salmonella spp.* were infected by bacteriophages from the *Myoviridae* family, and *P. aeruginosa* was lysed by bacteriophages classified under the *Caudovirales* order. Overall, the isolated bacteriophages demonstrated potential in controlling pathogenic bacterial growth in sewage water. This study supports the application of bacteriophages as an effective and natural alternative method for managing antibiotic-resistant bacteria, thereby providing significant implications for public health and bacterial infection treatment.

Keywords: Antibiotic resistance; biological control; pathogenic bacteria; sewage water

1. Pendahuluan

Air kumbahan merupakan habitat semula jadi bagi pelbagai mikroorganisma, termasuk bakteria patogen dan bakteriofaj (faj) yang menjangkiti bakteria secara khusus. Persekitaran ini kaya dengan nutrien yang menyokong pertumbuhan mikrob dan berpotensi menjadi lokasi strategik bagi interaksi kompleks antara mikroorganisma yang aktif. Oleh hal yang demikian, peningkatan populasi bakteria patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* dan *Pseudomonas aeruginosa* semakin membimbangkan, kerana ia boleh menyebabkan pelbagai jenis jangkitan pada manusia, daripada jangkitan ringan kepada jangkitan yang boleh mengancam nyawa. Keadaan ini menjadi lebih mencabar dengan kemunculan strain bakteria yang rintang terhadap antibiotik, yang mengurangkan keberkesanan rawatan konvensional. Contohnya, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Selain itu, *Salmonella spp.* yang membawa gen rintangan seperti *mcr* dan *bla* berpotensi menyebabkan jangkitan invasif yang sukar dirawat (Liu et al. 2016). Begitu juga dengan *P. aeruginosa*, patogen oportunistik yang sering dikaitkan dengan jangkitan nosokomial yang mampu membentuk biofilem serta kehadiran sistem efluks terhadap antibiotik, menjadikannya lebih sukar untuk dirawat. Perkara ini menimbulkan kebimbangan awam dan mendorong kepada keperluan mencari kaedah alternatif dalam menangani jangkitan bakteria rintang antibiotik.

Bakteriofaj ialah virus yang menjangkiti bakteria dan boleh ditemui dalam pelbagai persekitaran, termasuk air kumbahan (Juliet et al. 2024; Jurczak-Kurek et al. 2016). Penggunaan faj dalam mengawal bakteria rintang antibiotik semakin mendapat perhatian kerana pendekatannya yang lebih spesifik dan mesra alam berbanding antibiotik. Tidak seperti antibiotik yang memberi kesan terhadap pelbagai bakteria, bakteriofaj bertindak secara spesifik terhadap bakteria perumahannya, sekali gus mengurangkan kesan sampingan terhadap mikrobiota normal (Abedon 2011).

Kajian berkaitan bakteriofaj di Malaysia sangat kurang dan terhad walaupun potensi untuk mendapatkan pencilan baru amat tinggi. Maka kajian ini mengambil inisiatif mendapatkan pencilan bakteriofaj daripada sampel air kumbahan dari Loji Rawatan Kumbahan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Kampus Bangi. Jangkaan kajian ini dapat memencil dan mencirikan bakteriofaj yang mampu menjangkiti *S. aureus*, *Salmonella spp.*, dan *P. aeruginosa*. Pendekatan ini berpotensi untuk dijadikan sebagai salah satu alternatif untuk mengawal populasi bakteria patogen terutamanya bagi strain yang tidak lagi memberikan tindak balas yang efektif terhadap antibiotik.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Pemencilan bakteria dari sampel air kumbahan

Sebanyak tiga replikat sampel air kumbahan, masing-masing 10 mL, diambil menggunakan teknik *grab sample* dan dimasukkan ke dalam tiub Falcon steril. Kemudian, 100 μ L sampel air dikulturkan menggunakan teknik piring sebaran pada agar selektif yang berbeza iaitu agar *Mannitol Salt* (MSA), agar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD, HiMedia Laboratories), agar *Salmonella-Shigella* (SSA, Oxoid, UK) serta agar Cetrimide (Oxoid, UK). Kesemua piring dieram pada suhu 37°C semalaman. Proses pengkulturan diulang beberapa kali sehingga koloni tulen tunggal diperoleh.

Koloni bakteria yang diperoleh dikenalpasti berdasarkan ciri morfologi seperti warna, bentuk, dan tekstur pada media selektif. Pewarnaan Gram dilakukan bagi membezakan antara bakteria Gram-positif (*S. aureus*) dan Gram-negatif (*Salmonella*, *P. aeruginosa*). Pengenalpastian lanjut dijalankan melalui ujian biokimia dengan beberapa pengubahsuaian. *S. aureus* dikenalpasti melalui ujian katalase dan fermentasi manitol, yang ditunjukkan oleh perubahan warna pada agar MSA. *Salmonella spp.* dan *P. aeruginosa* disahkan melalui ujian katalase, *SIM* (*Sulfide, Indole, Motility*), dan *TSI* (*Triple Sugar Iron*). Selain itu, ujian oksidase bagi *P. aeruginosa* turut dilakukan untuk membezakannya dengan bakteria dalam genus *Enterobacteriaceae*.

2.2 Ujian kepekaan antibiotik

Ujian kepekaan dilakukan berdasarkan kaedah yang digunakan oleh Gurunget al. (2020) dengan pengubahsuaian mengikut garis panduan oleh Institut Piawai Klinikal dan Makmal 2020 (CLSI 2020) Ketiga-tiga bakteria sasaran yang dipencil dicairkan sehingga mencapai kekeruhan piawai 0.5 McFarland dan disebar pada agar *Mueller-Hinton* menggunakan kapas (*cotton swab*) yang steril.

Cakera antibiotik diletakkan pada permukaan agar dengan menggunakan forsep yang steril. Kemudian, agar tersebut dieram dalam inkubator pada 37°C selama 18 jam. Selain itu, ujian kepekaan antibiotik turut dijalankan ke atas *S. aureus* UKMCC1016 dan *P. aeruginosa* UKMCC1011 yang diperoleh daripada Unit Histologi dan Koleksi Kultur (UKMCC) Fakulti Sains dan Teknologi, UKM menggunakan prosedur yang sama. Zon perencatan dicerap selepas pengeraman semalaman dan diukur menggunakan pembaris.

2.3 Pemencilan bakteriofaj dari air kumbahan

Sampel air kumbahan diperoleh dari tangki, kolam dan saluran air kumbahan UKM, Kampus Bangi. Faj diasingkan daripada sampel air kumbahan dengan menggunakan kaedah agar dua lapisan konvensional seperti yang diterangkan oleh Wang et al. (2019) dengan sedikit ubahsuaian. Sampel air kumbahan sebanyak 10 mL dicampurkan dengan 10 mL kaldu Luria-Bertani yang diinokulasi dengan koloni tunggal bakteria perumah dan dieram semalaman pada 37°C dengan guncangan 180 rpm. Sebanyak 1 mL hasil eraman diempar pada 8,000 rpm (Beckman Coulter Microcentrifuge 16, FX241.5P Rotor) selama 5 minit pada suhu bilik dan supernatan ditapis menggunakan membran 0.22 µm untuk membuang sisa bakteria. Alikuot 5 µL daripada ampaijan faj ini, bersama-sama dengan 100 µL kultur bakteria perumah iaitu *S. aureus*, *Salmonella* spp., dan *P. aeruginosa* yang telah dikultur dalam kaldu Luria-Bertani sehingga fasa log pertengahan ($OD_{600} = 0.4 - 0.5$) dicampurkan dengan 5 mL agar atas lembut (lapisan atas 0.75 %, 0.75 per 100ml) dan dituangkan ke atas piring agar LB yang dipadatkan (lapisan bawah 1.5 %, 1.5 per 100ml). Piring dieramkan semalaman pada 37 °C untuk proses pembentukan plak berlaku.

2.4 Penyaringan bakteriofaj

Kaedah yang digunakan adalah seperti yang diterangkan oleh Artawinata et al. (2023) serta Sada et al. (2024) dengan sedikit ubahsuaian. Faj yang menghasilkan plak yang jelas dipilih dan diasingkan dari permukaan atas agar dengan menusuk plak jernih secara berhati-hati menggunakan hujung pipet steril. Faj ini dicampurkan ke dalam 20 mL kaldu LB dan dipipet beberapa kali untuk melepaskan zarah bakteriofaj. Kultur bakteria perumah ditambah ke dalam kaldu tersebut untuk memperkayakan faj. Campuran kemudian dieram pada 37 °C semalaman. Selepas proses pengeraman, campuran diempar pada kelajuan 8,000 rpm selama 5 minit (Beckman Coulter Microcentrifuge 16, FX241.5P Rotor) dan supernatan terhasil dituras menggunakan penuras bersaiz liang 0.22 µm untuk mendapatkan lisat faj yang diperkaya. Lisat faj kemudian diuji dengan menggunakan ujian titik. Sebanyak 100 µL kultur bakteria perumah yang telah mencapai fasa log pertengahan ($OD_{600} = 0.4 - 0.5$) ditambahkan ke dalam 5 mL agar atas lembut dan disebarkan secara rata ke permukaan piring agar LB serta dibiarkan kering. Sebanyak 5 µL lisat faj dititiskan ke atas permukaan piring agar dan piring dibiarkan kering sebelum dieram semalaman pada 37 °C. Proses ini diulang sebanyak tiga kali, dan faj yang tulen kemudiannya dikumpul dan disimpan pada 4 °C dalam penimbal SM (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris HCl (pH 7.5)) untuk analisis seterusnya.

2.5 Penentuan julat perumah faj

Ujian titik digunakan untuk menentukan julat perumah bagi setiap faj terpencil seperti kaedah yang diterangkan oleh Majdani et al. (2022). Faj yang dipencilkan bagi setiap bakteria diuji ke atas pencilan asalnya serta bakteria daripada UKMCC untuk menentukan julat perumahnya. Bagi faj yang dipencilkan terhadap *P. aeruginosa*, ujian julat perumah dijalankan menggunakan pencilan *P. aeruginosa* UKMCC1011. Faj yang dipencilkan terhadap *S. aureus* pula diuji menggunakan pencilan *S. aureus* UKMCC 1016. Sementara itu, bagi faj yang dipencilkan terhadap *Salmonella* spp., julat perumahnya ditentukan menggunakan pencilan *P. aeruginosa* dan *S. aureus* kerana pencilan *Salmonella* spp. daripada unit koleksi tidak tersedia. Dalam setiap ujian, sebanyak 100 µL kultur bakteria ($OD_{600} = 0.4 - 0.5$) dicampurkan dengan 5 mL agar LB lapisan atas 0.75% dan dituangkan ke atas agar LB lapisan bawah. Setelah dibiarkan kering, 5 µL lisat faj dititis ke atas permukaan agar tersebut. Piring Petri dieram semalaman pada 37°C dan pembentukan plak pada permukaan piring dinilai dengan memeriksa kemunculan zon perencatan.

2.6 Ujian kepekaan pH

Ujian kestabilan bakteriofaj pada pH yang berbeza dijalankan menggunakan kaedah daripada Juliet et al. (2024) dengan pengubahsuaian. Ujian ini dijalankan menggunakan penimbal SM dengan pH yang berbeza diantara pH 3 hingga pH 11. Sebanyak 100 μL lisat bakteriofaj ditambahkan kepada 900 μL penimbal SM dengan nilai pH akhir 3, 5, 7, 9, dan 11 masing-masing. Sampel dieram selama satu jam pada suhu 37°C. Selepas satu jam, ujian plak dijalankan dan dieram pada suhu 37°C semalaman. Sebanyak tiga replikat digunakan bagi setiap pH yang diuji.

2.7 Pencirian bakteriofaj menggunakan mikroskop transmisi elektron (TEM)

Kaedah bagi pencirian bakteriofaj menggunakan TEM berdasarkan Wang et. al (2019) dengan pengubahsuaian. Faj yang telah ditulenkan, dimasukkan ke dalam 200 μL penimbal SM dan diempar pada 10,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) selama dua jam pada suhu 4°C untuk meningkatkan kepekatan faj. Supernatan dibuang tanpa mengganggu hasil pelet tersebut. Hasil pelet yang mengandungi faj dititiskan pada permukaan grid kuprum (*copper grid*) dan dibiarkan kering selama 5 minit. Kemudian, faj tersebut diwarnakan secara negatif dengan asid fosfotungstik 2% dalam kegelapan dan dibiarkan kering selama 30 minit. Morfologi faj diperiksa dengan mikroskop elektron penembusan pada 80 kV.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Bakteria yang di kenalpasti daripada sampel air

Bagi mengenalpasti bakteria sasaran, pengkulturan dilakukan pada pelbagai agar selektif, diikuti dengan pewarnaan Gram dan ujian biokimia. Hasil pengkulturan menunjukkan pembentukan koloni berwarna kuning pada MSA, koloni berwarna putih dan hijau di atas agar sentrimida serta campuran koloni tidak berwarna, berwarna merah jambu, merah dan hitam terhasil di atas SSA. Koloni yang dijangka sebagai *S. aureus*, *Salmonella* dan *P. aeruginosa* disubkultur untuk memperolehi koloni tunggal yang tulen. *S. aureus* diciri melalui pembentukan koloni bulat, cembung, dan licin berwarna kuning keemasan pada MSA, hasil daripada fermentasi manitol yang menyebabkan perubahan warna medium. Berdasarkan Khudair et al. (2018), *Salmonella* akan menghasilkan koloni yang bulat, licin, cembung dengan warna hitam pada bahagian tengah pada SSA serta menghasilkan koloni berwarna merah dengan warna hitam dibahagian tengah pada agar XLD. Sementara itu, *P. aeruginosa* menghasilkan koloni berwarna hijau kebiruan di atas agar sentrimida disebabkan penghasilan pigmen piosianin yang merupakan ciri khas bakteria ini.

Seterusnya, pewarnaan Gram dilakukan bagi membezakan jenis bakteria berdasarkan ciri dinding selnya. Hasil pemerhatian menunjukkan *S. aureus* ialah bakteria Gram-positif berbentuk kokus dan tersusun dalam kelompok, manakala *Salmonella* dan *P. aeruginosa* ialah bakteria Gram-negatif berbentuk rod. Pengesahan lanjut dijalankan melalui ujian biokimia dimana *S. aureus* dikenal pasti melalui ujian katalase yang menunjukkan hasil positif, serta fermentasi manitol pada MSA yang menyebabkan medium bertukar menjadi kuning. *Salmonella* pula diuji menggunakan ujian katalase, SIM dan TSI. Hasil menunjukkan reaksi positif bagi ujian katalase dan SIM, serta penghasilan gas hidrogen sulfida (H_2S) yang menyebabkan medium SIM menjadi hitam. Ujian TSI bagi *Salmonella* menunjukkan reaksi alkali/asid (K/A) dengan penghasilan H_2S , ditunjukkan oleh kehadiran mendakan hitam pada dasar medium. Sementara itu, *P. aeruginosa* diuji menggunakan ujian katalase, oksidase, motiliti, dan TSI. Hasilnya menunjukkan reaksi positif bagi ujian katalase dan oksidase, serta pertumbuhan bakteria yang tersebar di seluruh medium SIM, menandakan sifat motilnya. TSI menunjukkan reaksi alkali/alkali (K/K) tanpa penghasilan gas atau H_2S , menunjukkan *P. aeruginosa* tidak dapat memfermentasi glukosa, laktosa, atau sukrosa. Gabungan hasil morfologi koloni, pewarnaan Gram, dan ujian biokimia ini mengesahkan kehadiran *S. aureus*, *Salmonella*, dan *P. aeruginosa* dalam sampel air kumbahan yang dikaji.

3.2 Kepekaan Antibiotik Pencilan Bakteria

Kerintangan pencilan *S. aureus*, *Salmonella* dan *P. aeruginosa* dari sampel kumbahan serta strain *S. aureus* UKMCC1016 dan *P. aeruginosa* UKMCC1011 terhadap antibiotik ditentukan. Jadual 1 menunjukkan ukuran diameter (mm) zon perencatan dan dibandingkan dengan jadual piawai iaitu daripada CLSI untuk menentukan tahap kepekaan setiap pencilan terhadap antibiotik yang diuji. Ampisilin berkesan terhadap *Salmonella* dengan pembentukan zon perencatan 23 mm. Namun, *P. aeruginosa* (P1 dan P2) menunjukkan rintangan terhadap antibiotik ini. Ciprofloxacin berkesan terhadap *S. aureus* (A1 dan A2) serta *P. aeruginosa* (P1 dan P2), tetapi hanya separa berkesan terhadap *Salmonella*. Kloramfenikol yang hanya diuji pada *Salmonella* menunjukkan sensitiviti penuh. Meropenem didapati sebagai antibiotik paling berkesan, di mana semua bakteria yang diuji menunjukkan sensitiviti penuh terhadap antibiotik ini. Sebaliknya, Penisilin P-10 pula menunjukkan 100% rintangan terhadap *S. aureus* (A1 dan A2) serta *P. aeruginosa* (P1 dan P2). Streptomisin juga menunjukkan 100% rintangan terhadap *Salmonella* dan *P. aeruginosa*. Tetrasiklin menunjukkan sensitiviti sebanyak 20% terhadap *S. aureus* (A2), manakala selebihnya (80%) adalah rintang terhadap *S. aureus* (A1), *Salmonella*, dan *P. aeruginosa* (P1 dan P2). Kanamisin, yang hanya diuji terhadap *S. aureus*, menunjukkan 100% sensitiviti terhadap kedua-dua pencilan (A1 dan A2).

Jadual 1. Diameter zon perencatan cakera antibiotik bagi bakteria

Cakera antibiotik	A1	A2	S	P1	P2
Ampisilin (10 µg)	X	X	23 mm (S)	(R)	(R)
Ciprofloxacin (5 µg)	23 mm (S)	24 mm (S)	28 mm (I)	30 mm (S)	28 mm (S)
Kloramfenikol (30 µg)	X	X	23 mm (S)	X	X
Meropenem (10 µg)	36 mm (S)	37 mm (S)	32 mm (S)	30 mm (S)	31 mm (S)
Penisilin P-10	9 mm (R)	25 mm (R)	X	(R)	(R)
Streptomisin (10 µg)	X	X	11 mm (R)	8 mm (I)	14 mm (I)
Tetrasiklin (30 µg)	12 mm (R)	25 mm (S)	14 mm (I)	9 mm (I)	10 mm (I)
Kanamisin (30mcg)	18 mm (S)	22 mm (S)	X	X	X

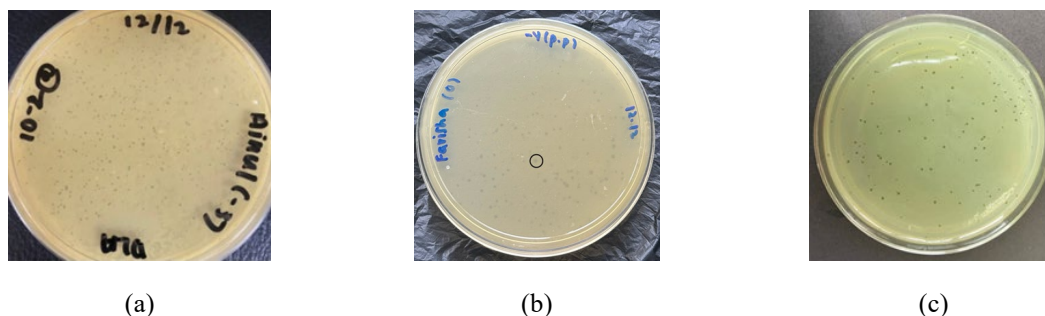
A1: *S. aureus* pencilan; A2: *S. aureus* UKMCC1016; S: *Salmonella*.; P1: *P. aeruginosa* pencilan; P2: *Pseudomonas* UKMCC1011

R: Rintang; S: Sensitif; I: Separa rintang; X: Tidak digunakan

S. aureus sensitif terhadap kanamisin, menunjukkan bahawa antibiotik ini berkesan dalam mengurangkan populasi bakteria tersebut dan dapat mengurangkan kes jangkitan yang disebabkan oleh *S. aureus*. Ini juga menandakan bahawa pencilan *S. aureus* yang diuji tidak mempunyai mekanisme kerintangan terhadap kanamisin. Kepekaan *Salmonella* terhadap ampisilin, kloramfenikol dan meropenem menunjukkan bahawa antibiotik ini masih berkesan. Namun, penggunaan perlu dipantau kerana risiko kesan sampingan dan kemunculan rintangan. *P. aeruginosa* menunjukkan sensitiviti terhadap ciprofloxacin dan meropenem, menjadikan kedua-dua antibiotik ini antara pilihan utama dalam rawatan jangkitan yang disebabkan oleh bakteria ini. Ciprofloxacin bertindak menghalang enzim DNA girase dan topoisomerase IV menyebabkan kesan bakterisid (Rehman et al. 2019). Meropenem pula mengganggu sintesis dinding sel dengan mengikat pada protein pengikat penisilin seterusnya menyebabkan lisis bakteria (Baldwin et al. 2008). Keputusan ujian kepekaan menunjukkan variasi tindak balas bakteria terhadap antibiotik yang diuji serta kepentingan pemilihan antibiotik yang sesuai berdasarkan profil kepekaan setiap patogen.

3.3 Pemencilan Bakteriofaj dari air kumbahan

Pemencilan bakteriofaj dilakukan dengan menggunakan sampel air dari Loji Rawatan Kumbahan UKM yang dikumpulkan dari tiga lokasi berbeza iaitu kawasan tangki, kolam dan saluran air kumbahan. Sampel ini diuji terhadap bakteria sasaran menggunakan kaedah dua lapisan konvensional untuk mengenal pasti kehadiran bakteriofaj yang berpotensi menjangkiti bakteria perumah. Dalam kajian ini, bakteriofaj yang berjaya dipencilkan ialah PP1 yang menjangkiti *S. aureus*, PS-1 yang menjangkiti *Salmonella* dan H yang menjangkiti *P. aeruginosa*, seperti ditunjukkan dalam Rajah 1.



Rajah 1. Pemencilan bakteriofaj terhadap bakteria perumah masing-masing. (a) PP1; (b) PS-1; (c) H.

Menariknya, bakteriofaj PP1 dan PS-1 masing-masing dipencil dari saluran air kumbahan yang dipenuhi sisa buangan dan sampah sarap. PP1, yang menjangkiti *S. aureus*, ditemui dalam persekitaran ini, mencerminkan kehadiran bakteria Gram-positif seperti *S. aureus*. Sementara itu, PS-1, yang menjangkiti *Salmonella*, diperoleh dari kawasan tersebut yang membawa air buangan dari saluran gastrousus manusia, menjadikannya habitat yang sesuai untuk pertumbuhan *Salmonella*. Sementara itu, bagi faj H yang menjangkiti *P. aeruginosa* diperolehi dari kolam kumbahan yang menyediakan persekitaran lembap dan kaya dengan nutrien, sesuai untuk bakteria aerobik seperti *P. aeruginosa* yang sering ditemui dalam air sisa dan persekitaran akuatik.

Ketiga-tiga faj yang diperoleh menghasilkan plak kecil dan jelas, menunjukkan kehadiran faj bersifat litik yang menyebabkan lisis bakteria perumah secara langsung (Jurczak-Kurek et al. 2016). Menurut Stent (1963), diameter plak dipengaruhi oleh bakteria perumah, sifat bakteriofaj itu sendiri, dan keadaan pengeraman. Morfologi plak yang jernih menunjukkan bahawa faj yang dipencilkan berpotensi tinggi untuk melisis pencilan bakteria perumah. Pembentukan plak merupakan hasil jangkitan bakteriofaj terhadap bakteria, yang dipengaruhi oleh fasa pertumbuhan bakteria perumah (Glonti et al. 2022). Secara amnya, jangkitan bakteriofaj yang paling optimum berlaku ketika bakteria berada dalam fasa eksponen, di mana bakteria membahagi dengan pesat dan berada dalam keadaan metabolik yang aktif, menjadikannya lebih sensitif terhadap jangkitan bakteriofaj (Abelson et al. 1966).

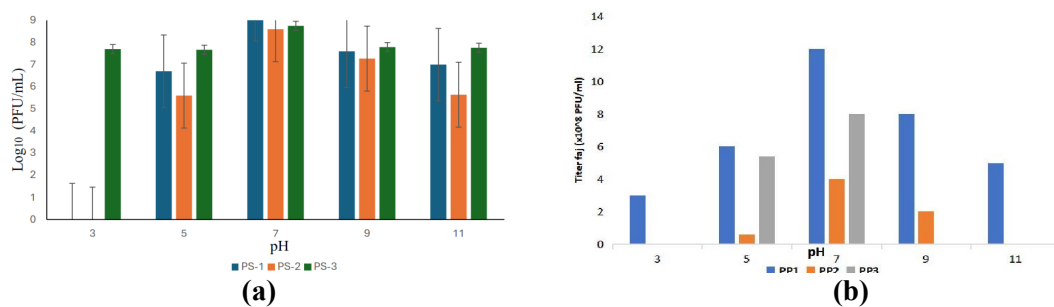
3.4 Penentuan julat perumah faj

Kaedah ujian titik telah dijalankan bagi menentukan julat perumah setiap bakteriofaj yang dipencilkan. Hasil ujian menunjukkan bahawa bakteriofaj yang dipencilkan daripada *S. aureus* hanya mampu melisis *S. aureus* UKMCC 1016. Bakteriofaj PS-1 yang dipencilkan daripada *Salmonella* pula didapati mampu melisis pencilan *P. aeruginosa* tetapi tidak kepada pencilan *S. aureus*. Ini menunjukkan bahawa faj PS-1 mempunyai julat perumah yang terhad kepada bakteria *Salmonella* dan *P. aeruginosa* dari pencilan Loji Rawatan Kumbahan UKM, serta tidak berupaya melisis bakteria Gram-positif seperti *S. aureus*. Sementara itu, bakteriofaj H yang dipencilkan daripada *P. aeruginosa* hanya mampu melisis *P. aeruginosa* UKMCC1011. Hal ini menunjukkan bahawa bakteriofaj yang dipencilkan mempunyai julat perumah yang berbeza-beza, bergantung kepada bakteria perumah asalnya.

Keputusan ini selari dengan sifat umum bakteriofaj yang kebiasaannya menunjukkan kekhususan yang tinggi terhadap bakteria perumah asalnya (Warriner et al. 2011). Walaupun begitu, terdapat bakteriofaj yang boleh menjangkiti bakteria dari spesies atau genus yang berbeza, seperti yang diperhatikan pada PS-1 yang mampu melisis pencilan *P. aeruginosa* walaupun berasal daripada *Salmonella* (Ross et al. 2016). Selain itu, kemungkinan keputusan positif palsu tidak boleh diabaikan, kerana lisis sel bakteria boleh berlaku akibat faktor lain seperti endolisin atau bakteriosin yang terkandung dalam stok bakteriofaj (Abedon 2011). Hal ini menyebabkan lisis sel bakteria berlaku tanpa jangkitan daripada bakteriofaj (Ross et al. 2016). Ujian titik juga mempunyai keterbatasan, di mana kepekatan tinggi bakteriofaj dalam satu kawasan boleh menyebabkan kesan lisis yang lebih ketara, yang mungkin tidak sepenuhnya mencerminkan keupayaan sebenar faj dalam keadaan perumah yang lebih cair atau secara semula jadi. Oleh itu, kajian lanjut seperti ujian kecekapan plak (*Efficiency of Plating*, EOP) atau ujian genomik boleh membantu dalam mengenal pasti dengan lebih tepat julat perumah bakteriofaj yang dipencilkan.

3.5 Ujian Kepekaan pH

Ujian terhadap pH yang berbeza dijalankan untuk melihat kestabilan bakteriofaj pencilan dengan menentukan tahap kebolehhangkitan berdasarkan titer pembentukan plak. Hasil menunjukkan variasi dalam kestabilan bagi ketiga-tiga sampel bakteriofaj merentas julat pH 3 hingga pH 11. Bakteriofaj PP1 yang menjangkiti *S. aureus* mengekalkan aktivitinya pada pH 3, 5, 7, 9, dan 11, menunjukkan keupayaan untuk bertahan dalam persekitaran berasid, neutral, dan beralkali (Rajah 2a). Bakteriofaj PS-1 yang menjangkiti *Salmonella* pula menunjukkan ketahanan dalam julat pH 5 hingga pH 9 tetapi mengalami penyahaktifan sepenuhnya pada pH 3 (Rajah 2b). Aktiviti bakteriofaj ini berkurang sedikit pada pH 9, manakala pada pH 11, pengurangan yang lebih ketara diperhatikan berbanding pH 9. Sementara itu, bakteriofaj H yang menjangkiti *P. aeruginosa* hanya mengekalkan keupayaan jangkitan dalam keadaan neutral (pH 7) dan tidak menunjukkan pembentukan plak pada pH lain.



Rajah 2. Kestabilan jangkitan faj *Salmonella* (a) dan *Escherichia coli* (b) pada pH berbeza.

Keputusan ini sejajar dengan kajian terdahulu yang melaporkan bahawa pH berasid boleh menyahaktifkan protein kapsid bakteriofaj, mengakibatkan kehilangan kebolehhangkitan akibat denaturasi protein virion (Hazem 2002). Kajian terdahulu juga mendapati bahawa bakteriofaj seperti T7 lebih stabil dalam persekitaran neutral tetapi mengalami penurunan titer apabila berada di luar julat ini (Kerby et al. 1949).

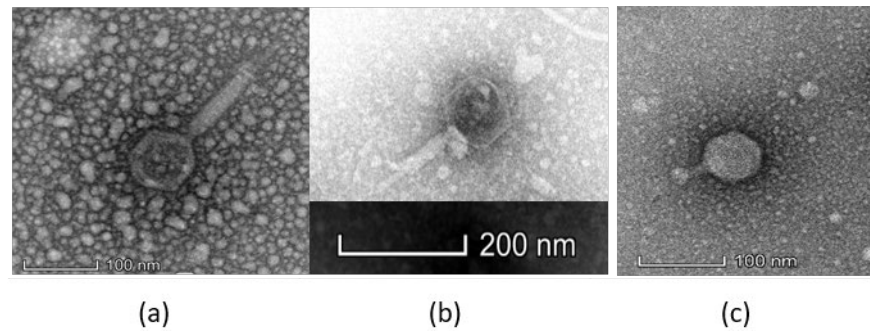
Secara keseluruhan, bakteriofaj PP1 mempunyai kestabilan paling tinggi merentas pelbagai keadaan pH, manakala PS-1 menunjukkan kestabilan sederhana tetapi aktivitinya berkurang dalam pH yang lebih ekstrem. Sebaliknya, bakteriofaj H adalah yang paling sensitif terhadap perubahan pH, dengan kestabilan hanya pada pH neutral.

3.6 Pencirian bakteriofaj menggunakan mikroskop transmisi elektron (TEM)

Pemerhatian melalui TEM terhadap sampel bakteriofaj yang berjaya dipencilkan menunjukkan variasi morfologi bergantung kepada bakteria perumah masing-masing. Bagi *S. aureus* (PP1), bakteriofaj yang diperoleh mempunyai ciri morfologi yang menyerupai keluarga *Herelleviridae* (Rajah 3a). Virus daripada keluarga ini mempunyai struktur kepala ikosahedral tanpa sampul (hanya terdiri daripada kapsid) serta ekor panjang. Bakteriofaj PP1 memiliki kepala berdiameter 81.48 nm, ekor sepanjang 111.11 nm, dan tapak ekor selebar 48.15 nm.

Bagi *Salmonella* (PS-1), bakteriofaj yang diperoleh menunjukkan ciri yang menyerupai keluarga *Myoviridae*, dengan kepala berbentuk ikosahedral dan ekor kontraktile (Rajah 3b). Kehadiran ekor kontraktile ini membolehkan bakteriofaj menembusi dinding sel *Salmonella* dengan lebih efektif untuk menyuntik bahan genetiknya. Diameter kepala bakteriofaj PS-1 ialah 92.63 nm, manakala panjang ekornya berada dalam julat 123 nm hingga 138 nm.

Sementara itu, bakteriofaj yang dipencilkan bagi *P. aeruginosa* (H) mempunyai kepala ikosahedra dengan ekor pendek (Rajah 3c). Diameter kepala bakteriofaj H dianggarkan 123.08 nm, manakala panjang ekornya ialah 76.92 nm. Berdasarkan ciri morfologi ini, bakteriofaj H diklasifikasi dalam order *Caudovirales*.



Rajah 3. Mikrograf TEM bakteriofaj yang dipencilkan dari sampel air kumbahan. (a) PP1 yang menjangkiti *S. aureus*. (b) PS-1 yang menjangkiti *Salmonella* (c) H yang menjangkiti *P. aeruginosa*.

4. Kesimpulan

Kajian ini berjaya memencilkan dan mencirikan bakteria *S. aureus*, *Salmonella*, dan *P. aeruginosa* serta bakteriofaj yang menjangkiti bakteria perumah daripada sampel air kumbahan Loji Rawatan Kumbahan UKM, Kampus Bangi. Hasil kajian mengesahkan kewujudan bakteria patogen ini dalam persekitaran air kumbahan serta menunjukkan tahap kerintangan yang berbeza terhadap antibiotik. Pemencilan bakteriofaj daripada sampel air kumbahan menggunakan kaedah agar dua lapisan telah menghasilkan tiga pencilan faj iaitu PP1, PS-1 dan H yang membentuk plak yang jelas, menandakan aktiviti litik terhadap bakteria perumahnya. Analisis morfologi menggunakan TEM memberikan gambaran mengenai struktur bakteriofaj yang dipencilkan sekaligus membantu dalam klasifikasinya. Dapatan ini bukan sahaja menyumbang kepada pemahaman mengenai interaksi faj-bakteria, malah boleh menjadi asas bagi kajian lanjut mengenai potensinya dalam bidang biokawalan dan ekologi mikrob.

Penghargaan

Terima kasih kepada Fakulti Sains dan Teknologi (FST) serta semua pihak yang membantu dalam kajian ini. Penghargaan khas buat staf Unit Histologi dan Koleksi Kultur, Unit Sains Biologi dan Bioteknologi, Makmal Biologi Molekul, Makmal Penyelidikan 2, Unit Mikroskop Elektron, dan Makmal iCRIM UKM atas sokongan teknikal. Tiada konflik kepentingan dilaporkan.

Rujukan

- Abedon, S.T. 2011. Lysis from without. *Bacteriophage* 1(1): 46–49.
- Abelson, J. & Thomas, C.A. 1966. The anatomy of the T5 bacteriophage DNA molecule. *Journal of Molecular Biology* 18(2): 262–288.
- Artawinata, P.C., Lorraine, S. & Waturangi, D.E. 2023. Isolation and characterization of bacteriophages from soil against food spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Scientific Reports* 13(1): 9282.
- Baldwin, C.M., Lyseng-Williamson, K.A. & Keam, S.J. 2008. Meropenem. *Drugs* 68(6): 803–838.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2020) Performance Standards for Anti-Microbial Susceptibility Testing. 30th Edition, M100. https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf
- Glonti, T. & Pirnay, J.-P. 2022. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. *Viruses* 14(7): 1490–1513.
- Gurung, R.R., Maharjan, P. & Chhetri, G.G. 2020. Antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA isolates from pediatric patients. *Future Science O* 6(4): FSO464.
- Hazem, A. 2002. Effects of temperatures, pH-values, ultra-violet light, ethanol and chloroform on the growth of isolated thermophilic *Bacillus* phages. *The New Microbiologica* 25(4): 469–476.
- Juliet, R., Loganathan, A., Neeravi, A., Bakthavatchalam, Y.D., Veeraraghavan, B., Manohar, P. & Nachimuthu, R. 2024. Characterization of *Salmonella* phage of the genus Kayfunavirus isolated from sewage infecting clinical strains of *Salmonella enterica*. *Frontiers in Microbiology* 15: 1–12.
- Jurczak-Kurek, A., Gąsior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., Narajczyk, M., Richert, M., Mieszkowska, A., Wróbel, B., Węgrzyn, G. & Węgrzyn, A. 2016. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports* 6(1): 15

- Kerby, G.P., Gowdy, R.A., Dillon, E.S., Dillon, M.L., Csáky, T.Z., Sharp, D.G. & Beard, J. W. 1949. Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*. *The Journal of Immunology* 63(1): 93–107.
- Khudair, S.A., Al-Nassir, H., Al_Nuaimi, A.J. & Al-Bazi, W. 2018. Investigation of contamination rates of beef and chicken meats and their products with food-borne *Salmonella* spp and antibiotic susceptibility of the bacteria at Kerbela Governorate. *International Journal of Health Sciences* 6: 271–279.
- Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infectious Disease* 16: 161–168.
- Majdani, R. & Ghahfarokhi, S.E. (2022). Isolation and characterization of lytic bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from human infections in the north-west of Iran. *Iran Journal Microbiology* 14(2): 203-213.
- Rahimzadeh, G., Gill, P. & Rezai, M.S. 2017. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) phage from sewage at a tertiary pediatric hospital. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 5(1): e39615.
- Rehman, A., Patrick, W. M. & Lamont, I. L. 2019. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology* 68(1): 1–10.
- Ross, A., Ward, S. & Hyman, P. 2016. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Frontiers in Microbiology* 7:1-6
- Sada, T.S. & Tessema, T.S. 2024. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from various sources in Addis Ababa against antimicrobial-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* strains and evaluation of their therapeutic potential. *BMC Infectious Diseases* 24(1): 100-120.
- Stent, G. S. 1963. Molecular Biology of Bacterial Viruses. WH Freeman and Co., San Francisco, CA.
- Wang, J., Zhao, F., Sun, H., Wang, Q., Zhang, C., Liu, W., Zou, L., Pan, Q. & Ren, H. 2019. Isolation and characterization of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS_SA2. *AIMS Microbiology* 5(3): 285–307.
- Warriner, K. & Namvar, A. 2011. Biosensors for foodborne pathogen detection. *Comprehensive Biotechnology* hlm. 659–674. Elsevier.

Pemencilan dan Pencirian Bakteria Pencurai Lemak, Minyak dan Gris (FOG) Dari Air Sisa Restoran

Nur Farzana Haziqah Abu Samah¹, Nurfatehah Khairul Anuar¹, Nor Hidayu Abu Bakar², Nur Husna Mohamad² & Fareed Sairi^{1,2,*}

¹Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia¹

²UKM Culture Collection, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: fareed@ukm.edu.my

Abstrak: Pengumpulan lemak, minyak dan gris (FOG) mengakibatkan sistem pembentungan tersumbat dan seterusnya meningkatkan risiko pencemaran serta kos penyelenggaraan. Walaupun kaedah rawatan fizikal dan kimia telah digunakan, lebih FOG masih sukar dirawat dengan berkesan. Oleh itu, rawatan bioremediasi menggunakan bakteria pencurai FOG muncul sebagai alternatif yang berpotensi untuk menambahbaik pengurusan air sisa. Kajian ini bertujuan untuk mencirikan bakteria pencurai FOG yang dipencil dari sumber air sisa restoran. Pemencilan bakteria dilakukan melalui kaedah pencairan bersiri menggunakan agar nutrien, diikuti penyaringan menggunakan agar Tributyrin (1%). Morfologi sel bakteria dicirikan melalui pewarnaan Gram dan pengenalpastian melalui analisis gen 16S rRNA. Sebanyak 42 pencilan bakteria telah diperolehi dan 24 pencilan menunjukkan pembentukan zon cerah di sekeliling koloni di atas agar Tributyrin 1%. Kesemua 24 pencilan menunjukkan aktiviti enzim lipase yang berbeza, 10 (+++), lapan (++) dan dua (+) berdasarkan nisbah saiz zon cerah berbanding koloni. Melalui analisis jujukan gen 16S rRNA, 12 pencilan bakteria telah dikenal pasti, merangkumi *Bacillus subtilis*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus tequilensis*, dan *Pseudomonas oryzae*. Kajian lanjutan untuk menentukan kecekapan penguraian FOG, pembangunan konsortium serta penilaian tahap keselamatan perlu dilaksanakan.

Kata kunci: bakteria pencurai minyak; lemak; minyak; gris; *Bacillus* spp.

Abstract: The accumulation of fats, oils and grease (FOG) leads to blockages in sewer systems, thereby increasing the risk of pollution and maintenance costs. Although physical and chemical treatment methods have been employed, excess FOG remains difficult to treat effectively. Consequently, bioremediation using FOG-degrading bacteria has emerged as a promising alternative for improving wastewater management. This study aims to characterise FOG-degrading bacteria isolated from restaurant wastewater. Bacterial isolation was carried out using serial dilution with nutrient agar, followed by screening on 1% Tributyrin agar. The bacterial cell morphology was determined through Gram staining, while identification was performed via 16S rRNA gene analysis. A total of 42 bacterial isolates were obtained, with 24 isolates exhibiting the formation of clear zones around the colonies on 1% Tributyrin agar. All 24 isolates demonstrated varying levels of lipase activity, with 10 (+++), 8 (++) and two (+) based on the ratio of the clear zone to colony size. Through 16S rRNA gene sequencing, 12 bacterial isolates were identified, including *Bacillus subtilis*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus tequilensis*, and *Pseudomonas oryzae*. Further studies are required to determine FOG degradation efficiency, develop bacterial consortia, and assess their safety.

Keywords: oil-degrading bacteria; fat; oil; grease; *Bacillus* spp.

1. Pengenalan

Lemak, minyak dan gris (FOG) adalah komponen dalam air kumbahan bukan najis daripada sisa makanan, lemak haiwan, minyak dan bahan-bahan lain. Pada suhu rendah, FOG cenderung untuk membeku dan membentuk lapisan tebal, yang akhirnya menyumbat saluran paip dan sistem pembentungan (Al Khatib et al. 2015). Sistem pembentungan yang tersumbat bukan sahaja mengganggu aliran air, tetapi juga boleh menyebabkan limpahan FOG serta sisa-sisa lain ke dalam sungai, tasik, dan lautan. Keadaan ini menjejaskan kualiti air dan memberi kesan buruk kepada ekosistem akuatik serta kesihatan manusia (Lin et al. 2022).

Aplikasi perangkap gris di premis kedai makan telah digunakan untuk memerangkap FOG daripada memasuki sistem pembentungan (Al Khatib et al. 2023). Selain itu, rawatan kimia juga dilakukan menggunakan bahan seperti natrium hidroksida dan asid sulfurik untuk memecahkan lemak dan minyak (Shebl 2023). Walau bagaimanapun kedua-dua pendekatan ini memberi penyelesaian jangka pendek dan kurang berkesan dalam jangka masa panjang. Perangkap gris memerlukan penyelenggaraan yang berkala agar tidak berlaku limpahan sisa FOG, yang boleh menyumbat saluran pembentungan. Sementara itu, penggunaan bahan kimia pula menyebabkan hakisan paip pada sistem pembentungan (Lauprasert et al. 2017). Malah, penggunaan bahan kimia juga menghasilkan sisa toksik yang boleh mencemari sumber air lalu mengancam kesihatan manusia dan hidupan liar (Khalil et al. 2022).

Seiring dengan matlamat dunia untuk mencapai SDG 6 (Air bersih dan sanitasi) dalam pengurusan air yang lebih lestari, rawatan bioremediasi menggunakan bakteria pencurai FOG telah muncul sebagai alternatif yang berpotensi untuk dikembangkan. Penggunaan bakteria pencurai minyak, seperti *Bacillus* spp. berupaya mengurangkan risiko penyumbatan saluran paip serta pencemaran air dengan menghasilkan enzim lipase yang dapat memecahkan molekul kompleks lemak dan minyak kepada sebatian yang lebih ringkas (Shart et al. 2020). Justeru, kajian ini bertujuan untuk memencil dan menciri bakteria daripada sisa air dari empat restoran di Muar, Johor bagi menilai keupayaan bakteria dalam mencurai FOG. Hasil kajian diharap dapat menyumbang kepada pengurusan sisa FOG secara lebih berkesan dan mesra alam.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Pemencilan bakteria pencurai FOG

2.1.1 Pencairan bersiri

Sebanyak empat sampel sisa FOG diperoleh daripada Medan Selera Bentayan, Kedai Makan Sri Bentayan, Kedai MARA Bentayan (No. 7), dan Kedai MCA Bentayan (No. 46) yang berada dibawah pemantauan Majlis Perbandaran Muar, Johor. Pencairan bersiri dilakukan secara aseptik daripada julat 10^{-1} hingga 10^{-7} dengan melarutkan 1 mL sampel FOG ke dalam 9 mL larutan garam penimbal fosfat (*phosphate buffered saline*, PBS). Sebanyak 0.1 mL daripada setiap pencairan dipindahkan ke atas agar nutrien dan bakteria disebarkan secara sekata menggunakan rod kaca steril. Piring agar kemudian dieram pada suhu 37°C selama 24 jam untuk membolehkan pertumbuhan koloni bakteria. Koloni yang diperoleh seterusnya disubkultur atas piring agar nutrien yang baru bagi mendapatkan koloni tunggal yang tulen.

2.1.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan menyediakan calitan bakteria pada slaid mikroskop dan dilalukan di atas haba. Selepas itu, larutan kristal violet dititiskan ke atas calitan tersebut dan dibiarkan selama 1 minit sebelum dibasuh dengan air. Seterusnya, larutan Gram's iodine dibanjirkan ke atas calitan bakteria selama 1 minit sebelum dibasuh dengan air. Seterusnya beberapa alkohol dilalukan ke atas slaid sehingga pewarna kristal violet tidak lagi mengalir daripada slaid. Seterusnya, safranin dititiskan dan dibiarkan selama 30 saat sebelum dibasuh dengan air dan dikeringkan menggunakan kertas penyerap. Pemerhatian morfologi sel dilakukan menggunakan mikroskop cahaya, Olympus CX23LED (Olympus Sdn. Bhd.) dengan pembesaran 1000×. Sel bakteria yang berwarna biru atau ungu dikategorikan sebagai Gram positif manakala sel bakteria yang berwarna merah atau merah jambu dikategorikan

sebagai Gram negatif.

2.2 Penyaringan bakteria pencurai FOG

Koloni tunggal yang diperoleh daripada proses pemencilan disubkultur ke atas agar tributyrin 1% dan dieram pada suhu 37°C selama 24 jam. Selepas 24 jam, zon cerah yang terhasil sekitar koloni dicerap. Berdasarkan kajian Kanlayakrit dan Boonpan (2007), tahap aktiviti lipase ditentukan berdasarkan nisbah ukuran diameter zon cerah berbanding diameter koloni. Nisbah diameter >2.1, 1.6-2.0, 1.1-1.5 dan 1 masing-masing dikategorikan sebagai kuat (+++), sederhana (++), lemah (+) dan tiada aktiviti (-). Oleh itu, diameter zon cerah dan diameter koloni telah diukur bagi menentukan tahap aktiviti lipase pencilan bakteria.

2.3 Pengenalpastian bakteria pencurai FOG

2.3.1 Pengekstrakan DNA

Pengekstrakan DNA bagi bakteria pencurai minyak dilakukan menggunakan kit UKMCC DNA Fast Extraction. Bacteria terpilih dieram 24 jam pada suhu 37°C dalam kaldu nutrien. Selepas 24 jam, sebanyak 1.5-3 mL kultur bakteria dimasukkan ke dalam tiub Eppendorf 2.0 mL dan diempar pada 13 000 rpm selama 2 minit pada suhu bilik untuk mendapatkan pelet. Supernatan dibuang, dan pelet digunakan sebagai bahan utama untuk pengekstrakan DNA. Bagi bakteria Gram-positif, 180 µL penimbal TE ditambah ke pelet dan dicampur menggunakan vortex sebelum ditambah 2 µL lisozim. Campuran ini dieram pada suhu 37°C selama 30 minit diikuti dengan penambahan 3 µL proteinase K dan dieram pada suhu 56°C selama 1 jam. Kemudian, 300 µL FDE1 ditambah dan campuran dieram pada suhu 80°C selama 10-15 minit, diikuti 600 µL FDE2 dan dieram dalam ais selama 10 minit. Campuran seterusnya diempar pada 13 000 rpm selama 5 minit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tiub baru dan 500 µL FDE3 ditambah dan dicampur dengan membalikkan tiub beberapa kali sebelum diempar pada 13 000 rpm selama 5 minit. Seterusnya, supernatan dibuang dan 600 µL FDE4 ditambah pada suhu bilik sebelum diempar pada 13000 rpm selama 5 minit. Sampel akhirnya dikeringkan selama 2 jam pada suhu bilik atau menggunakan speed vac selama 15 minit. Sampel DNA kemudiannya dilarutkan dalam 50 µL air suling steril (ddH₂O) dan disimpan pada suhu -20°C. Kualiti dan kuantiti DNA dinilai menggunakan spektrofotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, (USA)). Sebanyak 5 µL DNA dianalisis menggunakan kaedah elektroforesis dalam gel agaros 1.5% pada 90 V selama 60 minit.

2.3.2 Tindak Balas Rantaian Polimerase (PCR)

Amplifikasi jujukan gen 16S rRNA dijalankan menggunakan tindak balas rantai polimerase (PCR). Tindak balas PCR sebanyak 50 µL mengandungi 1× Phanta Max Master Mix, 0.4 µM pencetus hadapan 27F, 0.4 µM pencetus berbalik 1525R, dan 100 ng templat DNA serta 19 µL air suling steril. Proses PCR dimulakan dengan pemanasan awal pada 95°C selama 5 minit (1 kitaran), diikuti oleh 35 kitaran yang terdiri daripada penyahaslian pada 95°C selama 1 minit, penyepuhlindungan pada 59°C selama 1 minit, dan pemanjangan pada 72°C selama 1 minit. Seterusnya, tindak balas diakhiri dengan pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 minit diikuti dengan penyejukan pada 4°C menggunakan mesin pengitar terma, Biometra TOne (Jerman).

2.3.3 Analisis jujukan gen 16S rRNA dan analisis filogenetik

Hasil PCR yang menunjukkan jalur tunggal pada saiz 1500 bp telah dipilih dan dihantar kepada Syarikat Apical Scientific Sdn. Bhd. untuk proses penjujukan. Prapemprosesan hasil jujukan dijalankan menggunakan laman sesawang DNA Subway (<https://dnasubway.cyverse.org/>) untuk memperoleh jujukan konsensus bakteria (>1400 bp) yang dianalisis menggunakan pelantar EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>). Penjajaran berbilang jujukan tersebut bersama jujukan rujukan diujarkan menggunakan perisian MEGA-11. Pokok filogeni pula dijana menggunakan algoritma Maximum Likelihood (ML) dengan nilai bootstrap 1000. Algoritma ML dipilih kerana ia lebih jitu dalam mengkaitkan model evolusi untuk penjanaan pokok filogeni yang baik.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Pemencilan bakteria pencurai FOG

Sebanyak 42 pencilan bakteria berjaya dipencilkan daripada empat sampel sisa air berbeza. Daripada jumlah tersebut, 28 pencilan adalah bakteria Gram-positif dan 14 Gram-negatif (Jadual 1). Majoriti pencilan mempunyai koloni berwarna putih atau berkrim, dengan kepelbagaian bentuk dan saiz seperti tidak sekata, bulat, kecil, besar dan punctiform. Manakala, pencilan seperti S202A, S114F, S206E, dan S207E mempunyai pigmen kuning. Dari segi pemerhatian mikroskopik, kebanyakan pencilan terdiri daripada bakteria berbentuk rod dan Gram-positif. Pencilan seperti S109E, S110E, S204E, S205E, dan S206E pula adalah Gram-negatif berbentuk rod. Pencilan S113C, S308C, dan S309C kokus Gram-positif, manakala S114F, S115F, S209F, dan S211F adalah kokobasilus Gram-negatif.

Jadual 1. Pemencilan bakteria dari sampel sisa air domestic dari kedai medan selera sekitar Sungai Bentayan.

Sampel FOG	Gram positif	Gram negatif
Medan selera bentayan	S101B, S102A, S103A, S104A, S105A, S106A, S107A, S108A, S112D, S113C	S109E, S110E, S111E, S114F, S115F
Kedai makan sri bentayan	S201B, S202A, S203A, S208D	S204E, S205E, S206E, S207E, S209F, S210F, S211F
Kedai mara bentayan (No. 7)	S301A, S302A, S303A, S304A, S305A, S306A, S307A, S308C, S309C	
Kedai MCA bentayan (No. 46)	S401A, S404C, S405C, S406D, S407D	S402E, S403E

3.2 Penyaringan bakteria pencurai FOG

Hasil penyaringan aktiviti di atas agar tributyrin mendapati 24 daripada 42 pencilan bakteria adalah aktif (20 pencilan Gram positif dan 4 pencilan Gram negatif). Hasil penyaringan ini juga menunjukkan, beberapa bakteria iaitu S109E, S202A, S204E, S210F, S211F, S301A, S304A, S309C, S405C dan S407D mempunyai tahap aktiviti lipase yang kuat (+++) berdasarkan kepada nisbah zon cerah berbanding saiz diameter koloni (Jadual 2). Keputusan ini menunjukkan bakteria tersebut berupaya menghasilkan lipase yang penting dalam pemecahan lipid kompleks kepada bentuk lebih ringkas seperti asid lemak bebas dan gliserol (Bhandari et al. 2021; Kanmani et al. 2015; Pham et al. 2021). Oleh itu, 24 bakteria dengan aktiviti lipase ini telah dipilih untuk pengekstrakan dan pengenalpastian melalui analisis gen 16S rRNA.

Jadual 2. Nisbah saiz zon cerah dengan saiz koloni pada agar tributryin dan tahap aktiviti lipase pencilan bakteria.

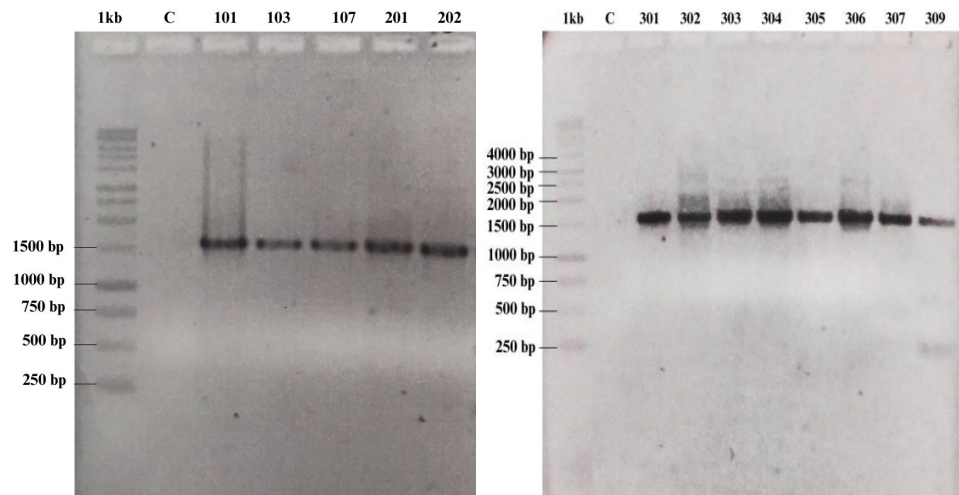
Sampel	Diameter Zon Cerah (mm)	Diameter Koloni (mm)	Nisbah	Tahap Aktiviti Lipase
S101B	33	26	1.3	+
S102A	16	12	1.3	+
S103A	20	12	1.7	++
S107A	27	24	1.1	+
S109E	27	7	3.9	+++
S112D	19	10	1.9	++
S113C	8	4	2.0	++
S201B	22	19	1.2	+
S202A	5	2	2.5	+++
S203A	11	6	1.8	++
S204E	24	7	3.4	+++
S210F	19	6	3.2	+++
S211F	24	10	2.4	+++
S301A	10	4	2.5	+++
S302A	12	7	1.7	++
S303A	17	10	1.7	++
S304A	15	7	2.1	+++
S305A	12	7	1.7	++
S306A	17	13	1.3	+
S307A	13	9	1.4	+
S309C	24	5	4.8	+++
S401A	4	2	2.0	++
S405C	15	5	3.0	+++
S407D	10	3	3.3	+++

Tahap aktiviti lipase: – untuk nisbah kurang atau sama dengan 1, + untuk nisbah 1.1 – 1.5, ++ untuk nisbah 1.6 – 2.0, +++ untuk nisbah melebihi 2.1

3.3 Pengenalpastian bakteria pencurai FOG

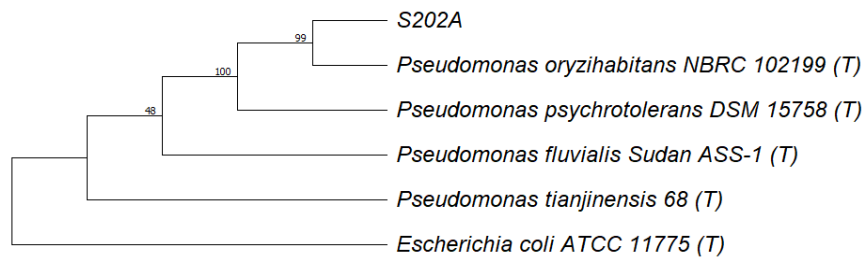
Hasil pengestrakan DNA menunjukkan kesemua 24 pencilan bakteria mempunyai kepekatan DNA yang lebih daripada 50 ng/uL. S210F mencatatkan kepekatan DNA tertinggi (6289.5 ng/ μ L), diikuti oleh S204E (4801.5 ng/ μ L) dan S401A (1168.9 ng/ μ L). Sebaliknya, S103A dan S307A menunjukkan kepekatan terendah, masing-masing sebanyak 62.3 ng/ μ L dan 65.9 ng/ μ L. Pencilan-pencilan juga menunjukkan nisbah A260/A280 dalam julat ideal (1.74–2.16). Walau bagaimanapun, S112D (1.15), S405C (1.21), dan S407D (1.18) mencatatkan nisbah A260/A280 yang rendah. Bacaan A260/A230 bagi kebanyakan pencilan juga berada dalam julat yang memuaskan, dengan nilai antara 1.70 hingga 2.47. Namun, S112D (0.38), S405C (0.37), dan S407D (0.33) menunjukkan bacaan yang sangat rendah disebabkan oleh pencemaran daripada polisakarida atau bahan fenolik yang berasal daripada medium kultur atau sisa reagen semasa pengestrakan (Lucena-Aguilar et al. 2016). Sebanyak 13 daripada 24 pencilan bakteria pencurai minyak berjaya menjalani tindak balas rantaian polimerase (PCR) bagi amplifikasi jujukan gen 16S rRNA, iaitu S101B, S103A, S107A, S201B, S202A, S301A, S302A, S303A, S304A, S305A, S306A, S307A dan S309C. Satu jalur yang terhasil daripada elektroforesis gel menunjukkan bahawa amplifikasi PCR berjaya menghasilkan produk yang khusus seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1.

Hasil elektroforesis menunjukkan jalur tunggal pada saiz 1500 bp bagi semua sampel selari dengan penggunaan pencetus hadapan 27F dan pencetus berbalik 1525R yang menyasarkan kawasan sekitar 1500 bp. Namun, S309C menunjukkan dua jalur dalam elektroforesis gel iaitu satu jalur terang pada 1500 bp dan satu jalur samar pada 250 bp. Kawalan negatif menunjukkan tiada jalur bermakna hasil PCR adalah baik dan boleh diteruskan untuk analisis seterusnya. Oleh itu, hasil PCR bagi kesemua pencilan kecuali S309C telah digunakan untuk analisis penjujukan gen 16S rRNA. Hasil analisis gen 16S rRNA mendapati kesemua pencilan bakteria tergolong dalam genus *Bacillus* kecuali S202A yang merupakan *Pseudomonas* sp. Spesies *Bacillus* yang diperoleh mempunyai perkaitan paling hampir dengan *B. safensis*, *B. velezensis*, *B. paramycoides*, *B. tequilensis*, dan *B. subtilis* (Rajah 2 dan Rajah 3)

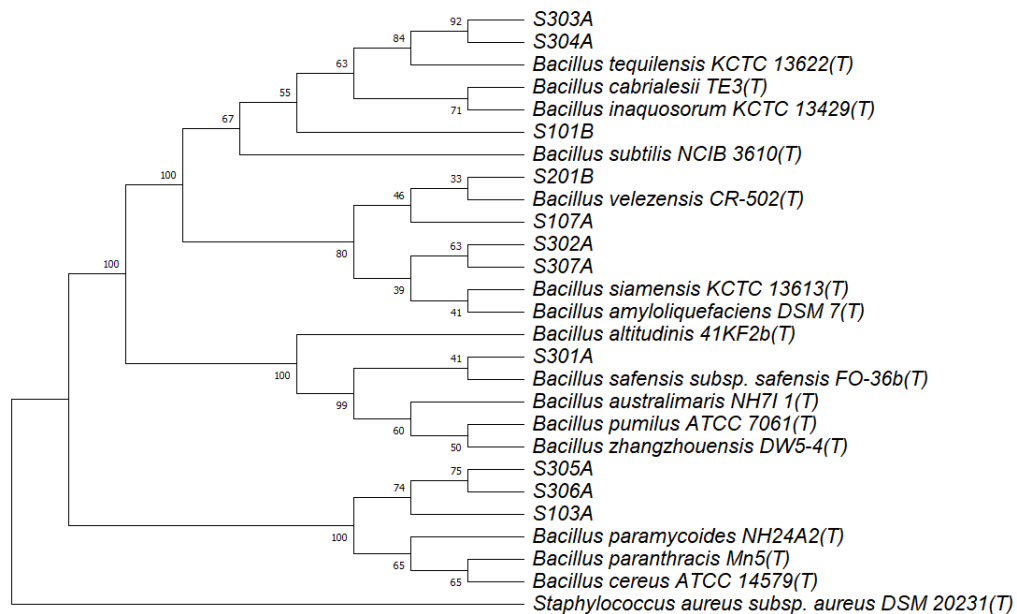


Rajah 1. Hasil gel elektroforesis PCR bagi 13 pencilan bakteria.

Kajian terdahulu membuktikan bahawa spesies ini berupaya mencurahkan minyak melalui penghasilan biosurfaktan dan enzim lipase, yang memainkan peranan penting dalam penguraian FOG. *B. safensis* menunjukkan kecekapan tinggi dalam degradasi minyak melalui biosurfaktan (Olukunle et al. 2023), sementara *B. tequilensis* (Datta et al. 2020), *B. velezensis* (Rahmatul et al. 2021), *B. paramycoides* (Anggriani et al. 2020) dan *B. subtilis* (Fenibo et al. 2019; Gayathiri et al. 2022) turut dikenal pasti mampu meningkatkan keberkesanan pencuraian minyak. Selain genus *Bacillus*, *Pseudomonas oryzihabitans* juga dilaporkan berupaya mendegradasi minyak melalui penghasilan biosurfaktan (Hosseini et al. 2024). Walau bagaimanapun, ia mempunyai risiko sebagai patogen yang perlu dipertimbangkan. *B. velezensis* pula telah dikaitkan dengan penyakit pada tanaman seperti kentang, bawang, dan buah pic (Rabbee et al. 2023). Sementara itu, *B. paramycoides* tergolong dalam klad yang sama dengan *B. cereus*, yang diketahui menghasilkan toksin yang boleh menyebabkan keracunan makanan serta jangkitan oportunistik pada manusia (Miller et al. 2018). *P. oryzihabitans* pula merupakan mikroorganisma saprofitik Gram-negatif yang lazimnya ditemui dalam persekitaran lembap dan boleh menyebabkan jangkitan dalam individu imunokompromi dengan penggunaan kateter kekal (Panagopoulos et al. 2016). Oleh itu, penggunaan spesies ini dalam pencuraian FOG perlu dinilai dengan lebih teliti bagi mengelakkan sebarang implikasi terhadap kesihatan dan persekitaran.



Rajah 2. Kladogram pohon filogeni bagi S202A yang mempunyai perkaitan antara genus *Pseudomonas*. *Escherichia coli* sebagai outgroup.



Rajah 3. Kladogram pohon filogeni bagi penciran bakteria selain S202A yang mempunyai perkaitan antara genus *Bacillus*. *Staphylococcus aureus* sebagai outgroup.

4. Kesimpulan

Kajian ini berjaya mencirikan bakteria 12 bakteria yang berpotensi bagi pencuraian FOG merangkumi enam spesies utama iaitu *Bacillus subtilis*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus tequilensis*, dan *Pseudomonas oryzae*. Kajian lanjut diperlukan bagi mengoptimum dan menilai keberkesanan penciran bakteria dalam sistem rawatan sisa industri sebenar.

Penghargaan

Jutaan terima kasih kepada Perbadanan Bioteknologi dan Biodiversiti Johor, J-Biotech Sdn. Bhd. atas dana penyelidikan (ST-2024-034) yang diberi serta Universiti Kebangsaan Malaysia atas perkhidmatan dan kemudahan yang disediakan sepanjang kajian.

Rujukan

- Al Khatib, M.F.R., Alam, M. Z. & Shabana, H.F. 2015. Isolation of Bacterial Strain for Biodegradation of Fats, Oil and Grease. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 19: 138–143.
- Al Khatib, M.F.R., Alqedra, F. & Alam, M.Z. 2023. Biodegradation of fats, oil and grease using microorganisms isolated from palm oil mill effluent. *IJUM Engineering Journal* 24(2): 1–10

- Anggriani, L., Budiarti, S.R.I. & Mubarik, N.R. 2020. Lipase-producing ability of bacteria from inasua (Fish fermented product) from Central Moluccas, Indonesia. *Biodiversitas* 21(2): 622–628.
- Bhandari, S., Poudel, D.K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., Shrestha, S., Gaire, S., Basnet, K., Khadka, U. & Parajuli, N. 2021. Microbial Enzymes Used in Bioremediation. *Journal of Chemistry* 2021: 1–17.
- Datta, P., Tiwari, P. & Pandey, L.M. 2020. Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated *Bacillus tequilensis* MK 729017 from Assam reservoir soil. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 195: 107612–107625
- Fenibo, E.O., Ijoma, G.N., Selvarajan, R. & Chikere, C.B. 2019. Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation. *Microorganisms* 7(11): 581–610
- Gayathiri, E., Prakash, P., Karmegam, N., Varjani, S., Awasthi, M.K. & Ravindran, B. 2022. Biosurfactants: Potential and Eco-Friendly Material for Sustainable Agriculture and Environmental Safety—A Review. *Agronomy* 12(3): 662–697
- Kanlayakrit, W. & Boonpan, A. 2007. Screening of Halophilic Lipase-Producing Bacteria and Characterization of Enzyme for Fish Sauce Quality Improvement. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41: 576–585.
- Kanmani, P., Kumaresan, K. & Aravind, J. 2015. Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. *Electronic Journal of Biotechnology* 18(1): 20–28.
- Khalil, M., Iqbal, M., Turan, V., Tauqeer, H.M., Farhad, M., Ahmed, A. & Yasin, S. 2022. *Household chemicals and their impact*. Environmental Micropollutants, hlm. 201–232. Amsterdam: Elsevier.
- Hosseini, S., Sharifi, R., Habibi, A., & Ali, Q. 2024. Molecular identification of rhamnolipids produced by *Pseudomonas oryzae* during biodegradation of crude oil. *Frontiers in Microbiology* 15. 2024: 1–10.
- Lauprasert, P., Chansirirattana, J. & Paengjan, J. 2017. Effect of selected bacteria as bioremediation on the degradation of fats oils and greases in wastewater from cafeteria grease traps. *European Journal of Sustainable Development* 6(2): 181–186
- Lin, L., Yang, H. & Xu, X. 2022. Effects of Water Pollution on Human Health and Disease Heterogeneity: A Review. *Frontiers in Environmental Science* 10: 1–16.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A.M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J.A., López-Guerrero, J.A. & Aguilar-Quesada, R. 2016. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking* 14(4): 264–270.
- Miller, R.A., Jian, J., Beno, S.M., Wiedmann, M. & Kovac, J. 2018. Intraclade Variability in Toxin Production and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* Group Type Strains and Dairy-Associated Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 84(6): 1–15.
- Olukunle, O., Olowoyeye, B. & Fadipe, T. 2023. Biosurfactant Producing Bacteria Associated with Oil Polluted Soils of some Auto Mechanic Workshops in Akure, Ondo State, (Southwest) Nigeria. *Advancement in Life Sciences* 10(3): 356–361.
- Panagopoulos, G. N., Megaloikonomos, P. D., Lontos, M., Giannitsioti, E., Drogari-Apiranthitou, M., Mavrogenis, A. F., & Kontogeorgakos, V. 2016. *Pseudomonas oryzae* Infected Total Hip Arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Infection* 1(1), 54–58.
- Pham, V.H.T., Kim, J., Chang, S. & Chung, W. 2021. Investigation of Lipolytic-Secreting Bacteria from an Artificially Polluted Soil Using a Modified Culture Method and Optimization of Their Lipase Production. *Microorganisms* 9(12): 2590.
- Rabbee, M.F., Hwang, B.-S. & Baek, K.-H. 2023. *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy* 13(840): 1–14.
- Rahmatul, L.I., Meryandini, A., Helianti, I. & Astuti, R.I. 2021. Identification of lipase producing bacteria from palm oil sewage sludge processing plant at Malimping, Banten, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 22(10): 4512–4524.
- Shart, A.O.B. & Elkhailil, E.A.I. 2020. Biochemical Characterization of Lipase Produced by *Bacillus* spp. Isolated from Soil and Oil Effluent. *Advances in Enzyme Research* 08(04): 39–48.
- Shebl, Y.A. 2023. *Reverse Osmosis in Industrial Wastewater Treatment Units*. Dlm. Ramalingam, K. & Zeb, A. (pnyt.). Desalination - Ecological Consequences, hlm. 1–136. United Kingdom: IntechOpen.

Ekstrak air *Polygonum minus* (kesum) menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap *Helicobacter pylori* rintang antibiotik

Aina Yasirah Yahya¹, Asif Sukri^{1*}, Alfizah Hanafiah², Noraziah Mohamad Zin³,
Nazlina Ibrahim¹ & Wan Syaidatul Aqma¹

¹Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Jabatan Mikrobiologi dan Imunologi Perubatan, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, 56000, Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

³Pusat Pengajian Diagnostik, Terapeutik, dan Penyiasatan (CODTIS), Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, 50300 Kuala Lumpur, Kuala Lumpur, Malaysia

* e-mail of corresponding author: mohdasifsukri@ukm.edu.my

Abstrak: Jangkitan *H. pylori* merupakan penyebab utama kanser gastrik di seluruh dunia dan kerintangannya terhadap pelbagai jenis antibiotik telah menyebabkan pembasmian bakteria ini menjadi sukar. *Polygonum minus* pula merupakan sejenis tumbuhan aromatik yang boleh dijadikan sebagai rawatan alternatif kerana ia mempunyai pelbagai jenis bahan antioksidan dan antibakteria untuk melawan jangkitan bakteria. Oleh itu, kajian ini telah dilakukan untuk menentukan kevirulenan *H. pylori* strain HP18045 rintang pelbagai antibiotik dan aktiviti antibakteria *P. Minus* terhadap strain bakteria ini. Kajian ini telah dilakukan melalui kaedah resapan telaga pada agar Mueller-Hinton (MHA) bagi asai antibakteria dengan menggunakan ekstrak air *P. minus* dan perisian bioinformatik telah digunakan untuk menentukan tahap kevirulenan bakteria. Hasil asai antibakteria telah menunjukkan hasil yang positif terhadap *H. pylori* (diameter zon perencatan 12 mm) dari ekstrak air kepekatan 500 mg/mL manakala *Staphylococcus aureus* tidak menunjukkan sebarang pembentukan zon perencatan. Melalui analisis jujukan genom di pangkalan data faktor virulen, beberapa faktor kevirulenan yang penting yang wujud dalam *H. pylori* strain HP18045 telah ditentukan dalam menjangkiti perumah. Penemuan kajian ini berjaya membuktikan bahawa tumbuh-tumbuhan seperti *P. minus* dapat digunakan sebagai rawatan alternatif untuk melawan jangkitan bakteria tanpa menggunakan sebarang antibiotik.

Kata kunci: *Polygonum minus*; *Helicobacter pylori*; aktiviti antibakteria

Abstract: *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer worldwide, and its resistance to multiple antibiotics makes eradication difficult. *Polygonum minus*, an aromatic plant, has potential as an alternative treatment due to its antioxidant and antibacterial properties. This study aimed to assess the virulence of the multidrug-resistant *H. pylori* strain HP18045 and the antibacterial activity of *P. minus* against it. The well diffusion method on Mueller-Hinton agar (MHA) was used to evaluate antibacterial effects, while bioinformatics tools determined bacterial virulence. Results showed that *P. minus* aqueous extract (500 mg/mL) produced a 12 mm inhibition zone against *H. pylori*, while *Staphylococcus aureus* exhibited no inhibition. FASTA genomic analysis in virulence factor database identified key virulence factors in strain HP18045. These findings suggest that *P. minus* possesses antibacterial activity against *H. pylori* and could serve as an alternative therapy. Its ability to inhibit *H. pylori* without affecting *S. aureus* indicates specificity, making it a promising candidate for further research. The study highlights the potential of medicinal plants in combating bacterial infections without relying on conventional antibiotics.

Keywords: *Polygonum minus*; *Helicobacter pylori*; antibacterial activity

1. Pengenalan

Polygonum minus atau lebih dikenali sebagai daun kesum di Malaysia, adalah suatu tumbuhan aromatik penting yang digunakan secara meluas sebagai bahan perasa di dalam masakan serta perubatan tradisional di Asia Tenggara terutamanya di negara-negara seperti Thailand, Laos, Indonesia dan Vietnam (Ahmad et al. 2014). Tumbuhan ini mampu mencapai ketinggian 1.0 m di kawasan tanah rendah dan 1.5 m di kawasan yang berbukit. Tumbuhan ini mempunyai dedaun yang panjang dan berbentuk seperti pisau yang berukuran 5-7 cm panjang dan 0.5-2.0 cm lebar. Dedaun yang berwarna hijau gelap mempunyai bau yang aromatik dan disusun secara bergilir pada batangnya (Christopher et al. 2015). Secara tradisional, *P. minus* telah digunakan untuk merawat masalah penghadaman, mengurangkan kelemumur serta merawat penglihatan yang lemah. Di samping itu, kajian lepas telah mendapati bahawa tumbuhan ini mampu menunjukkan aktiviti anti-ulser, anti-keradangan, anti-penuaan, antioksidan dan immunomodulator (Ahmad et al. 2014). Aktiviti biologi yang berlaku adalah disebabkan oleh kehadiran bahan flavonoid dalam tumbuhan ini. Flavonoid merupakan satu komponen di dalam kumpulan komponen polifenolik yang disintesis oleh tumbuhan. Sebatian flavonoid juga telah menunjukkan kesan perencatan terhadap pelbagai jenis virus kerana komponen flavonoid mengandungi metabolit lipofilik yang boleh mengganggu struktur dan fungsi membran mikroorganisma (Hassim et al. 2015).

Helicobacter pylori adalah sejenis bakteria Gram negatif berukuran 0.5-1 μm lebar dan 2-4 μm panjang yang bersifat mikroaerofilik dan berbentuk helikal serta mempunyai flagelum yang telah berevolusi untuk mampu bertahan di dalam perut manusia. Secara amnya, perut mempunyai keadaan yang tidak sesuai untuk pertumbuhan bakteria atas beberapa faktor termasuklah keasidannya, enzim penghadaman yang aktif dan tekanan oksigen separa yang rendah. *H. pylori* mampu bertahan di dalam perut kerana mampu meneutralkan pH di dalam perut dengan menggunakan enzim urease, iaitu sejenis enzim yang menghidrolisiskan urea untuk menghasilkan ammonia, NH_3 (Martínez et al. 2019; Öztekin et al. 2021). Walau bagaimanapun, cara penyebaran *H. pylori* masih tidak jelas tetapi ia dipercayai disebarkan melalui transmisi najis-mulut atau mulut-mulut dari sumber air atau sumber pemakanan (Öztekin et al. 2021). *H. pylori* boleh dirawat dengan rawatan antibiotik tetapi bilangan strain bakteria yang rintang terhadap antibiotik semakin meningkat dari semasa ke semasa. Hal ini menyebabkan rawatan terhadap *H. pylori* ini menjadi semakin sukar kerana jangkitan bakteria sering dirawat dengan menggunakan antibiotik berbanding rawatan lain.

Sejak kebelakangan ini, kajian telah mengesan peningkatan dalam strain *H. pylori* yang rintang terhadap pelbagai jenis ubat (MDR) (Krzyżek et al. 2020). Banyak faktor yang boleh dikaitkan dengan kegagalan merawat jangkitan *H. pylori* ini termasuklah faktor genetik perumah, faktor virulen *H. pylori* tersendiri, tabiat buruk seperti merokok dan pengambilan alkohol, ketidakpatuhan terhadap pengambilan ubatan, tempoh pengambilan ubat dan terutama sekali strain *H. pylori* yang telah rintang antibiotik boleh mempengaruhi keberkesanan cara-cara untuk menghalang *H. pylori*. Lanjutan dengan hal ini, pelbagai rawatan telah cuba dikemukakan tetapi tiada sebarang rawatan yang berkesan. Dengan ini, rawatan antibiotik tetap dijadikan sebagai sumber perubatan utama dalam melawan jangkitan *H. pylori* tetapi ini boleh meningkatkan kerintangan bakteria tersebut dengan rawatan yang diberikan (Van Khien et al. 2019). Oleh itu, untuk mengurangkan peningkatan kerintangan *H. pylori* terhadap rawatan antibiotik, inisiatif lain dalam merawat jangkitan bakteria tersebut hendaklah dikemukakan yang boleh menunjukkan kesan antibakteria terhadap *H. pylori*. Kajian ini telah dijalankan untuk menentukan kevirulenan *H. pylori* HP18045 yang rintang terhadap pelbagai antibiotik dan aktiviti antibakteria ekstrak *P. minus* terhadap strain bakteria ini.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Ekstrak air *Polygonum minus*

Ekstrak *Polygonum minus* telah disediakan dengan menggunakan serbuk *P. minus* dari Biotropics Sdn. Bhd. dan telah dilarutkan dengan larutan 'nuclease-free water' (New England Biolabs, USA). 500 mg serbuk *P. minus* telah dilarutkan dengan 1 mL larutan 'nuclease-free water' untuk menyediakan larutan stok sebanyak 500 mg/mL bagi memulakan langkah pencairan bersiri. Oleh itu, empat kali pencairan bersiri telah dilakukan untuk mendapatkan 250 mg/mL (10^{-2}), 125 mg/mL (10^{-4}), 62.5 mg/mL (10^{-8})

dan 31.25 mg/mL (10^{-16}).

2.2 Penentuan faktor kevirulenan *H. pylori* strain HP18045

Kajian lepas telah menunjukkan bahawa strain *H. pylori* HP1804 adalah rintang terhadap pelbagai antibiotik iaitu amoxicillin, clarithromycin, dan metronidazole dengan menggunakan ujian E kerintangan antibiotik dan penjujukan genom telah dilakukan (Sukri et al. 2022). Untuk menentukan kevirulenan keseluruhan strain ini, fail FASTA telah dianalisis menggunakan pangkalan data Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (VFDB) (Zhou et al. 2025). Pangkalan data bioinformatik ini akan memberikan hasil keseluruhan faktor virulen yang terdapat dalam strain bakteria ini melalui analisis jujukan genom bakteria.

2.3 Penentuan aktiviti antibakteria *Polygonum minus*

Untuk penyediaan kultur *H. pylori* HP18045, stok sejuk beku daripada simpanan -80°C telah dikultur pada agar darah yang ditambah 7% darah kambing biri-biri (Thermo Fisher Scientific, USA) dan dikultur pada keadaan mikroaerofilik selama 3-5 hari. Pengenalpastian kultur *H. pylori* telah dikenalpasti menggunakan morfologi koloni pada permukaan agar yang lutsinar dan seakan titisan air. Kultur *Staphylococcus aureus* sebagai perbandingan dalam eksperimen ini telah dikultur pada agar nutrien (Sisco Research Laboratories, India). Kaedah yang dijalankan dalam kajian ini adalah kaedah resapan telaga menggunakan agar MHA yang telah ditambah dengan 20% serum kuda untuk memudahkan pengenalpastian zon perencatan berbanding dengan agar darah. Asai antibakteria terhadap *H. pylori* telah dilakukan dengan menggunakan ekstrak air *P. minus* yang telah disediakan dan eksperimen diulang dengan menggunakan rifampisin sebagai kawalan. Dengan menggunakan tip mikropipet, sebanyak empat lubang telah ditebuk pada agar secara perlahan untuk membentuk telaga. Kemudian, setiap telaga telah diisi dengan *H. pylori* yang telah dicairkan dengan air suling sehingga kekeruhannya mencapai kepada skala 0.5 berdasarkan unit piawai McFarland sebelum diisi dengan ekstrak air *P. minus* berkepekatan 500 mg/mL. Kemudian, eksperimen diulang dengan menggunakan ekstrak air *P. minus* berkepekatan 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL dan 31.25 mg/mL.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Kevirulenan strain *H. pylori* HP18045

Berdasarkan hasil pemprofilan *H. pylori* strain HP18045 di VFDB, terdapat beberapa kelas faktor virulen yang terlibat dalam kevirulenan *H. pylori* strain HP18045 iaitu kerintangan asid, perlekatan, pengelakan imun, modulator imun, pergerakan, sistem rembesan, dan toksin. Berdasarkan Rajah 1, kelas faktor virulen pada *H. pylori* strain HP18045 yang pertama adalah kerintangan asid di mana enzim urease adalah faktor kevirulenan yang utama. Ia terdiri daripada tujuh gen yang berkaitan iaitu *ureA*, *ureB*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* dan *ureI*. Urease merupakan enzim yang paling banyak dihasilkan oleh *H. pylori* untuk memastikan bakteria dapat hidup melalui penghasilan ammonia bagi mengneutralkan kawasan perut yang berasid. Peresapan ammonia ke dalam periplasma dan kawasan sekitar bakteria oleh enzim urease juga dapat mengalkalikan pH ekstraselular. Ujian pendiagnos bagi penyaringan jangkitan *H. pylori* sering menggunakan urease (Uberty et al. 2022) melalui ujian pantas urease. Seterusnya, kelas faktor virulen yang terlibat adalah perlekatan di mana ia terdiri daripada faktor virulen seperti AlpB, pelekat pengikat antigen kumpulan darah (*babA* dan *babB*), pelekat A *H. pylori* (*hpaA*), HopZ, HopB, PEB1, pelekat pengikat asid sialik (*sabA* dan *sabB*) dan lipoprotein berkait perlekatan AlpA (*alpA*). Walau bagaimanapun, gen *babA*, *babB*, *peb1* dan *sabB* tidak dapat dikesan dalam ramalan untuk *H. pylori* strain ini. Kemudian, kelas faktor virulen yang telah diramal dalam strain bakteria ini adalah pengelakan imun yang terdiri daripada antigen lipopolisakarida Lewis yang melibatkan gen *futA*, *futB* dan *futC*. Walau bagaimanapun, hanya gen *futC* yang dapat diramal dalam bakteria ini. *H. pylori* memerlukan perlekatan pada sel epitelium gastrik untuk memulakan jangkitan di mana bakteria ini akan melekat pada musin di mukus gastrik dan reseptor pada permukaan mukosa gastrik. Oleh itu, bakteria ini perlu menghasilkan komponen larut yang berbahaya untuk merosakkan rintangan pada lapisan gastrik. Dengan ini, gen-gen seperti *babA*, *sabA*, *oipA*, protein luaran membran (OMP) dan protein-protein lain akan berinteraksi dengan reseptor yang wujud pada sel epitelial

perumah dan memberi perlindungan kepada *H. pylori* semasa jangkitan berlaku daripada mekanisme keimunan perumah seperti aliran cecair pukal, peristalsis gastrik dan peluruhan lapisan mukus yang berterusan (Sharndama et al. 2022).

A)

Kelas faktor kevirulenan	Faktor kevirulenan	Gen berkait	Kehadiran dalam strain <i>H. pylori</i>
Kerintagan asid	Urease	<i>ureA</i>	
		<i>ureB</i>	
		<i>ureE</i>	
		<i>ureF</i>	
		<i>ureG</i>	
		<i>ureH</i>	
		<i>ureI</i>	

B)

Kelas faktor kevirulenan	Faktor kevirulenan	Gen berkait	Kehadiran dalam strain <i>H. pylori</i>
Pelekatan	AlpB (hopB)	<i>alpB/hopB</i>	
	Adhesin pelekat kumpulan darah antigen	<i>babA/hopS</i>	
		<i>babB/hopT</i>	
	adhesin A <i>H. pylori</i>	<i>hpaA</i>	
	HopZ	<i>hopZ</i>	
	HorB	<i>horB</i>	
	PEB1	<i>peb1</i>	
	Pelekat adhesin asid sialik	<i>sabA/hopP</i>	
		<i>sabB/hopO</i>	
	lipoprotein berkait pelekat AlpA (hopC)	<i>alpA/hopC</i>	

C)

Kelas faktor kevirulenan	Faktor kevirulenan	Gen berkait	Kehadiran dalam strain <i>H. pylori</i>
Pengelakan imun	Antigen Lewis lipopolisakarida	<i>futA</i>	
		<i>futB</i>	
		<i>futC</i>	
Modulasi imun	Protein pengaktif neutrofil (HP-NAP)	<i>napA</i>	
	Protein luar inflamasi	<i>oipA/hopH</i>	

Rajah 1. Faktor-faktor virulen yang dikesan dalam strain *H. pylori* HP18045. A) adalah faktor-faktor virulen untuk rembesan protein urease, B) adalah untuk gen pengkod protein pelekatan *H. pylori* manakala C) adalah gen-gen pengelakan imun dan modulasi imun. Warna biru menunjukkan kehadiran gen manakala warna merah menunjukkan ketidakhadiran gen.

Di samping itu, kelas faktor virulen lain yang dikesan adalah modulator imun yang terdiri daripada protein pengaktif neutrofil (*napA*) dan protein keradangan luaran (*oipA*). Kedua-dua gen tersebut telah dapat dikesan dalam bakteria strain ini (Rajah 1). Protein pengaktif-neutrofil *H. pylori* atau HP-NAP adalah protein yang dapat merangsang tindak balas neutrofil untuk dikumpul pada kawasan jangkitan untuk menyebabkan keradangan gastrik. HP-NAP boleh menghasilkan tekanan oksidatif terhadap perumah dan merosakkan sel epitelial gastrik perumah (Zhao et al. 2021). Protein keradangan luaran A atau OipA adalah protein yang dikodkan oleh gen *oipA* dalam *H. pylori*. OipA

berfungsi untuk meningkatkan rembesan interleukin-8 (IL-8), penghasilan bahan prokeradangan bagi kemasukan neutrofil, meningkatkan keradangan pada perut dan berinteraksi dengan membran sel perumah untuk dikolonisasi bagi meningkatkan pembentukan kanser gastrik. Kajian dari Oktem-Okullu et al. (2023) menyatakan bahawa *H. pylori* yang mempunyai OipA yang berfungsi menunjukkan peningkatan yang signifikan dari segi bilangan pesakit kanser yang dijangkiti dan menyimpulkan bahawa gen *oipA* yang mempunyai status 'on' merupakan faktor risiko yang major bagi kanser gastrik yang diaruh oleh bakteria ini. Keupayaan OipA untuk meningkatkan penghasilan radikal bebas juga boleh menyebabkan berlakunya mutasi dalam sel perumah (Bartpho et al. 2020). Tambahan daripada itu, *oipA* yang berfungsi juga boleh berkait dengan 'DNA damage-induced genotoxicity' dan metilasi gen yang abnormal dalam karsinogenesis gastrik berkait *H. pylori* (Vahidi et al. 2022).

Selain itu, kelas faktor virulen yang seterusnya adalah pergerakan yang terdiri daripada flagela. Kesemua 37 gen yang mengekod protein untuk pergerakan *H. pylori* telah dikesan dalam kajian ini. Menurut kajian yang telah dilakukan oleh Liu et al. (2024), arah pusingan flagela dapat mempengaruhi pembentukan biofilem untuk memberi nutrisi dan perlindungan pada *H. pylori* semasa jangkitan. Data yang diperolehi dari kajian tersebut dapat menyimpulkan bahawa *H. pylori* yang mempunyai flagela yang berpusing secara lawan arah jam dapat menggalakkan pembentukan biofilem manakala *H. pylori* yang mempunyai flagela yang berpusing mengikut arah jam menyekat pembentukan biofilem. Kajian lepas ini dapat menyimpulkan bahawa pergerakan pusingan flagela berkemungkinan beroperasi melalui tapak jalan pengisyaratan mekanikal yang bergantung kepada protein PilO dan protein-protein lain.

Kelas faktor virulen yang terlibat seterusnya adalah sistem rembesan yang terdiri daripada sistem rembesan Cag PAI jenis IV dan mempunyai sebanyak 26 gen terlibat serta gen A berkait-sitotoksin efektor T4SS yang mempunyai hanya satu gen sahaja iaitu *cagA*. Hanya *cagI*, *cag2*, *cagP* dan *cagQ* dari sistem rembesan Cag PAI jenis IV yang tidak dapat dikesan dalam *H. pylori* strain ini. *H. pylori* juga dapat menghasilkan sistem penghantar efektor semasa jangkitan berlaku seperti CagA dan T4SS di mana protein CagA akan dihantar kepada sel epitelial gastrik melalui T4SS. Pengekspresan CagA boleh menyebabkan peningkatan risiko kanser gastrik kerana kepatogenesis protein CagA boleh menyebabkan gangguan pada pengisyaratan selular. Strain bakteria yang dapat mengekspreskan protein ini pula dianggap virulen (Ansari et al. 2020).

Walau bagaimanapun, berdasarkan hasil pemprofilan *H. pylori* strain HP18045 yang telah dilakukan di VFDB juga, keputusan mendapati bahawa tidak semua gen atau komponen kevirulenan yang major terlibat dalam *H. pylori* strain ini. Namun, dapatan ini menunjukkan bahawa strain HP18045 merupakan strain yang bukan sahaja rintang terhadap pelbagai antibiotik tetapi juga merupakan strain yang sangat virulen kerana strain ini mempunyai hampir semua gen-gen faktor virulen *H. pylori*.

3.2 Aktiviti antibakteria ekstrak air *P. minus*

Hasil asai antibakteria ekstrak air *P. minus* terhadap *H. pylori* strain HP18045 menunjukkan hasil yang positif di mana terdapatnya pembentukan zon perencatan sebanyak 12 mm daripada purata lima cerapan yang berbeza manakala hasil asai antibakteria ekstrak air *P. minus* terhadap *S. aureus* menunjukkan hasil yang negatif di mana tiada pembentukan zon perencatan berlaku pada kesemua agar yang diisi dengan kepekatan ekstrak air *P. minus* yang berbeza. Kepekatan yang telah menunjukkan hasil aktiviti antibakteria pada *H. pylori* adalah dari kepekatan sebanyak 500 mg/mL.

Kaedah resapan telaga telah dilakukan ke atas kajian ini kerana ia merupakan kaedah yang mudah dan cepat untuk dilakukan serta bersesuaian dengan penggunaan bahan semula jadi (Hossain et al. 2022). Walaupun zon perencatan tidak menunjukkan luas kawasan perencatan yang besar atas faktor kepekatan ekstrak air yang rendah, tetapi kajian ini dapat membuktikan bahawa ekstrak dari tumbuhan dapat dijadikan sebagai rawatan untuk merawat jangkitan *H. pylori* tanpa menggunakan rawatan antibiotik. Pernyataan ini boleh dibuktikan dengan lebih lanjut melalui kajian terkini yang melibatkan ekstrak bunga raya *Hibiscus rosa-sinensis* yang menggunakan pelarut etanol, heksana, etil asetat dan air. Menurut kajian tersebut, ekstrak *H. rosa-sinensis* yang menggunakan pelarut etil asetat telah menunjukkan aktiviti antibakteria tertinggi iaitu sebanyak 0.2-0.25 mg/mL berbanding dengan pelarut yang lain, diikuti dengan pelarut heksana iaitu sebanyak 0.75-1.0mg/mL dan pelarut etanol sebanyak 1.25-1.75 mg/mL manakala pelarut menggunakan air menunjukkan aktiviti perencatan pertumbuhan yang paling rendah (Ngan et. al 2021). Melalui contoh kajian tersebut, kita

dapat disimpulkan bahawa ekstrak tumbuhan dapat membuktikan bahawa ia mempunyai aktiviti antibakteria terhadap strain *H. pylori* walaupun kepekatan aktiviti tersebut kurang daripada ujian antibiotik.

Ekstrak air *P. minus* yang telah dikaji dapat menunjukkan kehadiran aktiviti antibakteria terhadap *H. pylori* atas beberapa faktor. Bahan fitokimia adalah bahan yang sering dihasilkan oleh *P. minus* pada bahagian tumbuhan yang berbeza seperti dedaun, batang dan akar untuk memberi tindak balas terhadap rangsangan luaran termasuklah jangkitan, pengambilan nutrisi atau perubahan keadaan cuaca (Yang et al. 2024). Melalui mekanisme yang berbeza, bahan-bahan ini dapat menunjukkan aktiviti antimikrob dengan pelbagai cara termasuklah kerosakan pada struktur sel bakteria, peningkatan keterlapan sel bakteria, kebocoran bahan-bahan dalam sel, pengubahsuaian pada dinding sel dan sel membran bakteria, kehilangan ATP, penyekatan sintesis protein, kerosakan intrasitoplasmik, gangguan pH, kerosakan DNA serta penyekatan 'quorum sensing' antara bakteria (Khameneh et al. 2021).

Perbandingan kehadiran zon perencatan antara *H. pylori* dan *S. aureus* boleh diterangkan melalui perbezaan pembentukan dinding sel antara kedua-dua bakteria tersebut. *H. pylori* adalah bakteria Gram negatif manakala *S. aureus* adalah bakteria Gram positif. Dinding sel bagi bakteria Gram positif dan Gram negatif adalah berbeza dari segi struktur di mana dinding sel bakteria Gram positif mempunyai membran sitoplasma di bawah ruang periplasmik yang mengandungi peptidoglikan. Bagi bakteria Gram negatif pula, ia mempunyai membran tambahan pada bahagian luar yang dikelilingi oleh lapisan lipopolisakarida (Ramaroson et al. 2022). Struktur-struktur pada jenis bakteria tersebut juga menyumbang kepada perbezaan ketebalan dinding sel di mana bakteria Gram positif mempunyai struktur dinding sel yang lebih kukuh dan tebal berbanding bakteria Gram negatif (Zhang et al. 2023). Pernyataan ini boleh dijadikan sebagai faktor bagi perbezaan pembentukan zon perencatan pada agar bagi *H. pylori* dan *S. aureus* di mana *H. pylori* terdapat pembentukan zon perencatan manakala *S. aureus* tidak mempunyai sebarang pembentukan zon perencatan. Walau bagaimanapun, dari segi penggunaan antibiotik pula, terdapat pernyataan mengatakan bahawa pelbagai jenis antibiotik termasuk β -laktam, kuinolon, kolistin dan antibiotik yang lain tidak dapat mencapai sasaran pada bakteria Gram negatif atas sebab kehadirannya membran luaran pada jenis bakteria tersebut. Kerintangan pada bakteria jenis ini boleh dicapai melalui perubahan pada membran luaran seperti perubahan sifat hidrofobik atau mutasi di porin. Ini membuatkan bakteria Gram negatif lebih rintang kepada antibiotik berbanding bakteria Gram positif kerana bakteria Gram positif tidak mempunyai lapisan yang penting ini (Breijyeh et al. 2023).

4. Kesimpulan

Hasil daripada asai antibakteria terhadap *H. pylori* yang telah dilakukan menggunakan ekstrak air *P. minus* telah menunjukkan hasil yang positif. Kajian mengenai aktiviti antibakteria *P. minus* terhadap *H. pylori* rintang antibiotik hendaklah dilakukan dengan lebih mendalam supaya dapat meningkatkan lagi penggunaan rawatan alternatif dalam melawan jangkitan bakteria ini pada masa akan datang. Pemprofilan sebatian kimia yang bertindak sebagai antibakteria terhadap *H. pylori* juga perlu dilakukan dan pencirian sebatian kimia tersebut perlu dilakukan.

Penghargaan

Semua pengarang menyatakan bahawa tiada konflik kepentingan dalam kajian ini. Kajian ini telah disokong oleh Universiti Kebangsaan Malaysia di bawah Geran Galakan Penyelidik Muda (GGPM) bernombor GGPM-2023-018.

Rujukan

- Ahmad, R., Baharum, S.N., Bunawan, H., Lee, M., Noor, N.M., Rohani, E.R., Ilias, N. & Zin, N.M. 2014. Volatile profiling of aromatic traditional medicinal plant, *Polygonum minus* in different tissues and its biological activities. *Molecules* 19(11): 19220–19242.
- Ansari, S. & Yamaoka, Y. 2020. *Helicobacter pylori* virulence factor cytotoxin-associated gene A (CagA)-mediated gastric pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences* 21(19): 7430.

- Bartpho, T.S., Wattanawongdon, W., Tongtawee, T., Paoiin, C., Kangwantas, K. & Dechsukhum C. 2020. Precancerous gastric lesions with *Helicobacter pylori* vacA⁺/babA2⁺/oipA⁺ genotype increase the risk of gastric cancer. *BioMed Research International* 2020: 243029.
- Christapher, P., Parasuraman, S., Christina, J., Asmawi, M.Z. & Vikneswaran, M. 2015. Review on *Polygonum minus*. Huds, a commonly used food additive in Southeast Asia. *Pharmacognosy Research* 7(1): 1-6.
- Hassim, N., Markom, M., Anuar, N., Dewi, K.H., Baharum, S.N. & Mohd Noor, N. 2015. Antioxidant and antibacterial assays on *Polygonum minus* extracts: Different extraction methods. *International Journal of Chemical Engineering* 2015: 10.
- Hossain, M.L., Lee, Y.L., Hammer, K., Hettiarachchi, D. & Locher, C. 2022. A review of commonly used methodologies for assessing the antibacterial activity of honey and honey products. *Antibiotics* 11(7): 975.
- Khameneh, B., Eskin, N.A.M., Iranshahy, M. & Fazly Bazzaz, B.S. 2021. Phytochemicals: A promising weapon in the arsenal against antibiotic-resistant bacteria. *Antibiotics* 10(9): 1044.
- Krzyżek, P., Paluch, E. & Gościniak, G. 2020. Synergistic therapies as a promising option for the treatment of antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. *Antibiotics* 9(10): 658.
- Liu, X., Lertsethtakarn, P., Mariscal, V.T., Yildiz, F. & Ottemann, K.M. 2024. Counterclockwise rotation of the flagellum promotes biofilm initiation in *Helicobacter pylori*. *mBio* 15(6): e00440-24.
- Martínez, L.E., O'brien, V.P., Leverich, C.K., Knoblaugh, S.E. & Salama, N.R. 2019. Nonhelical *Helicobacter pylori* mutants show altered gland colonization and elicit less gastric pathology than helical bacteria during chronic infection. *Infection and Immunity* 87(7): e00904-18.
- Ngan, L.T.M., Tan, M.T., Hoang, N.V.M., Thanh, D.T., Linh, N.T.T., Hoa, T.T.H., Nuong, N.T.M. & Hieu, T.T. 2021. Antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* L. red flower against antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and identification of the flower constituents. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 54(7): e10889.
- Oktem-Okullu, S., Karaman, T., Akcelik-Devici, S., Timucin, E., Sezerman, O.U., Mansur-Ozen, N., Buyukcolak, Y. & Tiftikci, A. 2023. Effect of switch status of *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein A on gastric diseases. *AMB Express* 13(109): 2023.
- Öztekin, M., Yılmaz, B., Ağagündüz, D. & Capasso, R. 2021. Overview of *Helicobacter pylori* infection: clinical features, treatment, and nutritional aspects. *Diseases* 9(4): 66.
- Ramaroson, M.L., Koutouan, C., Helesbeux, J.J., Le Clerc, V., Hamama, L., Geoffriau, E. & Briard, M. 2022. Role of phenylpropanoids and flavonoids in plant resistance to pests and diseases. *Molecules* 27(23): 8371.
- Sukri, A., Hanafiah, A., Yusoff, H., Shamsul Nizam, N. A., Nameyrra, Z., Wong, Z., & Raja Ali, R. A. 2022. Multidrug-resistant *Helicobacter pylori* strains: a five-year surveillance study and its genome characteristics. *Antibiotics* 11(10):1391.
- Uberti, A.F., Callai-Silva, N., Grahl, M.V.C., Piovesan, A.R., Nachtigall, E.G., Furini, C.R.G. & Carlini, C.R. 2022. *Helicobacter pylori* urease: Potential contributions to Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 23(6): 3091.
- Vahidi, S., Mirzajani, E., Norollahi, S.E., Aziminezhad, M. & Samadani, A.A. 2022. Performance of DNA methylation on the molecular pathogenesis of *Helicobacter pylori* in gastric cancer; targeted therapy approach. *Journal of Pharmacopuncture* 25(2): 88-100.
- Van Khien, V., Thang, D.M., Hai, T.M., Duat, N.Q., Khanh, P.H., Ha, D.T., Binh, T.T., Dung, H.D.Q., Trang, T.T.H. & Yamaoka, Y. 2019. Management of antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* infection: Perspectives from Vietnam. *Gut and Liver* 13(5): 483-497.
- Yang, Z., Deng, X., Yang, Z., Han, M., Ismail, N., Chan, K.W., Razis, A.F.A., Esa, N.M., Ho, K.L. & Bakar, M.Z.A. 2024. *Polygonum minus*: A tropical medicinal herb with vast applications in food, agricultural, and medicinal fields. *Food Bioscience* 60: 104511.
- Zhang, J., Su, P., Chen, H., Qiao, M., Yang, B. & Zhao, X. 2023. Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system. *Chemical Engineering Journal* 451(3): 138879.
- Zhao, Y., Cai, Y., Chen, Z., Li, H., Xu, Z., Li, W., Jia, J. & Sun, Y. 2021. SpoT-mediated NapA upregulation promotes oxidative stressinduced *Helicobacter pylori* biofilm formation and confers multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65(5): e00152-21.
- Zhou, S., Liu, B., Zheng, D., Chen, L., & Yang, J. 2025. VFDB 2025: an integrated resource for exploring anti-virulence compounds. *Nucleic Acids Research* 53(D1): D871–D877.

Kesan penyebuan biji benih oleh *Bacillus* spp terhadap percambahan dan pertumbuhan anak benih UKMRC2 di bawah tekanan abiotik

Wan Nur Farah Ain Wan Di¹, Farah Arina Abdul¹, Ahmad Razi Othman² & Noor Liyana Sukiran^{1,*}

¹Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Jabatan Kejuruteraan Kimia dan Proses, Fakulti Kejuruteraan dan Alam Bina, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: liyana@ukm.edu.my

Abstrak: Penggunaan bakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR) merupakan alternatif untuk mengurangkan kesan perubahan iklim. PGPR yang dipencilkan daripada persekitaran tercemar dapat meningkatkan pertumbuhan dan ketahanan tumbuhan. Kajian ini bertujuan untuk menilai keberkesanan dua bakteria yang dipencilkan dari kawasan berbeza sebagai agen penyebuan biji benih padi pada tahap percambahan di bawah tekanan abiotik. Biji benih UKMRC2 direndam semalaman di dalam kultur *Bacillus* sp. S1 dan *Bacillus subtilis* yang berkepekatan 10^7 CFU/mL dan diletakkan di dalam piring yang mengandungi larutan air, 20% PEG dan 100 mM NaCl. Parameter percambahan seperti peratus percambahan (GP), indeks kadar percambahan (GRI) dan indeks kekuatan benih (SVI) telah direkodkan. Hasil menunjukkan bahawa penyebuan dengan *Bacillus* sp. S1 mempercepatkan percambahan berbanding *B. subtilis* yang mengambil masa 3 hari. Penyebuan dengan *Bacillus* sp. S1 meningkatkan GP di bawah keadaan kawalan ($p < 0.05$) tetapi penyebuan dengan *B. subtilis* mengurangkan kesan tekanan kemasinan terhadap percambahan. Tiada perbezaan ketara diperhatikan pada nilai GRI manakala penyebuan dengan *B. subtilis* menunjukkan nilai SVI yang lebih tinggi berbanding *Bacillus* sp. S1. Kesimpulannya, penyebuan oleh *Bacillus* sp. S1 dan *B. subtilis* masing-masing memberi kesan positif terhadap percambahan dalam keadaan kawalan dan tekanan kemasinan. Penyelidikan lanjut perlu diteruskan untuk menentukan mekanisme pencilan bakteria dalam mempengaruhi percambahan dan pertumbuhan padi.

Kata kunci: *Bacillus* spp.; penyebuan biji benih; percambahan; tekanan abiotik; UKMRC2

Abstract: The use of plant growth-promoting bacteria (PGPR) is an alternative to mitigate the impact of climate change. PGPR isolated from contaminated environments can enhance plant growth and resilience. This study aimed to evaluate the effectiveness of two bacteria isolated from different locations as seed priming agents for rice germination under abiotic stresses. UKMRC2 seeds were soaked overnight in *Bacillus* sp. S1 and *Bacillus subtilis* cultures at a concentration of 10^7 CFU/mL and placed in petri dishes containing water, 20% PEG, and 100 mM NaCl solutions. Germination parameters such as germination percentage (GP), germination rate index (GRI), and seed vigour index (SVI) were recorded. The results showed that priming with *Bacillus* sp. S1 accelerated germination, whereas *B. subtilis* required three days. Priming with *Bacillus* sp. S1 significantly increased GP under control conditions ($p < 0.05$), while priming with *B. subtilis* reduced the effect of salinity stress on germination. No significant differences were observed in GRI, whereas priming with *B. subtilis* resulted in a higher SVI compared to *Bacillus* sp. S1. In brief, priming with *Bacillus* sp. S1 and *B. subtilis* improved germination under control conditions and salinity stress, respectively. Further research is needed to determine the bacterial mechanisms that influence rice germination and growth.

Keywords: Abiotic stress; *Bacillus* spp.; germination; seed priming; UKMRC2

1. Pengenalan

Rhizobia Penggalak Pertumbuhan Tanaman (PGPR) adalah kumpulan bakteria tanah berfaedah yang penting dalam ekosistem tanah-tumbuhan. Bakteria ini mendiami rhizosfera yang mengelilingi sistem akar tanaman yang sedang tumbuh (de la Fuente Cantó et al. 2020). Dalam persekitaran ini, PGPR terlibat dalam interaksi kompleks yang mempengaruhi pertumbuhan dan hasil tumbuhan. PGPR penting kerana ia dapat memperbaiki keadaan tanah, meningkatkan ketersediaan nutrien, menyokong pertumbuhan, dan menguatkan ketahanan tumbuhan terhadap serangan penyakit serta meningkatkan hasil tanaman (Gupta et al. 2021, Riaz et al. 2020). Penggunaan PGPR yang cekap sebagai agen biologi dan agen kawalan biologi merupakan pengganti yang sesuai untuk meminimumkan penggunaan agrokimia sintetik dalam pengeluaran tanaman. Ini berikutan peranan PGPR dalam meningkatkan nutrien tanah untuk pertumbuhan, merangsang biosintesis fitohormon seperti auksin, sitokinin dan giberelin serta meningkatkan gerak balas tumbuhan terhadap tekanan abiotik dan biotik (Basu et al. 2021).

Teknik penyebaran terhadap biji benih adalah rawatan yang mana biji benih direndam dengan PGPR tertentu untuk meningkatkan percambahan biji benih, meningkatkan ketahanan terhadap tekanan abiotik dengan merangsang fitohormon, pengawalaturan pertumbuhan dan bertindak sebagai agen kawalan bioinokulum dengan mendorong imuniti tumbuhan (Sarkar et al. 2021). Penyebaran benih ialah rawatan pra-penyemaian yang membolehkan benih bercambah dengan lebih cekap dan dibuktikan dapat bergerak balas terhadap penyakit dan perosak dengan lebih baik (McDonald 2000). Kini, penggunaan agen penyebaran biologi seperti PGPR sebagai komponen penting dalam amalan agronomi menunjukkan potensi yang memberangsangkan.

UKMRC2 adalah varieti padi yang terhasil daripada penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) melalui pendebungan terkawal antara spesis padi liar (*Oryza rufipogon*) dan padi tempatan (*Oryza sativa*), varieti MR219 (Wickneswari et al. 2014). Varieti ini mendapat permintaan yang tinggi dari petani seluruh Malaysia kerana keistimewaan yang terdapat padanya, iaitu tempoh kematangan yang singkat, kemandirian yang baik dalam banjir, menghasilkan nasi yang rendah kanji, kurang melekit, tekstur nasi yang lebih lembut dan mudah diasingkan berbanding nasi putih biasa. Varieti padi UKMRC2 juga mempunyai daya ketahanan yang tinggi terhadap penenggelaman namun tidak tahan kepada tekanan abiotik yang lain seperti kemarau dan kemasinan (Zainol et al. 2023).

Kebanyakan PGPR dipencilkan dari persekitaran tercemar yang tinggi dengan kepekatan logam berat atau bahan bukan organik kerana keupayaan mikrob ini untuk beradaptasi dengan keadaan tercemar. Kehadiran ciri tertentu pada bakteria membolehkannya membantu tumbuhan untuk bermandiri pada kawasan yang tidak kondusif. Kajian ini dilakukan bertujuan untuk menentukan keberkesanan dua bakteria yang dipencilkan daripada persekitaran tercemar terhadap percambahan biji benih UKMRC di bawah tekanan osmotik dan kemasinan.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Sumber bakteria

Sampel bakteria *Bacillus* sp. pencilan S1 (*Bacillus* sp. S1) dipencilkan dari Tasik Cempaka, Bangi, Selangor manakala *Bacillus subtilis* dipencilkan dari selut loji pemprosesan Ramly Food Industries Sdn. Bhd. yang terletak di Pulau Indah, Selangor.

2.2 Penyediaan kultur bakteria

Sampel bakteria *Bacillus* sp. S1 dan *B. subtilis* masing-masing dicalitkan di atas piring agar Luria-Bertani (LB) untuk mendapatkan koloni tunggal bakteria. Selepas dieram semalaman, satu koloni tunggal dipilih dan dimasukkan ke dalam 200 mL media cecair LB, kemudian dieram dengan goncangan selama 24 jam. Kemudian, proses pencairan bersiri dilakukan untuk mendapatkan julat kepekatan bakteria. Sebanyak 100 µL sampel dari setiap pencairan disebarkan ke atas piring agar yang berasingan. Piring agar tersebut dieram semalaman pada suhu 37°C untuk pertumbuhan bakteria. Koloni yang terhasil dikira secara manual dan populasi bakteria dalam sampel asal dikira menggunakan formula berikut:

$$\text{Unit pembentukan koloni, CFU/mL} = \frac{\text{Bilangan koloni} \times \text{Faktor Pencairan}}{\text{Isipadu yang dipindahkan (mL)}}$$

2.3 Rawatan penyejukan biji benih

Rawatan penyejukan biji benih dilakukan berdasarkan Shaffique et al. (2024) dengan sedikit pengubahsuaian. Biji benih UKMRC2 disteril dengan larutan 2.5% natrium hipoklorit dan 70% etanol masing-masing selama 2 min dan 1 min sebelum dibilas dengan air suling steril sebanyak 3 kali. Biji benih yang terapung dibuang manakala biji benih yang tenggelam digunakan. Kultur bakteria berkepekatan 10^7 CFU/mL diempar pada kelajuan 10,000 rpm selama 3 min untuk mendapatkan peletnya. Pelet yang terhasil diampai dengan air suling steril. Biji benih dibahagikan kepada dua bahagian, iaitu biji benih kawalan tanpa pelet bakteria, di mana air suling digunakan untuk merendam biji benih dan biji benih rawatan yang direndam bersama pelet bakteria. Biji benih direndam semalaman dan disimpan di tempat yang gelap.

2.4 Rawatan tekanan abiotik

Dua jenis rawatan dikenakan ke atas biji benih, iaitu tekanan osmotik menggunakan polietilena glikol (PEG) dan tekanan kemasinan menggunakan natrium klorida (NaCl). Sehela kertas turas diletakkan di dalam piring Petri dan sepuluh biji benih diletakkan ke dalam setiap piring tersebut. Biji benih kemudian dibahagikan kepada enam rawatan seperti Jadual 1:

Jadual 1. Pembahagian rawatan biji benih.

Bil	Jenis Rawatan
1	Kawalan (Air suling)
2	Kawalan (Pelet mikrob)
3	Pelet mikrob + 20% PEG
4	Air suling + 20% PEG
5	Pelet mikrob + 100 mM NaCl
6	Air suling + 100 mM NaCl

Bagi rawatan 3 sehingga 6, sebanyak 5 mL larutan PEG 6000 atau 100 mM NaCl ditambah ke atas kertas turas manakala air suling pula digunakan bagi kawalan (rawatan 1 dan 2). Reka bentuk eksperimen yang digunakan dalam kajian ini adalah secara reka bentuk rawak sepenuhnya (CRD), di mana tiga replikasi telah disediakan bagi setiap jenis rawatan. Semua eksperimen dilakukan di dalam kebuk laminar. Selepas rawatan selesai, piring petri diletakkan pada suhu bilik untuk pemerhatian.

2.5 Pemerhatian parameter percambahan

Percambahan biji benih direkodkan setiap hari selama 8 hari. Biji benih dianggap telah bercambah apabila terdapatnya kemunculan radikel. Panjang pucuk dan radikel akar diukur pada hari ke-8. Parameter percambahan diukur menggunakan formula berdasarkan Shaffique et al. (2024):

$$\text{Peratus percambahan (GP)\%} = \frac{\text{Bilangan biji benih bercambah}}{\text{Jumlah biji benih}} \times 100$$

$$\text{Indeks kadar percambahan (GRI)} = \frac{\text{Jumlah biji benih bercambah setiap hari (GP1 hingga GP8)}}{\text{Jumlah biji benih}}$$

$$\text{Indeks kekuatan benih (SVI)} = \text{GP\%} \times \text{Panjang anak benih (panjang akar + pucuk)}$$

2.6 Analisis statistik

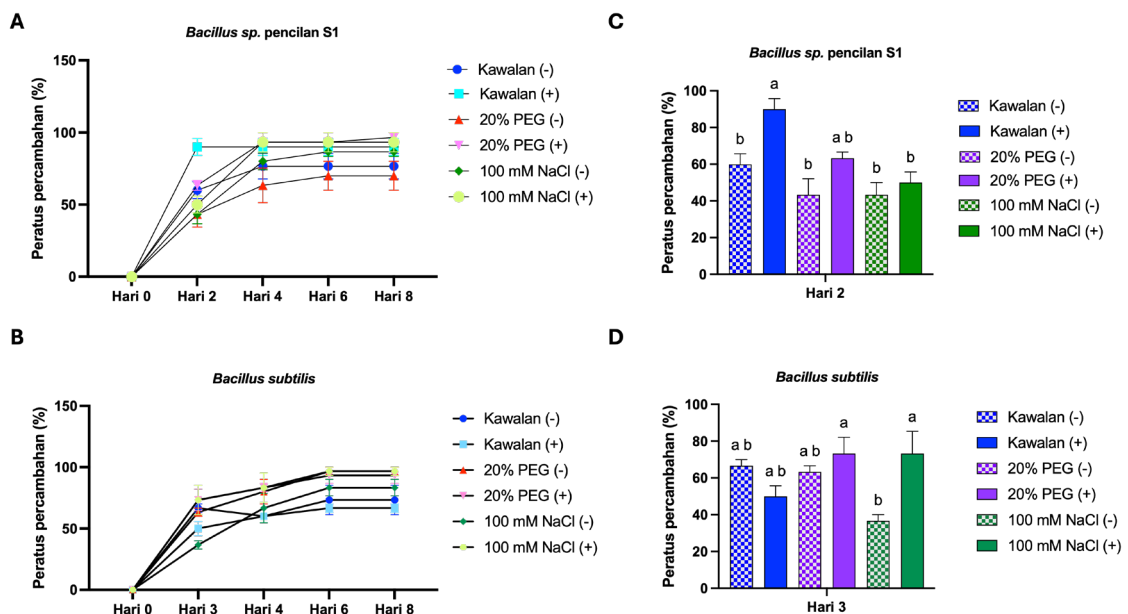
Data direkodkan ke dalam Excel dan analisis varians (ANOVA) dua hala dijalankan menggunakan perisian GraphPad Prism 10. Ini diikuti dengan ujian Tukey untuk membandingkan purata antara rawatan, di mana nilai perbezaan yang signifikan ditetapkan kurang daripada 0.05 ($p \leq 0.05$).

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Peratus percambahan biji benih di bawah tekanan osmotik dan kemasinan

Peratus percambahan merupakan salah satu parameter penting dalam menilai keberkesanan rawatan terhadap percambahan biji benih. Nilai ini mencerminkan kadar kejayaan biji benih untuk bercambah di bawah keadaan tekanan abiotik yang ditetapkan. Rajah 1 menunjukkan peratus percambahan biji benih yang menerima rawatan penyebaran bakteria yang berbeza di bawah tekanan osmotik dan kemasinan. Biji benih yang dirawat dengan *Bacillus* sp. S1 bercambah dengan lebih cepat berbanding *B. subtilis*, di mana masing-masing telah mula bercambah pada hari kedua (Rajah 1a) dan hari ketiga (Rajah 1b).

Dalam keadaan kawalan, biji benih yang dirawat dengan *Bacillus* sp. S1 menunjukkan peratus percambahan yang lebih tinggi ($p < 0.05$), iaitu sebanyak 90% berbanding biji benih yang tidak dirawat dengan bakteria, yang menunjukkan peratus percambahan kurang daripada 80% sepanjang tempoh pemerhatian (Rajah 1a dan 1c). Hasil ini menunjukkan bahawa tanpa tekanan abiotik, penyebaran biji benih dengan bakteria *Bacillus* sp. S1 memberikan kesan positif dalam meningkatkan kadar percambahan biji benih UKMRC2. Sebaliknya, penyebaran dengan *B. subtilis* telah merendahkan peratus percambahan UKMRC2 (50%), biarpun perbezaannya tidak ketara secara statistik (Rajah 1d).



Rajah 1. Peratus percambahan biji benih UKMRC-2 di bawah rawatan 20% PEG dan 100 mM NaCl.

(A) dan (B) Peratus percambahan biji benih yang menerima rawatan penyebaran bakteria berbeza sepanjang 8 hari. Peratus percambahan pada (C) hari kedua untuk *Bacillus* sp. S1 dan (D) hari ketiga untuk *B. subtilis*.

Nilai min bagi setiap biji benih yang tidak berkongsi abjad yang sama adalah berbeza secara signifikan berdasarkan ujian Tukey ($p < 0.05$). Simbol (+) merupakan biji benih yang mengalami penyebaran dengan bakteria manakala simbol (-) merupakan biji benih yang tidak menerima rawatan penyebaran.

Rawatan penyebaran biji benih dengan *B. subtilis* telah meningkatkan peratus percambahan di bawah tekanan osmotik dan kemasinan (Rajah 1d). Namun begitu, hanya percambahan di bawah rawatan NaCl meningkat dengan ketara ($p < 0.05$). Ini mencadangkan bahawa penyebaran dengan *B. subtilis* pada hari kedua, biji benih yang mengalami penyebaran dengan *Bacillus* sp. S1 menunjukkan peratus percambahan biji benih yang lebih tinggi apabila dikenakan rawatan 20% PEG (63.3%) dan 100 mM

NaCl (50%) berbanding biji benih tanpa penyejukan (Rajah 1c). Walau bagaimanapun, perbezaan ini tidak ketara secara statistik. Hasil ini mencadangkan bahawa penyejukan biji benih dengan *Bacillus* sp. S1 membantu dalam meningkatkan kadar percambahan pada kepekatan PEG yang tinggi. Bakteria yang bertindak sebagai PGPR ini menghasilkan fitohormon seperti asid indol asetik (IAA) yang merangsang pemanjangan awal akar untuk meningkatkan penyerapan air dan nutrien yang diperlukan untuk percambahan (Chieb et al. 2023). Namun begitu, tiada perbezaan ketara dapat dilihat pada biji benih yang dikenakan rawatan 20% PEG dan 100 mM NaCl.

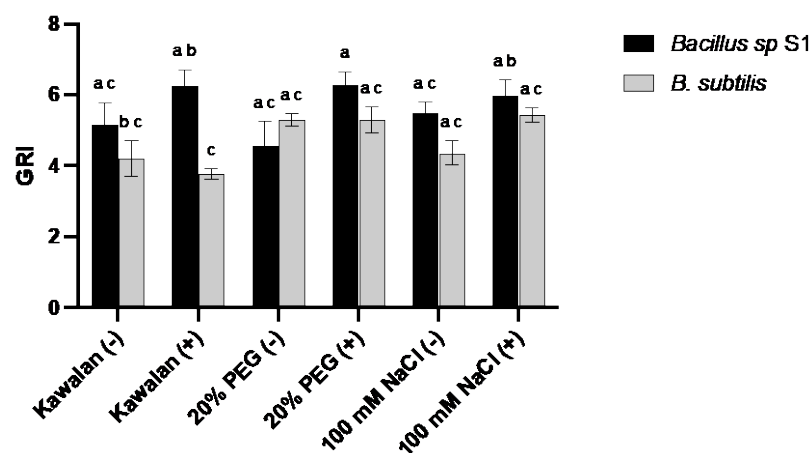
Kepekatan NaCl yang tinggi memberikan kesan toksik melalui pengumpulan ion Na^+ dan Cl^- di dalam sel (Ghasemi-Omran et al., 2021). *B. subtilis* mungkin membantu mengurangkan kesan negatif dari tekanan osmotik dengan menghasilkan enzim dan metabolit yang melindungi sel daripada kerosakan akibat ketidakseimbangan ion. PGPR dapat meningkatkan aktiviti enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan peroksidase (POD), yang berfungsi melindungi sel daripada kerosakan akibat tekanan oksidatif yang berpunca daripada pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) di bawah tekanan (Chiappero et al. 2019).

Kepekatan PEG dan NaCl yang tinggi melambatkan percambahan pada peringkat awal. Ini kerana peningkatan asid absisik (ABA) merencat percambahan dan menyahaktifkan proses metabolik di bawah tekanan osmotik yang tinggi dengan cara menghalang aktiviti enzim yang penting untuk percambahan seperti amilase, yang berperanan dalam menguraikan simpanan makanan dalam benih (Koskosidis et al. 2020; Kunwar et al. 2024). Namun, setelah biji benih mengatasi tekanan awal, kepekatan hormon giberellin (GA) mula meningkat, laluan metabolik diaktifkan dan tenaga simpanan digunakan dengan lebih cekap, sekaligus meningkatkan peratus percambahan pada rawatan PEG dan NaCl (Ravindran et al. 2019; Wang et al. 2024).

3.2 Indeks kadar percambahan (GRI)

Indeks kadar percambahan adalah salah satu ukuran yang digunakan untuk menilai kecekapan dan kelajuan percambahan biji benih. Indeks ini memberi gambaran yang lebih menyeluruh berbanding peratusan percambahan, kerana ia menggabungkan faktor masa percambahan (Abd Rahman et al. 2023).

Secara umumnya, biji benih yang menerima penyejukan *Bacillus* sp. S1 menunjukkan GRI yang lebih tinggi berbanding *B. subtilis* (Rajah 2). Perbezaan ketara ($p < 0.05$) dapat dilihat pada GRI di bawah keadaan kawalan dengan penyejukan bakteria. Ini bersesuaian dengan tempoh percambahan yang lebih cepat pada biji benih yang menerima penyejukan *Bacillus* sp. S1, iaitu pada hari kedua (Rajah 1a). Selain itu, nilai GRI bagi biji benih yang menerima penyejukan *Bacillus* sp. S1 dan *B. subtilis* di bawah rawatan PEG dan NaCl menunjukkan sedikit peningkatan berbanding keadaan kawalan tanpa penyejukan.



Rajah 2. Indeks kadar percambahan (GRI) biji benih UKMRC2 di bawah tekanan abiotik.

Nilai min bagi setiap biji benih yang tidak berkongsi abjad yang sama adalah berbeza secara signifikan berdasarkan ujian Tukey ($p < 0.05$). Simbol (+) merupakan biji benih yang mengalami penyejukan dengan bakteria manakala simbol (-) merupakan biji benih yang tidak menerima rawatan penyejukan.

Dalam keadaan tekanan osmotik dan kemasinan, penyebaran dengan PGPR dapat membantu mengurangi kesan negatif terhadap kadar percambahan dengan menggalakkan penyerapan air dan memperbaiki kestabilan membran sel. Bukan itu sahaja, PGPR memainkan peranan dalam mengehadkan penyerapan ion toksik seperti Na^+ dan Cl^- serta meningkatkan pengambilan ion penting seperti K^+ (Pan et al. 2022), sekaligus mengekalkan keseimbangan nutrien di dalam biji benih. Walaupun indeks di bawah rawatan ini tidak berbeza dengan ketara, kehadiran bakteria ternyata memberikan kelebihan tambahan kepada biji benih dalam menghadapi persekitaran yang kurang kondusif.

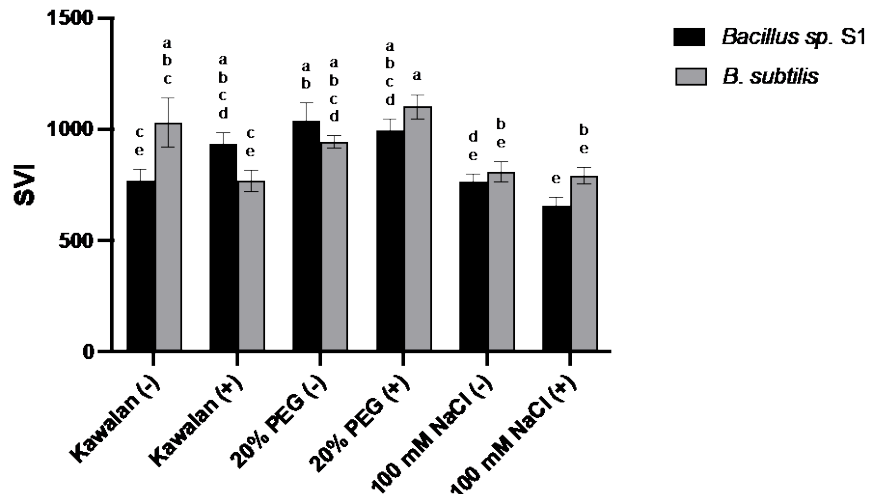
3.3 Indeks kekuatan benih (SVI)

Indeks kekuatan benih adalah ukuran kuantitatif yang digunakan untuk menilai kekuatan atau keupayaan benih untuk bercambah dan menghasilkan anak benih yang sihat. Ia digunakan untuk menggambarkan hubungan antara peratus percambahan dan pertumbuhan pucuk dan akar anak benih.

Di bawah keadaan kawalan, tiada perbezaan ketara pada nilai SVI biji benih yang tidak menerima dan menerima rawatan penyebaran *Bacillus* sp. S1 mahupun *B. subtilis* (Rajah 3). Begitu juga di bawah rawatan PEG dan NaCl, di mana nilai SVI bagi biji benih yang menerima penyebaran *B. subtilis* lebih tinggi berbanding *Bacillus* sp. S1. Walau bagaimanapun, nilai SVI pada rawatan 20% PEG dengan penyebaran *B. subtilis* adalah lebih tinggi ($p < 0.05$) berbanding kawalan dengan agen penyebaran yang sama. Ini menunjukkan bahawa rawatan PEG dan penyebaran *B. subtilis* meningkatkan pertumbuhan anak benih UKMRC2.

PEG turut juga digunakan sebagai agen penyebaran dan didapati dapat meningkatkan pengekspresan gen dan enzim yang berkaitan dengan aktiviti antioksidan seperti SOD, POD dan CAT (Chiappero et al. 2019; Wang et al. 2024). Dalam kajian ini, rawatan PEG mungkin membantu pertumbuhan anak benih yang telah menerima penyebaran *B. subtilis*. Ini mungkin dapat menjelaskan nilai SVI yang tinggi pada biji benih yang dirawat dengan 20% PEG kerana peningkatan aktiviti antioksidan secara tidak langsung membantu meningkatkan pemanjangan akar dan pucuk padi.

Berbanding dengan biji benih yang menerima penyebaran *Bacillus* sp. S1, nilai SVI pada rawatan 100 mM NaCl adalah lebih rendah ($p < 0.05$) apabila dibandingkan dengan kawalan dan rawatan 20% PEG pada rawatan penyebaran yang sama. Ini menunjukkan bahawa pertumbuhan anak benih yang menerima tekanan kemasinan agak terjejas biarpun mengalami penyebaran dengan *Bacillus* sp. S1. Tekanan garam mengaruh penghasilan ABA yang boleh menghalang pemanjangan akar. Kandungan garam yang tinggi juga menyebabkan peningkatan ROS seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal superoksida (O_2^-), yang boleh menyebabkan kerosakan sel akar dan menghalang pertumbuhan akar (Chiappero et al. 2019). Hasil yang diperolehi ini mencadangkan bahawa penggunaan *Bacillus* sp. S1 tidak sesuai untuk meningkatkan pertumbuhan anak benih UKMRC2 di bawah tekanan kemasinan.



Rajah 3. Indeks kekuatan benih (SVI) UKMRC2 di bawah tekanan abiotik.

Nilai min bagi setiap biji benih yang tidak berkongsi abjad yang sama adalah berbeza secara signifikan berdasarkan ujian Tukey ($p < 0.05$). Simbol (+) merupakan biji benih yang mengalami penyebuan dengan bakteria manakala simbol (-) merupakan biji benih yang tidak menerima rawatan penyebuan.

4. Kesimpulan

Kajian ini menunjukkan bahawa penggunaan bakteria *Bacillus sp. S1* dan *B. subtilis* sebagai PGPR memberikan kesan yang berbeza terhadap percambahan biji benih UKMRC2 sama ada dalam keadaan kawalan atau di bawah tekanan osmotik dan kemasinan. Rawatan penyebuan UKMRC2 dengan *Bacillus sp. S1* mempercepatkan percambahan biji benih pada keadaan kawalan berbanding penyebuan dengan *B. subtilis*. Di bawah keadaan tekanan abiotik pula, penyebuan dengan *B. subtilis* meningkatkan percambahan UKMRC2 di bawah tekanan kemasinan. Hasil ini mencadangkan bahawa pencilan bakteria daripada persekitaran yang tercemar berpotensi untuk dijadikan sebagai penggalak percambahan biji benih. Kajian lanjut diperlukan untuk mengetahui keupayaan pencilan bakteria ini dalam merangsang penghasilan fitohormon dan sebatian fitokimia yang terlibat dalam pertumbuhan padi.

Penghargaan

Penulis ingin merakamkan ribuan terima kasih kepada kakitangan Makmal Bioproses dan Makmal Persekitaran di Fakulti Kejuruteraan dan Alam Bina, serta Makmal Pengajaran Biologi Molekul di Fakulti Sains dan Teknologi yang memberikan bantuan sepanjang kajian ini dijalankan.

Rujukan

- Abd Rahman, F. S., Ugap, A. W., Ab Ghaffar, M. B., Hashim, H. and Maznan A.F. 2023. Pengesanan kualiti biji benih jagung bijian. *Buletin Teknologi MARDI* 37: 53-65.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S. and Enshasy, H. E. 2021. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability* 13(3):1140.
- Chiappero, J., Cappellari, L. del R., Sosa Alderete, L. G., Palermo, T. B. and Banchio, E. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Industrial Crops and Products* 139: 111553.
- Chieb, M. & Gachomo, E. W. 2023. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC Plant Biology* 23: 407.

- de la Fuente Cantó, C., Simonin, M., King, E., Moulin, L., Bennett, M. J., Castrillo, G. and Laplaze, L. 2020. An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *The Plant Journal* 103(3): 951–964.
- Ghasemi-Omran, V. O., Ghorbani, A. & Sajjadi-Otaghsara, S. A. 2021. Melatonin alleviates NaCl-induced damage by regulating ionic homeostasis, antioxidant system, redox homeostasis, and expression of steviol glycosides-related biosynthetic genes in *in vitro* cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 57(2): 319–331.
- Gupta, A., Bano, A., Rai, S., Dubey, P., Khan, F., Pathak, N. and Sharma, S. 2021. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Sustainable Agriculture to Rescue the Vegetation from the Effect of Biotic Stress: a Review. *Letters in Applied NanoBioScience* 10(3): 2459-2465.
- Koskosidis, A., Khah, E., Mavromatis, A., Pavli, O. and Vlachostergios, D. N. 2020. Effect of PEG-induced drought stress on germination of ten chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 48(1): 294–304.
- Kunwar, U. B., Wen, J., Subedi, R., Bist, N. S. and Pandit, N. R. 2024. Adaptations of rice seed germination to drought and hypoxic conditions: Molecular and physiological insights. *Seeds* 3(4): 656-676.
- McDonald, M. B. 2000. Seed Priming. In *Seed Technology and its Biological Basis*. pp. 287-325. CRC Press.
- Pan, J., Xue, X., Huang, C., Peng, F., Liao, J., Ma, S., You, Q. and Wang, T. 2022. Salt tolerance strategies of *Nitraria tangutorum* Bobr. and *Elaeagnus angustifolia* Linn. determine the inoculation effects of microorganisms in saline soil conditions. *Agronomy* 12(4): 913.
- Ravindran, P. and Kumar, P.P. 2019. Regulation of seed germination: The involvement of multiple forces exerted via gibberellic acid signaling. *Molecular Plant* 12(1): 24–26.
- Riaz, U., Murtaza, G., Anum, W., Samreen, T., Sarfraz, M. and Zulqernain Nazir, M. 2020. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizers and Biopesticides. In *Microbiota and Biofertilizers: A Sustainable Continuum for Plant and Soil Health*. pp. 181–196. Springer International Publishing.
- Sarkar, D., Rakshit, A., Al-Turki, A. I., Sayyed, R. Z. and Datta, R. 2021. Connecting bio-priming approach with integrated nutrient management for improved nutrient use efficiency in crop species. *Agriculture* 11(4): 372.
- Shaffique, S., Imran, M., Adhikari, A., Injamum-Ul-Hoque, M., Zainurin, N., Peter, O., Alomrani, S. O., Aaqil Khan, M., Kang, S.M. & Lee, I. J. 2024. Unraveling the new member *Bacillus pumilus* SH-9 of Bacillaceae family and its potential role in seed biopriming to mitigate drought stress in *Oryza sativa*. *Plant Stress* 11: 100318.
- Wang, R., Li, C., Zeng, L., Liu, L., Xi, J. & Li, J. 2024. Polyethylene glycol priming enhances the seed germination and seedling growth of *Scutellaria baicalensis* Georgi under salt stress. *Plants* 13(5): 565
- Wickneswari, R. and Bhuiyan, M. A. R. 2014. Exploiting wild accessions for development of high yielding new rice genotypes. *Malaysian Applied Biology* 43(2): 89–95.
- Zainol, R. M., Ashri, N. A., Rosmi, M. N. M. & Ibrahim, M. S. N. 2023. The effect of using quality rice seed varieties on rice cultivation activities. *Journal of Food Technology Research* 10(3): 62–74.

**Kesan Efluen Kilang Kelapa Sawit (POME) Terhadap Pertumbuhan dan
Populasi Proteobakteria Tanah Tanaman Pokok Cili**
(The Impact of Palm Oil Mill Effluent (POME) on Growth and Population of Soil
Proteobacteria of Chili Plant Vegetation)

Atiqah Farhana Binti Azri¹ & Nurul Yuziana Mohd Yusof^{2,*}

¹*Program Bioteknologi Tumbuhan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

²*Jabatan Sains Bumi dan Alam Sekitar, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: yuziana@ukm.edu.my*

Abstrak: Industri kelapa sawit menyumbang kepada ekonomi Malaysia, namun pemprosesan kelapa sawit menghasilkan sejumlah efluen kilang kelapa sawit (POME) yang besar dan menyumbang kepada pencemaran alam sekitar. Walaupun POME mengandungi bahan organik dan nutrien yang berpotensi meningkatkan kesuburan tanah, kesannya terhadap ekosistem mikrob tanah serta pertumbuhan tanaman masih kurang jelas, terutamanya bagi jenis POME yang berbeza. Kajian ini dijalankan untuk menilai kesan aplikasi POME mentah dan enapcemar teraktif terhadap pertumbuhan tanaman cili serta perubahan populasi bakteria tanah. Tiga kumpulan rawatan dikaji, iaitu kawalan (tanpa POME), POME mentah, dan POME enapcemar teraktif yang masing-masing diaplikasikan ke atas tanaman cili dalam sistem fertigasi selama empat minggu. Parameter pertumbuhan tanaman diukur berdasarkan ketinggian pokok dan lebar daun, manakala perubahan populasi bakteria tanah yang diwakili oleh Proteobakteria, dianalisis menggunakan kaedah qPCR dengan penanda gen 16S rRNA. Hasil kajian menunjukkan bahawa kumpulan rawatan POME tidak memberi kesan yang signifikan terhadap kadar pertumbuhan pokok cili berbanding dengan kumpulan kawalan. Dari segi komuniti mikrob tanah, POME mentah meningkatkan populasi Proteobakteria, manakala POME enapcemar teraktif menunjukkan variasi kesan dengan kecenderungan untuk mengurangkan populasi bakteria tersebut. Kajian ini menunjukkan bahawa POME mentah berpotensi sebagai sumber bahan organik untuk menyokong komuniti mikrob tanah, walaupun tidak menunjukkan kesan jangka pendek yang ketara terhadap pertumbuhan tanaman cili.

Kata kunci: Efluen kilang kelapa sawit; mikrobiom tanah; proteobakteria; pokok cili; qPCR

Abstract: Palm oil industry significantly contributes to Malaysia's economy, but generates large volumes of palm oil mill effluent (POME) that can cause environmental pollution. Although POME contains organic matter and nutrients potentially beneficial for soil fertility, its effects on soil microbiome and plant growth remain unclear, particularly for different types of POME. This study evaluated the effects of raw POME and activated sludge POME on chili plant growth and changes in soil bacterial populations. Three treatment groups were studied: control (without POME), raw POME, and activated sludge POME, which each applied to chili plants in a fertigation system for four weeks. Plant growth parameters (height and leaf width) were measured weekly, while soil bacterial populations, represented by Proteobacteria, were analysed using qPCR with 16S rRNA gene primers. Results showed no significant differences in plant growth between treatments. However, raw POME increased the Proteobacteria population, likely due to its high organic matter content, while activated sludge POME showed variable effects, with a tendency to reduce their populations. This study suggests that raw POME has potential as a source of organic matter to support soil microbial communities, despite showing no significant short-term effect on chili plant growth.

Keywords: Palm oil mill effluent; soil microbiome; proteobacteria; chili plant; qPCR

1. Pengenalan

Industri kelapa sawit adalah sektor penting yang menyumbang kepada ekonomi Malaysia melalui penghasilan minyak sawit yang tinggi dan berkualiti ke seluruh dunia. Minyak sawit digunakan secara meluas dalam pelbagai industri seperti makanan, kosmetik, farmaseutikal, dan biodiesel (Maluin et al. 2020). Namun, sejumlah besar efluen kilang kelapa sawit (POME) yang dihasilkan setiap hari menjadi cabaran utama dalam pengurusan sisa industri ini. Pemprosesan tandan buah segar (FFB) menghasilkan 60-67% POME bagi setiap tan FFB (Suprihatin et al. 2024). Pada tahun 2023, Malaysia menghasilkan 18.55 juta tan minyak sawit mentah (CPO), meningkat 0.5% daripada 18.45 juta tan pada tahun 2022 (MPOB, 2023). Memandangkan setiap tan CPO yang dihasilkan menghasilkan kira-kira 2.5 hingga 3.5 tan POME, dianggarkan Malaysia telah menghasilkan antara 46.4 hingga 64.9 juta tan POME pada tahun 2023.

Hal ini menekankan keperluan pengurusan sisa bagi menjamin kelestarian industri sawit negara. Terdapat kajian yang menggunakan POME sebagai baja untuk meningkatkan produktiviti tanaman (Shilev et al. 2024). Namun, pemprosesan POME sebagai baja selalunya memerlukan kos, masa, dan tenaga kerja yang tinggi. Permasalahan utama yang mendorong kajian ini ialah kekurangan pemahaman mengenai kesan aplikasi langsung POME mentah dan POME enapcemar teraktifterhadap pertumbuhan tanaman serta komuniti mikrob tanah.

POME mengandungi nutrien penting seperti nitrogen, fosforus, natrium, magnesium, dan kalsium, menjadikannya berpotensi untuk digunakan dalam pertanian (Okereke et al. 2020). Namun, ia juga mengandungi kandungan organik yang tinggi, menyumbang kepada nilai permintaan oksigen kimia (*chemical oxygen demand*; COD) dan nilai permintaan biologi (*biological oxygen demand*; BOD) yang besar (Mohd Kamil et al. 2020). POME yang tidak dirawat mempunyai kesan yang lebih besar kepada alam sekitar berbanding POME yang telah menjalani proses rawatan (Low et al. 2021). Oleh itu, pembuangan POME ke sungai tanpa rawatan adalah dilarang di bawah Akta Kualiti Alam Sekitar 1974 (Razak et al. 2022).

Dalam ekosistem tanah, bakteria memainkan peranan penting dalam kitaran nutrien, penguraian bahan organik, dan menggalakkan kesihatan tumbuhan. Proteobakteria, salah satu kumpulan utama bakteria tanah, adalah penting dalam proses-proses ini dan boleh menjadi penunjuk kesihatan dan kesuburan tanah. Memahami bagaimana aplikasi POME memberi kesan kepada komuniti bakteria ini adalah penting untuk menilai potensi POME sebagai bahan tambahan dalam pertanian lestari. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk: (1) Menilai pengaruh POME terhadap pertumbuhan pokok cili melalui pengukuran tinggi pokok dan lebar daun; dan (2) Menentukan kesan rawatan POME terhadap komuniti Proteobakteria dalam tanah tanaman pokok cili terawat melalui analisis PCR-kuantitatif (qPCR).

2. Bahan dan Kaedah

2.1. Bahan Kajian

Sampel POME mentah dan sampel POME enapcemar teraktifdiambil daripada lokasi loji biogas Cenergi SEA Sdn. Bhd., Teluk Intan, Perak pada 29 Ogos 2023. POME mentah merupakan efluen yang belum dirawat yang biasanya mempunyai pH 3.4-5.2, BOD 10,250-43,750 mg/L, COD 15,000-100,000 mg/L, dan jumlah pepejal terampai (TSS) sebanyak 5,000-54,000 mg/L (Mohammad et al. 2021). Manakala POME enapcemar teraktifpula dihasilkan selepas pemprosesan POME mentah melalui proses penyejukan dan pengurangan asid yang sepatutnya mempunyai sifat pH 8.1, BOD 658 mg/L, COD 2,450 mg/L, dan nilai TSS sebanyak 3,540 mg/L (Wun et al., 2017).

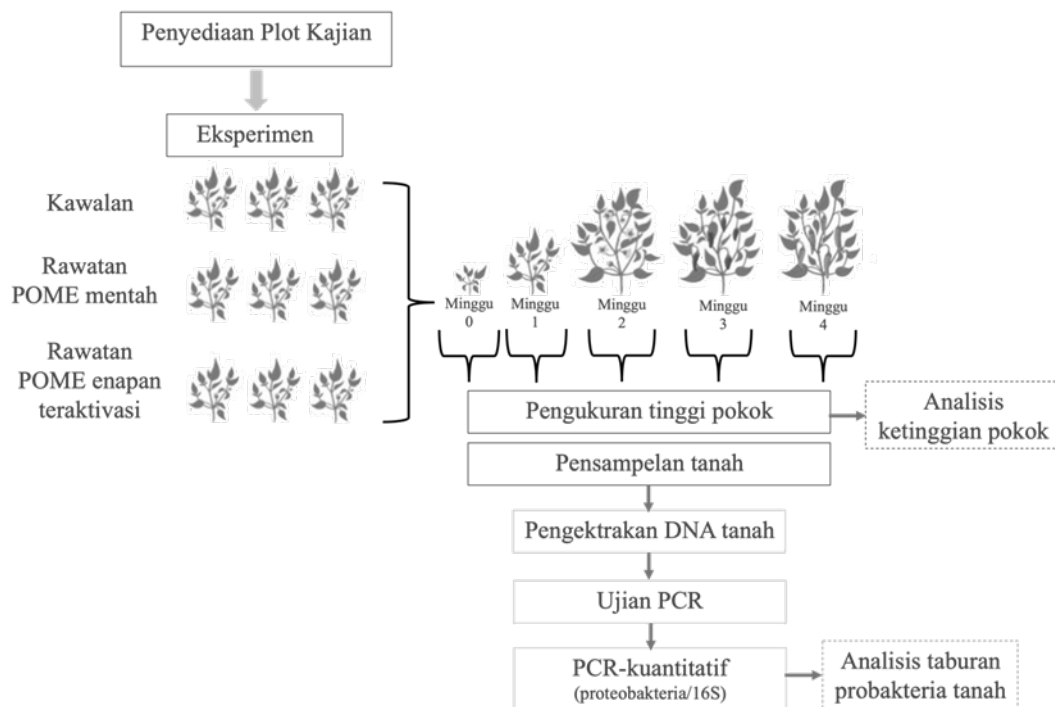
Sembilan anak pokok cili yang seragam diperolehi daripada Kompleks Rumah Tumbuhan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), di mana kerja percambahan dan penyemaian biji benih telah dilakukan oleh pekerja kompleks tersebut. Untuk pengekstrakan DNA dan analisis PCR, kit pengekstrakan DNA tanah PrimeWay (1st BASE Sdn. Bhd., Malaysia), KOD FX dan THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (Toyobo, Jepun) digunakan. Set pencetus bagi mensasarkan kawasan pengekodan gen rRNA 16S bakteria umum dan gen rRNA16S spesies Proteobakteria yang digunakan dalam analisis PCR dan PCR-kuantitatif dalam eksperimen ini adalah seperti yang berikut:

Jadual 1. Jujukan pencetus yang terlibat dalam tindak balas penjujukan berkitar.

Pencetus	Jujukan pencetus (5'→3')	Saiz (bp)	Rujukan
16S_Uni_R	GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	~400	Walter et al. 2001
16S_Uni_F	TCC TACGGGAGGCAGCAGT		
proteoBac_F	AACMGGATTAGATACCCCKG	~300-400	Francioli et al. 2021
proteoBac_R	AGGGTTGCGCTCGTTG		

2.2. Reka Bentuk Eksperimen

Kajian yang dijalankan melibatkan eksperimen rawatan POME terhadap pokok cili dari segi aspek tumbesaran pokok dan populasi bakteria tanah khususnya Proteobakteria seperti yang digambarkan dalam Rajah 1. Sembilan anak pokok cili disusun mengikut kumpulan rawatan: kawalan (tanpa POME), POME mentah, dan POME enapan teraktivasi, dengan tiga anak pokok bagi setiap kumpulan. Setiap polibeg dilabel dengan pen penanda kalis air untuk mengelakkan kekeliruan semasa pengambilan data. Sistem fertigasi automatik digunakan untuk menyiram tanaman sebanyak empat kali sehari selama satu minit setiap sesi, bagi memastikan bekalan air dan nutrien mencukupi. Polibeg disusun dengan jarak yang sama untuk memastikan setiap anak pokok menerima jumlah cahaya matahari yang seragam.

**Rajah 1. Carta alir kaedah kajian.**

2.3. Aplikasi POME dan Pengukuran Pertumbuhan Tanaman

Rawatan POME diaplikasikan setiap minggu selepas pensampelan tanah dan pengukuran parameter pertumbuhan pokok. Jumlah isipadu POME yang diberikan bergantung kepada minggu eksperimen, meningkat dari 2.0 mL hingga 3.5 mL bagi POME mentah dan 5.0 mL hingga 6.5 mL bagi POME enapcemar teraktif sepanjang tempoh empat minggu. POME diaplikasikan dengan berhati-hati di sekeliling polibeg, pada jarak paling jauh dari akar pokok untuk mengelakkan kerosakan. Parameter pertumbuhan tanaman (ketinggian pokok dan lebar daun) diukur setiap minggu sebelum aplikasi POME. Ketinggian pokok diukur dari pangkal batang hingga ke pucuk tertinggi, manakala lebar daun diukur melalui pemilihan tiga helai daun utama pada setiap pokok di bahagian terluas.

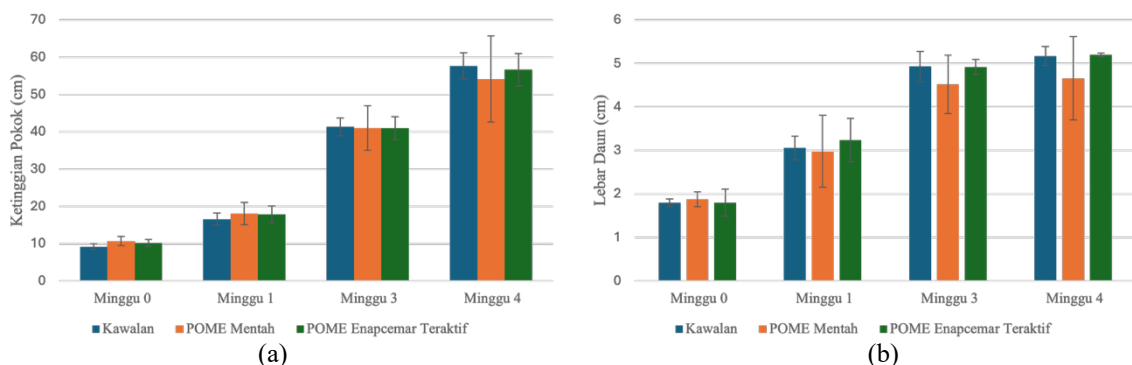
2.4. Pensampelan Tanah dan Analisis DNA

Dianggarkan sebanyak 2 g tanah diambil setiap minggu dari setiap polibeg, khususnya dari kawasan sekitar pertumbuhan akar. Pengekstrakan DNA dilakukan pada sampel tanah daripada minggu 0 dan minggu 4 menggunakan kit pengekstrakan DNA tanah PrimeWay mengikut arahan pengeluar. PCR konvensional dijalankan untuk menguji sampel DNA tanah yang diekstrak dan kecekapan set primer universal bakteria 16S dan Proteobakteria menggunakan kit KOD FX. Produk PCR dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 1.5% pada 90V selama 1 jam. Campuran tindakbalas disediakan menggunakan THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (Toyobo, Jepun) Analisis PCR-kuantitatif (qPCR) dijalankan menggunakan sistem pengesanan masa nyata CFX96 (Bio-rad, Amerika Syarikat) melalui program seperti berikut: penyahsian pada 95°C selama 3 minit, diikuti oleh 40 kitaran penyahsian pada 95°C selama 10 saat dan penyepuhan pada 55°C selama 30 saat. Perubahan ganda dalam populasi bakteria dikira menggunakan kaedah $2^{-\Delta\Delta CT}$, di mana $\Delta CT = CT$ (Proteobakteria) - CT (16S), dan $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (rawatan POME) - ΔCT (kawalan).

3. Hasil dan Perbincangan

3.1. Kesan POME Terhadap Pertumbuhan Pokok Cili

Parameter pertumbuhan pokok cili direkodkan selama lima minggu, menunjukkan peningkatan yang konsisten dalam ketinggian dan lebar daun merentasi semua kumpulan rawatan (Rajah 2). Walau bagaimanapun, analisis statistik menggunakan ujian-t menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan antara kumpulan kawalan dan kedua-dua kumpulan rawatan POME sepanjang tempoh kajian ($p > 0.05$ untuk semua perbandingan).



Rajah 2. Kesan rawatan terhadap ketinggian (a) dan lebar daun (b) pokok cili sepanjang tempoh 5 minggu eksperimen. Tanda (*) menunjukkan perbezaan yang signifikan terhadap kumpulan kawalan dengan nilai $p < 0.05$.

Kesemua kumpulan rawatan menunjukkan corak pertumbuhan eksponensial yang ketara antara minggu 2 hingga minggu 4, dengan peningkatan ketinggian hampir dua kali ganda dalam tempoh tersebut. Peningkatan yang pesat dalam fasa vegetatif ini adalah konsisten dengan kajian terdahulu terhadap pokok cili yang menunjukkan pertumbuhan meningkat secara eksponensial apabila sistem akar mencapai kematangan yang optimum (Zeiger et al. 2010). Dari segi lebar daun, pertumbuhan menunjukkan pola yang berbeza dengan kadar pertumbuhan yang perlahan pada minggu-minggu terakhir, mencadangkan bahawa tanaman telah mencapai fasa kematangan daun, dengan fokus pertumbuhan beralih kepada pemanjangan batang (Poorter et al. 2009).

Analisis individu pokok menunjukkan variasi dalam corak pertumbuhan. Dalam kumpulan rawatan POME mentah, satu pokok (replikasi 2) menunjukkan pertumbuhan yang terbantut secara ketara, dengan ketinggian hanya mencapai 36.50 cm pada minggu ke-4 berbanding purata 63.50 cm bagi dua pokok lain dalam kumpulan yang sama. Fenomena ini berkemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, ketidakseimbangan nutrien dalam POME mentah, terutamanya kandungan nitrogen dan fosforus yang tidak seimbang yang boleh menghalang pertumbuhan vegetatif (Antai et al. 2017). Kedua, kehadiran sebatian fitotoksik seperti fenol dan asid organik dalam POME mentah yang diketahui boleh memberi kesan negatif terhadap pertumbuhan tumbuhan pada kepekatan

tertentu (Okwute et al. 2023). Ketiga, variasi genetik dan fisiologi dalam biji benih cili yang mungkin menyebabkan tindak balas yang berbeza terhadap bahan tambahan dan tekanan persekitaran (Silva et al. 2023).

Jadual 2. Data morfologi pokok cili individu (n=3 setiap kumpulan) selama 5 minggu.

Ketinggian Pokok (cm)									
Minggu	Kawalan			Rawatan POME mentah			Rawatan POME enapan teraktivasi		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	9.70	8.00	9.90	11.50	9.70	9.00	9.80	9.40	11.30
1	17.00	14.80	18.00	21.30	15.60	17.30	16.60	16.60	20.40
2	27.60	25.00	29.40	34.00	22.20	27.00	25.00	26.40	32.30
3	44.00	37.00	43.00	52.00	29.00	42.00	38.00	39.00	46.00
4	59.50	55.00	58.50	68.00	36.50	59.00	55.00	54.00	61.00

Lebar Daun (cm)									
Minggu	Kawalan			Rawatan POME mentah			Rawatan POME enapan teraktivasi		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	1.87	1.70	1.83	2.07	1.75	1.83	1.50	1.77	2.13
1	3.27	2.73	3.17	3.57	2.00	3.17	2.73	3.27	3.73
2	4.63	3.93	4.43	4.43	3.27	4.43	4.27	4.13	4.60
3	5.13	4.70	4.97	5.00	3.33	5.23	4.90	4.90	4.97
4	5.30	5.00	5.20	5.17	3.37	5.40	5.20	5.03	5.37

Kumpulan rawatan POME enapcemar teraktif menunjukkan corak pertumbuhan yang lebih stabil dan seragam antara ketiga-tiga replikasi, hampir serupa dengan kumpulan kawalan. Keputusan ini menyokong hipotesis bahawa POME enapcemar teraktif bertindak sebagai baja yang melepaskan nutrien secara perlahan (*slow-release fertilizer*), membolehkan tanaman memperoleh nutrien secara beransur-ansur tanpa memberi tekanan terhadap sistem fisiologi pokok (Widyowanti et al. 2021). Pemerhatian ini menunjukkan bahawa proses rawatan enapcemar teraktif mengubah komposisi POME, menjadikannya lebih sesuai sebagai bahan tambahan untuk pertumbuhan tanaman.

Secara keseluruhannya, ketiadaan perbezaan statistik yang signifikan dalam pertumbuhan pokok antara ketiga-tiga kumpulan mungkin dipengaruhi oleh beberapa faktor. Tempoh kajian yang singkat iaitu empat minggu mungkin tidak mencukupi untuk memperhatikan kesan kumulatif dan jangka panjang POME terhadap pertumbuhan pokok. Kajian oleh Pujono et al. (2021) menunjukkan bahawa kesan positif POME terhadap pertumbuhan pokok mungkin hanya ketara selepas beberapa bulan aplikasi. Sistem fertigasi yang digunakan dalam kajian ini telah menyediakan nutrien asas yang mencukupi untuk pertumbuhan pokok, berkemungkinan mengurangkan pergantungan tanaman terhadap nutrien tambahan daripada POME. Interaksi kompleks antara nutrien dalam sistem fertigasi dan POME memerlukan kajian lanjut untuk memahami dinamik penyerapan nutrien oleh pokok.

Begitu juga dari segi isipadu POME yang diaplikasikan (2.0-6.5 ml setiap minggu) mungkin tidak mencukupi untuk memberi kesan yang ketara terhadap kesuburan tanah dan seterusnya pertumbuhan pokok. Karim et al. (2022) mencadangkan bahawa kadar aplikasi POME yang lebih tinggi mungkin diperlukan untuk melihat perubahan signifikan dalam parameter pertumbuhan tanaman. Faktor variasi genetik dalam biji benih juga mungkin memainkan peranan, yang mana walaupun anak pokok yang seragam dipilih, variasi genetik intrinsik dalam biji benih cili mungkin menyumbang kepada tindak balas yang berbeza terhadap rawatan, menyebabkan variasi dalam data yang mengurangkan kesignifikan keputusan analisis statistik.

3.2. Kesan POME Terhadap Populasi Bakteria Tanah

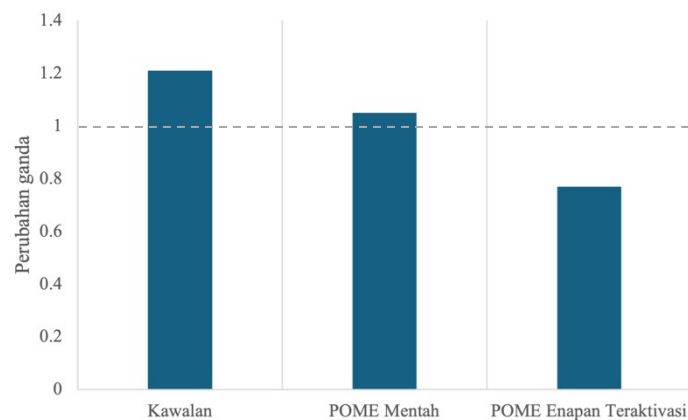
Analisis PCR konvensional mengesahkan bahawa semua sampel DNA tanah yang diekstrak berjaya diamplifikasikan dengan kedua-dua set primer universal bakteria 16S dan Proteobakteria,

menunjukkan kehadiran kumpulan bakteria ini dalam semua sampel tanah. Analisis PCR-kuantitatif mendedahkan perubahan dalam populasi bakteria selepas aplikasi POME (Jadual 3). Nilai Cq untuk gen 16S rRNA (mewakili jumlah bakteria) menurun dari minggu 0 hingga minggu 4 dalam semua kumpulan rawatan, menunjukkan peningkatan dalam keseluruhan populasi bakteria. Untuk sasaran khusus Proteobakteria, kumpulan kawalan dan rawatan POME mentah menunjukkan penurunan nilai Cq, mencadangkan peningkatan dalam populasi Proteobakteria, manakala rawatan POME enapcemar teraktif menunjukkan sedikit peningkatan dalam nilai Cq, menandakan kemungkinan penurunan dalam populasi Proteobakteria.

Jadual 3. Hasil analisis PCR-kuantitatif bagi kesan rawatan POME mentah dan POME enapan teraktivasi terhadap taburan Proteobakteria dalam tanah tanaman pokok cili.

		Kawalan	POME mentah	POME enapan teraktivasi
ΔCq	Minggu 0	0.625	0.735	0.05
	Minggu 4	0.35	0.665	0.425
$\Delta\Delta Cq$		(-)0.275	(-)0.07	0.375

Analisis perubahan ganda (Rajah 3) memberikan gambaran yang lebih jelas dan tepat tentang kesan relatif setiap rawatan terhadap populasi Proteobakteria berbanding jumlah keseluruhan bakteria. Perubahan ganda dikira menggunakan kaedah $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ yang membenarkan perbandingan relatif kelimpahan gen sasaran dengan mengambil kira perubahan dalam gen rujukan (16S rRNA). Kumpulan kawalan menunjukkan peningkatan tertinggi dalam kelimpahan relatif Proteobakteria dengan perubahan ganda 1.21, diikuti oleh rawatan POME mentah dengan perubahan ganda 1.05. Menariknya, rawatan POME enapcemar teraktif menunjukkan perubahan ganda sebanyak 0.77, mencadangkan pengurangan sebanyak 23% dalam kelimpahan relatif Proteobakteria.



Rajah 3. Perbandingan nilai perubahan ganda dalam populasi Proteobakteria tanah selepas rawatan POME berdasarkan analisis PCR-kuantitatif. Nilai perubahan ganda > 1 menunjukkan peningkatan populasi Proteobakteria, manakala nilai < 1 menunjukkan pengurangan populasi.

Peningkatan populasi bakteria keseluruhan dalam semua kumpulan, termasuk kawalan, menunjukkan bahawa tanah dalam sistem fertigasi menyediakan persekitaran yang sesuai untuk pertumbuhan bakteria. Walau bagaimanapun, peningkatan yang lebih besar dalam kumpulan kawalan dan POME mentah berbanding POME enapcemar teraktif mencadangkan kesan yang berbeza terhadap aktiviti dan pertumbuhan mikrob. Beberapa penjelasan biologi untuk penemuan ini boleh dipertimbangkan. Antaranya ialah dari segi kandungan bahan organik dan ketersediaan nutrient. Lazimnya, POME mentah mengandungi kepekatan bahan organik yang tinggi yang menyediakan substrat yang kaya untuk pertumbuhan mikrob (Mohammad et al. 2021). Sebaliknya, POME enapcemar teraktif telah melalui proses penguraian aerobik yang telah menggunakan sebahagian besar bahan organik yang mudah terurai dengan nilai BOD yang lebih rendah, menyebabkan berkurangnya nutrien yang tersedia untuk mikrob tanah. Perubahan dalam sifat fizikokimia tanah disebabkan oleh pH POME mentah yang lebih rendah (pH 3.4-5.2) berbanding POME enapcemar

teraktif (pH 8.1), mungkin juga boleh mempengaruhi keasidan tanah yang seterusnya mengubah keadaan persekitaran untuk pertumbuhan mikrob. Proteobakteria diketahui lebih cenderung berkembang dalam keadaan pH yang sederhana hingga sedikit berasid (pH 5.5-7.0) berbanding keadaan beralkali (Francioli et al. 2021). Perubahan dalam pH tanah boleh mengubah ketersediaan nutrien dan mempengaruhi struktur komuniti bakteria secara keseluruhan.

Proses enapcemar teraktif yang melibatkan pertumbuhan bakteria tertentu boleh menyebabkan perubahan dalam komposisi POME, termasuk kehadiran metabolit mikrob, enzim, dan sebatian bioaktif, yang mungkin mempunyai kesan penindasan terhadap kumpulan Proteobakteria tertentu dalam tanah. Kehadiran bakteria antagonistik dalam POME enapcemar teraktif mungkin juga mengubah dinamik populasi mikrob apabila diaplikasikan kepada tanah. Nisbah karbon kepada nitrogen (C:N) dalam POME mentah dan POME enapcemar teraktif mungkin berbeza, mempengaruhi jenis bakteria yang dominan dalam tanah. Proteobakteria memerlukan nisbah C:N yang optimum untuk pertumbuhan, dan perubahan dalam parameter ini boleh mengalihkan kelebihan kompetitif kepada kumpulan bakteria lain.

Implikasi ekologinya adalah signifikan kerana Proteobakteria memainkan peranan penting dalam kitaran nutrien, terutamanya nitrogen dan fosforus (Orellana et al. 2022). Pengurangan dalam populasi Proteobakteria selepas aplikasi POME enapcemar teraktif mungkin memberi kesan kepada ketersediaan nutrien untuk tanaman dalam jangka panjang. Walau bagaimanapun, ia juga mungkin menandakan perubahan yang lebih seimbang dalam struktur komuniti bakteria, dengan kumpulan bakteria lain seperti Actinobacteria atau Firmicutes menjadi lebih dominan, yang mungkin masih menguntungkan kesihatan tanah secara keseluruhan.

Hasil dapatan kajian ini menunjukkan kepentingan untuk mempertimbangkan jenis POME yang digunakan dalam aplikasi pertanian. Keputusan yang diperoleh menunjukkan bahawa walaupun kedua-dua jenis POME boleh mempengaruhi mikrobiom tanah, setiap jenis mempunyai kesan yang berbeza terhadap kumpulan bakteria tertentu yang boleh memberi implikasi terhadap fungsi ekosistem tanah. Kajian tambahan diperlukan untuk menyelidik sama ada perubahan ini dalam populasi Proteobakteria memberi kesan jangka panjang terhadap kesuburan tanah, kitaran nutrien, dan akhirnya, produktiviti tanaman.

4. Kesimpulan

Kajian ini mengkaji kesan POME mentah dan POME enapcemar teraktif terhadap pertumbuhan pokok cili dan populasi bakteria tanah. Walaupun tiada perbezaan yang signifikan diperhatikan dalam parameter pertumbuhan tanaman sepanjang tempoh eksperimen yang singkat, aplikasi jenis POME yang berbeza memberi kesan yang berbeza terhadap komuniti bakteria tanah. POME mentah meningkatkan populasi bakteria keseluruhan dan sedikit meningkatkan Proteobakteria, mencadangkan potensinya sebagai sumber bahan organik untuk menyokong komuniti mikrob tanah. POME enapcemar teraktif pula menunjukkan kesan yang berbeza dengan kecenderungan untuk mengurangkan populasi Proteobakteria. Penemuan ini menyumbang kepada pemahaman kita tentang bagaimana jenis POME yang berbeza mungkin mempengaruhi ekologi mikrob tanah, yang boleh memberi implikasi kepada amalan pertanian lestari dan pengurusan sisa dalam industri kelapa sawit.

Penghargaan

Kajian ini disokong oleh geran penyelidikan dari Universiti Kebangsaan Malaysia. Penulis mengucapkan terima kasih kepada staf Kompleks Rumah Tumbuhan dan Kompleks Makmal Biologi Molekul, Fakulti Sains dan Teknologi, UKM, atas sokongan teknikal mereka. Penghargaan juga ditujukan kepada Cenergi SEA Sdn. Bhd. kerana membekalkan sampel POME.

Rujukan

- Antai, S.P., Nkang, A.O. & Ofili, T.A. 2017. Growth response and phytotoxicity assessment of palm oil mill effluent (POME) on *Amaranthus* species and *Abelmoschus esculentus*. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences* 5(2): 38-46.
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S. & Kolb, S. 2021. DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota—Pitfalls and solutions. *Microorganisms* 9(2): 361.

- Karim, M.A., Samsudin, M.D.M., Said, M.I.M. & Zaman, N.K. 2022. Effects of palm oil mill effluent (POME) application as fertiliser on the growth of selected food crops. *Journal of Sustainable Natural Resources* 3(1): 37-45.
- Low, S.S., Bong, K.X., Mubashir, M., Cheng, C.K., Lam, M.K., Lim, J.W., Ho, Y.C., Lee, K.T., Munawaroh, H.S.H. & Show, P.L. 2021. Microalgae cultivation in palm oil mill effluent (Pome) treatment and biofuel production. *Sustainability (Switzerland)* 13(6): 3247.
- Maluin, F.N., Hussein, M.Z. & Idris, A.S. 2020. An overview of the oil palm industry: Challenges and some emerging opportunities for nanotechnology development. *Agronomy* 10(3): 356.
- Mohammad, S., Baidurah, S., Kobayashi, T., Ismail, N. & Leh, C.P. 2021. Palm oil mill effluent treatment processes—A review. *Processes* 9(8): 1454.
- Mohd Kamil, F.Z., Hasanuddin, N.I., Othaman, R. & Anuar, F.H. 2020. Treatment of palm oil mill effluent by poly(L-Lactic acid)-Poly(Ethylene glycol)/ silica membrane. *Sains Malaysiana* 49(9): 2311-2322.
- MPOB. 2023. *Overview of the Malaysian oil palm industry in 2023*. Malaysian Palm Oil Board, Bangi, Selangor.
- Okereke & Ginikanwa, R.C. 2020. Environmental impact of palm oil mill effluent and its management through biotechnological approaches. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 7(7): 117-127.
- Okwute, L.O., Oladele, P.O. & Samson, I.O. 2023. Phytotoxic effects of palm oil mill effluent on germination and early growth of maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Plant Science and Ecology* 9(1): 12-19.
- Orellana, L.H., Rodriguez, R.L. & Konstantinidis, K.T. 2022. Ecological and functional potential of Proteobacteria in soil ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 46(2): fuab054.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I.J. & Villar, R. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182(3): 565-588.
- Pujono, P., Saputra, D.D. & Wijaya, R. 2021. Long-term effects of palm oil mill effluent application on soil fertility and oil palm productivity. *Journal of Oil Palm Research* 33(2): 323-334.
- Razak, I.B.A., Bohari, N.H., Fishal, E.M.M., Mohamad, N.L., Azmi, M.N., Razali, M.F.F.M. & Ibrahim, H. 2022. Aerobic Degradation Process in Palm Oil Mill—Issues, Challenges and Upsurging Its Efficiency through Bioremediation. *Journal of Water Resource and Protection* 14(07): 515-530.
- Shilev, S., Sanches, J.P., Souza Costa, S., Assis Das Graças, D., Silva, A., Baião, G.C., Moreira, R.G., Magalhães, M.M., Cunha, R.L. & Azevedo Baraúna, R. 2024. Soil Fertilization with Palm Oil Mill Effluent Has a Short-Term Effect on the Bacterial Diversity of an Amazonian Agricultural Land Area. *Microorganisms* 12(3):507.
- Silva, L.F.O., Barbosa, M.A., Oliveira, G.M. & Santos, J.P. 2023. Genetic and physiological variability in chili pepper (*Capsicum spp.*) seedlings in response to environmental stress. *Scientia Horticulturae* 305: 111572.
- Suprihatin, S., Indrasti, N.S., Prasetya, H., Agustina, L. & Yulistika, E. 2024. Nine circular strategy approach for the sustainable management of waste in the palm oil industry. *Global J. Environ. Sci. Manage* 10: 89-104.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K. & Hammes, W.P. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6): 2578-2585.
- Widyowanti, R.A., Ginting, C. & Renjani, R.A. 2021. The Potential of Biogas Slurry and Palm Oil Mill Effluent Slurry as Slow-Release Fertilizer Pellet Through Densification. *PLANTA TROPICA: Jurnal Agrosains (Journal of Agro Science)* 9(2): 90-99.
- Wun, W.L., Chua, G.K. & Chin, S.Y. 2017. Effect of palm oil mill effluent pome treatment by activated sludge. *Journal CleanWAS* 1(2): 06-09.
- Zeiger, E. & Taiz, L. 2010. *Plant Physiology* (5th ed.). Sinauer Associates.

**Kesan Kulat Entomopatogen (EPF) Terhadap Pengawalan Afid
Toxoptera citricida Pada Tanaman Limau Kasturi**
(The Effect of Entomopathogenic Fungi (EPF) Towards Controlling Aphid *Toxoptera citricida* on Calamansi trees *Citrofortunella macrocarpa*)

Nurul Lisa Zulfakri^{1,2}, Muhammad Shahrul Haqimi Mohd Faizal^{1,2}, Mohamad Ruzi Abdul Rahman³ & Johari Jalinan^{1,2,*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Laboratory of Applied Entomology, Centre for Insect Systematics, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

³Bangi Botanic Gardens, Kompleks Rumah Tumbuhan. Faculty of Science and Technology. 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: johari_j@ukm.edu.my

Abstrak: Kajian ini bertujuan mengkaji kesan kulat entomopatogen (EPF) terhadap pengawalan afid *Toxoptera citricida*, perosak tanaman limau kasturi yang juga vektor virus *Citrus tristeza*. Virus ini menyebabkan penurunan kualiti buah dan kematian pokok. Sebagai alternatif racun serangga, agen kawalan biologi seperti kulat entomopatogen digunakan untuk mengawal populasi afid. Tujuan kajian adalah menilai kesan kepekatan berbeza bagi kulat entomopatogen *Beauveria bassiana* dan *Lecanicillium lecanii* terhadap kadar kematian afid, kesan morfologi pada afid berdasarkan pembentukan mikosis, dan menilai kaedah pemeliharaan kulat entomopatogen menggunakan kertas turas kering. Pensampelan afid dilakukan pada pokok limau kasturi di Taman Botani Bangi dan pensampelan kulat entomopatogen pada serangga yang dijangkiti kulat entomopatogen. Kajian ini dijalankan dengan teknik semburan kultur kulat pada afid dan pemerhatian pembentukan mikosis pada afid. Penggunaan teknik kertas turas digunakan bagi pemeliharaan kulat entomopatogen. Hasil kajian menunjukkan kepekatan tinggi *B. bassiana* (8×10^6 spora/mL) menyebabkan kematian afid yang pantas, mencapai 100% pada hari ke-4, manakala kepekatan rendah (2×10^6 dan 4×10^5 spora/mL) dengan kematian sepenuhnya dicapai pada hari ke-5. Selain itu, *L. lecanii* pada kepekatan tinggi (9×10^4 spora/mL) mencapai 100% kematian pada hari ke-6. Pengsporaan juga meliputi keseluruhan badan afid dengan perkembangan konidia pada kepala, kaki, dan spirakel abdomen. Kaedah pemeliharaan kulat pula menunjukkan bahawa kadar pertumbuhan semula *L. lecanii* lebih tinggi berbanding *B. bassiana* dengan peningkatan diameter koloni dari hari ke-2 hingga hari ke-10. Oleh itu, kajian ini menyumbang kepada kawalan perosak biologi dan pembangunan amalan pertanian mampan.

Kata kunci: Kulat entomopatogen; afid *Toxoptera citricida*; mikosis, limau kasturi

Abstract: This study aims to examine the effects of entomopathogenic fungi (EPF) in controlling the aphid *Toxoptera citricida*, a pest of calamansi trees and a vector of the *Citrus tristeza* virus. This virus reduced fruit quality and tree mortality. As an alternative to chemical insecticides, biological control agents such as entomopathogenic fungi are used to control aphid populations. The objectives of this study were to evaluate the effects of different concentrations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii* on aphid mortality rates, the morphological effects on aphids based on mycosis formation, and to assess the preservation method of fungi using the dry filter paper. Aphid samples were collected from lime plants and entomopathogenic fungi found on infected aphids from *Melastoma malabathricum* plants. The study was conducted by spraying fungal cultures on aphids and observing mycosis formation over time. The results showed the highest concentration of *B. bassiana* (8×10^6 spores/mL) caused rapid aphid mortality, reaching 100% on day 4, while lower concentrations (2×10^6 and 4×10^5 spores/mL) with complete mortality achieved on days 5. In addition, *L. lecanii* at the highest concentration (9×10^4 spores/mL) achieved 100% mortality on day 6. Sporulation also covered the entire aphid body with conidia development especially on the head, legs, and abdominal spiracles. The fungal culture method showed that *L. lecanii* had a higher regeneration rate than *B. bassiana* with a continuous increase in colony diameter from day 2 to day 10. Therefore, this study contributes to biological pest control and the development of sustainable agricultural practices.

Keywords: Entomopathogenic fungi; aphid *Toxoptera citricida*; mycosis, calamansi trees

1. Pengenalan

Sehingga kini, terdapat lebih 700 spesies kulat dan 100 genera yang telah dikenalpasti sebagai kulat entomopatogen (Suherman et al. 2021). Afid, *Toxoptera citricida* adalah sejenis serangga kecil dikenali sebagai “brown citrus aphid” daripada superfamili Aphidoidea yang merosakkan tanaman dengan menghisap cecair dalam tumbuhan. Afid adalah serangga hemimetaboli yang mempunyai tiga tahap iaitu bermula daripada telur, nimfa, dan dewasa (Izham et al. 2024). Afid juga hidup dalam kumpulan menyebabkan seluruh populasi mudah diserang oleh patogen kulat. Kajian lepas menyatakan bahawa penemuan spesies afid *Toxoptera citricida* ditemui oleh Kirkaldy pada tahun 1907 (Tsai et al. 2020). Selain itu, afid betina dewasa mengandungi embrio afid betina generasi seterusnya di dalam tubuh mereka, menunjukkan proses pembiakan berterusan tanpa perlu persenyawaan (Mathers et al. 2023). Hal ini menyebabkan generasi aseksual afid adalah antara yang paling pendek daripada afid lain iaitu hanya mengambil masa hanya lima hari untuk membiak. Oleh itu, populasi afid mampu berkembang dengan kadar yang sangat tinggi dan cepat. Namun, saiz afid yang kecil dapat dimusnahkan dengan cepat hanya mengambil masa tiga hingga empat hari oleh kulat entomopatogen (Francis et al. 2022).

Kulat entomopatogen adalah agen kawalan biologi kepada serangga perosak afid pada tanaman. Pelbagai jenis kulat entomopatogen dijumpai dalam persekitaran tanah dan tidak mendatangkan kemudaratan kepada tanaman malah hanya memusnahkan atau menyahaktif afid melalui integumen serangga (Sani et al. 2020a). Kulat memasuki lapisan kutikel, epidermis dan membran untuk membiak dan menyerang tisu serangga perosak yang membawa kepada kematian serangga (Broumandnia et al. 2020; Sani et al. 2020b).

Kajian daripada Liang et al. 2021 telah membuktikan bahawa dua belas strain kulat entomopatogen seperti *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces farinosus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps scarabaeicola*, dan *Nomuraea rileyi* yang dikenalpasti di dalam tanah disaring untuk kawalan afid. Kulat entomopatogen kebiasaannya diasingkan dari tanah atau bangkai arthropod.

2. Bahan dan Kaedah

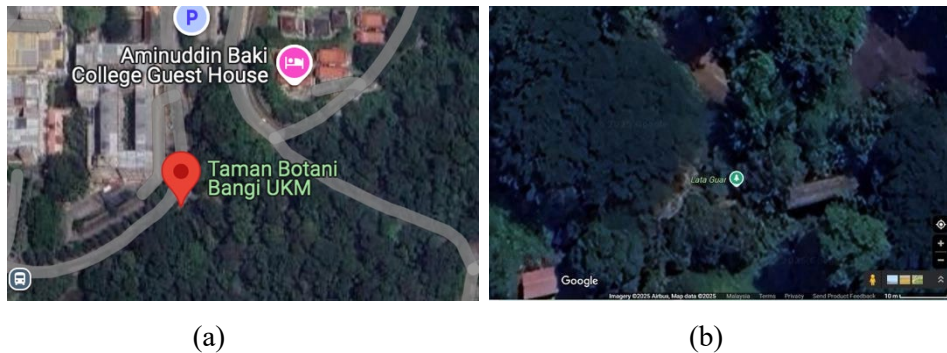
2.1 Pensampelan afid

Afid *Toxoptera citricida* sebagai organisma sasaran dalam kajian ini telah diperolehi di kebun tanaman limau kasturi di Taman Botani, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor (Rajah 1). Pensampelan afid *Toxoptera citricida* telah dijalankan dengan menggunakan teknik pensampelan aktif di kebun tanaman limau kasturi. Pemerhatian terarah adalah kaedah pencarian yang fokus pada pucuk muda dan daun muda pada setiap pokok yang menunjukkan simptom serangan afid seperti pucuk muda yang menggulung atau daun yang berkedut. Afid cenderung menyerang bahagian pucuk muda dan daun yang baru berkembang kerana bahagian tersebut mempunyai tisu lembut dan kandungan nutrien yang tinggi. Selain itu, pencarian telah dijalankan dengan perhatikan kehadiran semut yang bergerak aktif di sekitar pucuk pokok sebagai petunjuk kehadiran afid. Hal ini kerana semut mempunyai interaksi secara simbiosis iaitu mutualisme dengan cara semut mendapatkan nutrien yang dirembeskan oleh afid manakala afid mendapat perlindungan daripada pemangsa melalui kehadiran semut (El-Harairy et al. 2024). Setelah pencarian berjaya, pensampelan afid *Toxoptera citricida* telah dilakukan dengan mengguntingkan bahagian pucuk muda yang mempunyai afid dengan menggunakan gunting dan diletakkan ke dalam piring Petri. Kemudian, afid yang telah disimpan di dalam piring Petri diletakkan dengan sedikit daun untuk mengekalkan kelembapan dan mengelak kematian sebelum digunakan dalam kajian.

2.2 Sampel kulat entomopatogen

Dua sampel kulat entomopatogen (Rajah 2) telah diperolehi daripada serangga perosak yang dikenali sebagai lelompat pokok telah dijangkiti dengan kulat entomopatogen di dua persekitaran yang berbeza. Persekitaran pertama adalah pada pokok senduduk, *Melastoma malabathricum* yang ditemui di kawasan Hutan Rekreasi Sungai Guar, Manong, Kuala Kangsar, Perak (Rajah 1b) manakala persekitaran kedua adalah pada pokok senduduk, *Melastoma malabathricum* yang terdapat di kawasan

kebun tanaman limau kasturi di Taman Botani Bangi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Selangor (Rajah 1a).



Rajah 1. Lokasi persampelan iaitu di Taman Botani Bangi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Selangor (a) dan (b) Hutan Rekreasi Sungai Guar, Manong, Kuala Kangsar, Perak.



Rajah 2. Sampel kulat entomopatogen yang diperoleh daripada serangga lempang pokok yang telah dijangkiti kulat entomopatogen di Hutan Rekreasi Sungai Guar, Kuala Kangsar, Perak (a) dan kebun tanaman limau kasturi, Taman Botani Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor (b). Serangga berada pada bahagian dahan pokok senduduk, *Melastoma malabathricum*.

2.3 Penyediaan kultur kulat dan inokulasi

Penyediaan medium pertumbuhan telah dijalankan dengan mencampurkan agar dektrosa kentang (*Potato Dextrose Agar*, PDA) dengan air suling steril. Setelah itu, campuran medium tersebut dihantar untuk proses autoklaf sebelum dituangkan ke dalam piring Petri di bawah keadaan steril dan dibiarkan untuk agar mengeras. Semua prosedur makmal ini dilaksanakan di dalam meja kerja steril untuk memastikan keadaan yang bersih dan terkawal.

Setelah agar dektrosa kentang mengeras, serangga yang dijangkiti dengan kulat entomopatogen yang dijumpai di Taman Botani Bangi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Selangor dan Hutan Rekreasi Sungai Guar, Kuala Kangsar, Perak telah diletakkan di atas agar dektrosa kentang bagi tujuan pengkulturan kulat sebelum disimpan di dalam inkubator pada suhu 30°C selama 5 hingga 7 hari.

2.4 Penuaian konidia kulat entomopatogen matang

Penuaian konidia kulat entomopatogen dilakukan setelah koloni mencapai tahap kematangan, iaitu antara hari ke-5 hingga ke-7 selepas pengkulturan. Medium kaldu dektrosa kentang yang telah disterilkan dituang ke dalam piring Petri bagi memudahkan proses pengumpulan konidia. Konidia kemudiannya dituai dengan mengikis permukaan koloni menggunakan spatula steril secara perlahan. Suspensi konidia yang diperoleh ditapis menggunakan kertas penapis steril bagi menyingkirkan serpihan miselium dan bahan cemar lain, seterusnya menghasilkan larutan konidia yang bersih.

2.5 Pengiraan spora kulat menggunakan hemasitometer

Hemasitometer Neubauer telah digunakan dalam kajian ini bagi mengira bilangan konidia per unit isipadu. Sebelum memulakan pengiraan, sebanyak 10 μL ampai konidia kulat entomopatogen diambil menggunakan pipet untuk diletakkan pada ruang hemasitometer selepas penutup slaid diletakkan. Prosedur ini juga telah dijalankan dengan memastikan tiada gelembung udara pada ruang petak yang diisi. Kemudian, hemasitometer diletakkan di bawah mikroskop dengan pembesaran $400\times$ untuk pengiraan konidia yang lebih jelas. Mikroskop telah difokuskan pada petak-petak di dalam ruang grid dan setiap petak besar pada hemasitometer mengandungi 16 petak kecil dengan setiap petak kecil mempunyai isipadu 0.01 mm^3 . Pengiraan diteruskan dengan memilih 4 petak besar di penjuru termasuk 1 petak besar di tengah. Teknik pengiraan adalah dengan mengira jumlah spora di dalam petak dan spora yang menyentuh garisan di bahagian atas dan kanan sahaja secara zig-zag (Li et al. 2023).

2.6 Rawatan kulat entomopatogen pada afid

Rawatan yang telah diaplikasikan ke atas afid *Toxoptera citricida* adalah dengan menggunakan kaedah semburan menggunakan botol semburan kecil yang steril. Setiap piring Petri berukuran ($90\times 15\text{ mm}$) telah diletakkan kertas penapis steril bagi membantu menyerap cecair yang berlebihan selepas semburan dilakukan. Kemudian, afid yang telah dikutip pada hari yang sama telah dibahagikan kepada 6 piring Petri iaitu setiap satu piring Petri telah diletakkan 10 afid tanpa sayap (aptera) sama seperti kajian daripada Lima et al. 2020. Pembahagian ini telah dilakukan dengan menggunakan berus lembut untuk mengelakkan kecederaan kepada afid yang boleh mempengaruhi hasil kajian.

Seterusnya, tiga piring Petri yang mengandungi afid disemur dengan ampai sampel kulat entomopatogen dari Perak yang mempunyai jumlah spora yang berbeza bagi ketiga-tiga piring Petri. Kemudian, tiga piring Petri yang lain telah disemur dengan ampai sampel kulat entomopatogen dari Selangor yang juga mempunyai jumlah spora yang berbeza. Setiap piring Petri juga telah diletakkan beberapa daun yang segar bagi membekalkan oksigen kepada afid. Daun segar yang digunakan dalam setiap piring Petri juga telah disterilkan secara permukaan menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% selama 1 minit, diikuti dengan pembilasan sebanyak tiga kali menggunakan air suling steril. Prosedur ini dijalankan di bawah keadaan aseptik bagi memastikan daun bebas daripada mikroorganisma luar (Kumar et al. 2021). Piring Petri juga telah ditutup menggunakan parafilm untuk mengelak sebarang kontaminasi. Dalam kajian ini, sebanyak lima replikasi yang telah disediakan menjadikan sebanyak 32 piring Petri yang telah digunakan termasuk kawalan dan sebanyak 320 afid *Toxoptera citricida* yang telah dirawat. Akhir sekali, setiap piring Petri disimpan di dalam inkubator yang bersuhu $25-30^\circ\text{C}$.

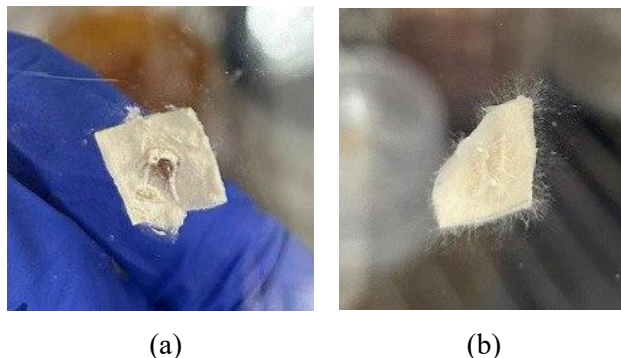
2.7 Pemeliharaan kulat entomopatogen dengan menggunakan teknik kertas turas kering

Kaedah ini dimulakan dengan kertas penapis dipotong kepada saiz ($1\times 1\text{ cm}$) dan telah dihantar untuk proses autoklaf. Kemudian, medium agar PDA steril disediakan sebelum kepingan kertas penapis yang telah steril diletakkan pada permukaan medium tersebut. Kerja makmal ini dijalankan di dalam aliran lamina steril. Kaedah pemeliharaan ini diteruskan dengan koloni sampel kulat entomopatogen daripada kultur asal dipotong kepada saiz (0.5 cm) menggunakan pisau steril dan diletakkan di atas setiap kepingan kertas penapis yang berada di atas PDA. Piring Petri tersebut kemudian ditutup dengan parafilm dan diletakkan di dalam inkubator pada suhu 30°C . Kulat akan tumbuh dengan lebih perlahan pada kertas penapis kira-kira 10 hingga 15 hari untuk proses kolonisasi lengkap.

Selepas spora terbentuk pada kertas penapis, setiap kepingan telah dipisahkan dan dipindahkan ke piring Petri baharu tanpa medium kultur. Setiap piring Petri tersebut kemudian diletakkan semula di dalam inkubator bersuhu 30°C sehingga kertas penapis serta kulat tersebut kering sepenuhnya yang mengambil masa kira-kira 20 hingga 30 hari (Rajah 3). Jika pengeringan berlaku terlalu cepat, kepatogenan dan kevirulenan kulat tersebut akan terganggu.

Selepas kering, 10 hingga 12 keping kertas penapis dimasukkan ke dalam sampul kaca (glassine envelope). Setiap sampul dilabel dan dimasukkan ke dalam beg plastik, kemudian disimpan dalam bekas plastik tertutup pada suhu 4°C hingga -20°C . Bagi mengenalpasti jika kaedah ini berjaya mengekalkan kemandirian kulat, sekeping kecil kertas penapis dari sampul kaca diletakkan pada

medium kultur PDA yang baharu dan dieram di dalam inkubator bersuhu 30°C.



Rajah 3. Sampel kulat entomopatogen daripada kultur asal yang dijumpai di Taman Botani Bangi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Selangor (a) dan (b) Hutan Rekreasi Sungai Guar, Manong, Kuala Kangsar, Perak. Kertas penapis serta kulat kering selepas 30 hari dieram di dalam inkubator bersuhu 30°C.

3. Hasil dan Perbincangan

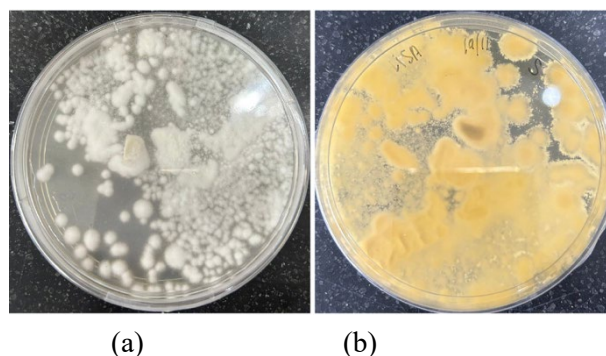
3.1 Pengkulturan kulat entomopatogen

Sampel kulat yang diperoleh dari Perak dan Selangor telah disubkultur di atas medium PDA. Hal ini kerana PDA adalah medium yang kaya dengan nutrien yang mampu menggalakkan pengsporaan dan penghasilan pigmen oleh koloni kulat. Pertumbuhan kulat di dalam inkubator pada suhu 30°C memerlukan masa 7 hingga 14 hari bagi meliputi sebahagian piring Petri.

3.2 Pencirian kulat entomopatogen *Beauveria bassiana*

3.2.1 Cerapan makroskopik

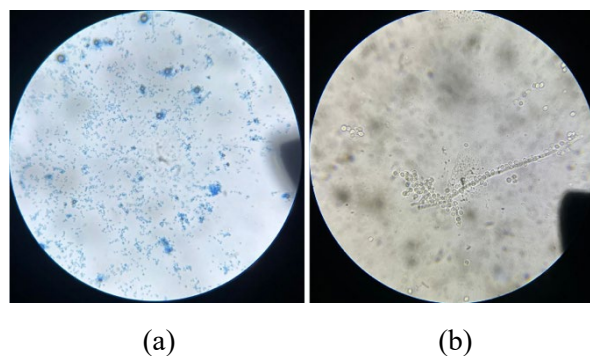
Cerapan makroskopik dari bahagian atas agar telah menunjukkan bahawa sampel kulat entomopatogen yang diperoleh pada serangga perosak yang telah dijangkiti kulat entomopatogen di Taman Botani, Bangi, Selangor selepas dikultur pada medium PDA adalah *B. bassiana* daripada famili Cordycipitaceae. Apabila dikultur pada medium agar, koloni menunjukkan ciri am makroskopik *B. bassiana* iaitu warna koloni putih kemudian menjadi krim pucat, kekuningan, atau sedikit kuning cair apabila matang. *B. bassiana* juga mempunyai tekstur berdebu dengan koloni berbentuk bulat yang tidak sekata dan struktur yang lebih kasar sama seperti kajian lepas daripada Qubbaj et al. (2022) dan Shinde et al. (2019). Pertumbuhan koloni juga tumbuh dengan lebih cepat dan kelihatan tompok kecil yang bertebaran pada permukaan PDA. Bahagian bawah pula koloni kekal berwarna pucat atau kuning muda. Rajah 4 menunjukkan morfologi koloni kulat *B. bassiana* dari pandangan atas dan dari pandangan bawah.



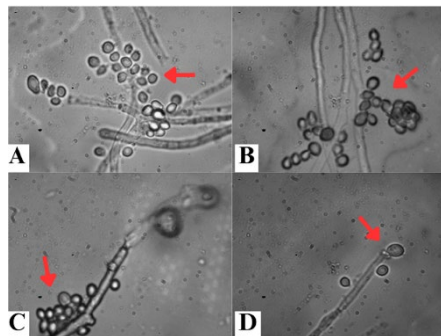
Rajah 4. Koloni kulat *B. bassiana* dari pandangan atas (a) menunjukkan morfologi koloni berwarna putih kemudian menjadi krim pucat, kekuningan, atau sedikit kuning cair apabila matang. Dari pandangan bawah (b), koloni menunjukkan kekal berwarna pucat atau kuning muda selepas dieram untuk tujuh hari di atas PDA pada suhu 30°C.

3.2.2 Cerapan mikroskopik

Cerapan mikroskopik telah menunjukkan struktur *B. bassiana* dimana spora bersel tunggal ini berbentuk bulat hingga bujur dan berdinding licin. Apabila diperhatikan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000×, konidium kelihatan seperti di dalam tandan padat seperti anggur yang terdapat pada konidiofor sama dengan kajian yang telah dibuat oleh Norjmaa et al. (2015). Persamaan dengan gugusan anggur merupakan ciri yang dapat membezakan *B. bassiana* serta membantu dalam pengenalpastian kulat ini. Sifat hialin, globos hingga subglobos pada konidium serta dengan susunan konidium membolehkan pengecaman dan pembezaan yang tepat daripada kulat entomopatogen yang lain. Morfologi unik ini adalah kunci untuk memahami strategi pembiakan *B. bassiana* berdasarkan kajian lepas (Maraghy 2023) yang menunjukkan morfologi yang sama. Rajah 5 menunjukkan cerapan mikroskopik *B. bassiana* dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400× dan 1000×. Rajah 6 menunjukkan struktur lengkap *B. bassiana* dengan kehadiran konidium berbentuk anggur pada konidiofor sekaligus menunjukkan pembiakan aseksual *B. bassiana*.



Rajah 5. Cerapan mikroskopik *B. bassiana* dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400× (a) dengan menggunakan larutan laktofenol biru dan (b) 1000× menggunakan rendaman minyak.



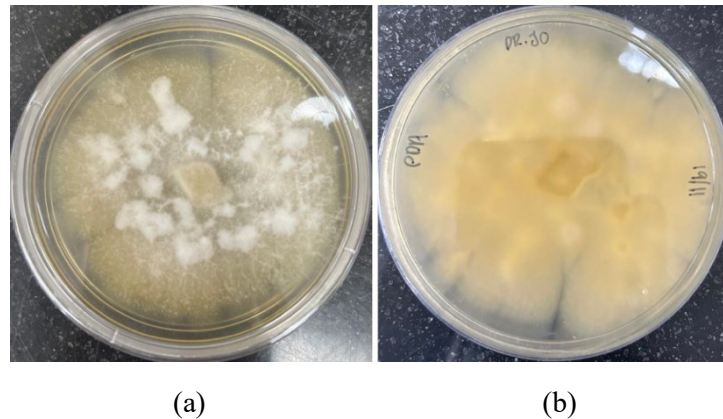
Rajah 6. Struktur lengkap *B. bassiana* di bawah mikroskop cahaya dengan menggunakan kamera kanta mikroskop pada pembesaran 400×. Anak panah pada A, B, C, dan D masing- masing menunjukkan konidium, konidiofor, dan hifa.

3.3 Pencirian kulat entomopatogen *Lecanicillium lecanii*

3.3.1 Cerapan makroskopik

Cerapan makroskopik dari bahagian atas agar telah menunjukkan bahawa sampel kulat entomopatogen yang diperoleh pada serangga perosak yang telah dijangkiti kulat entomopatogen di Hutan Rekreasi Sungai Guar, Manong, Kuala Kangsar, Perak selepas dikultur pada medium PDA adalah *Lecanicillium lecanii* daripada famili Cordycipitaceae. Hal ini demikian kerana *L. lecanii* adalah kulat entomopatogen berfilamen yang mempunyai ciri makroskopik yang jelas seperti dalam

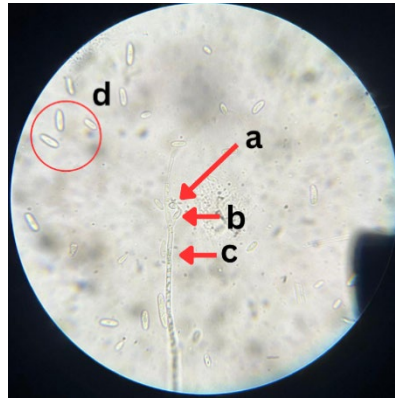
kajian yang dijalankan oleh Huang et al. (2018). Apabila dikultur pada medium agar, koloni menunjukkan tekstur yang berbulu kapas dengan struktur miselium seperti benang halus yang padat serta membentuk jisim konidia yang lebih teratur iaitu sama dengan kajian lepas daripada Qubbaj et al. (2022) dan Xie et al. (2019). Pada bahagian tengah, koloni berwarna putih hingga krim atau kuning pucat. Kadar pertumbuhan koloni adalah tinggi pada bahagian tengah menandakan kepekatan konidia yang tinggi. Seterusnya, bahagian bawah permukaan kultur kelihatan pucat dan sedikit berpigmen. Warna gelap menunjukkan kawasan tersebut mungkin mengandungi miselium dan konidium yang banyak dan padat manakala warna cerah menunjukkan kawasan tersebut mengandungi miselium yang kurang matang dan kurang padat serta konidium yang sangat sedikit. Rajah 7 menunjukkan morfologi koloni kulat *Lecanicillium lecanii* dari pandangan atas dan dari pandangan bawah.



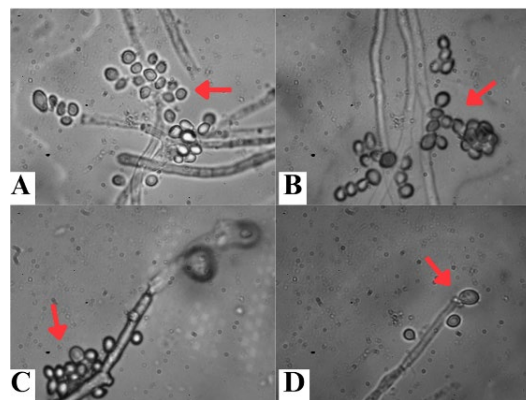
Rajah 7. Koloni kulat *Lecanicillium lecanii* dari pandangan atas (a) menunjukkan morfologi koloni yang bermula dengan warna putih hingga krim atau kuning pucat. Dari pandangan bawah (b), koloni menunjukkan kawasan miselium yang berwarna kuning sedikit gelap pada bahagian tengah dan kuning pucat pada bahagian hujung koloni selepas dieram untuk tujuh hari di atas PDA pada suhu 30°C.

3.3.2 Cerapan mikroskopik

Cerapan mikroskopik telah menunjukkan struktur bagi *Lecanicillium lecanii* (Rajah 8) dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 1000×. Struktur konidium pada sel konidiogen, konidiofor, hifa, dan konidium telah membuktikan bahawa kulat entomopatogen ini adalah *Lecanicillium lecanii* sepadan dengan kajian lepas oleh Subramaniam et al. (2021). Hal ini demikian kerana ciri-ciri cerapan mikroskopik *L. lecanii* adalah hifa berseptum (berdinding sel), bercabang, hifa berbentuk panjang, dan berwarna lutsinar. Kehadiran fialid iaitu sel konidiogen yang khusus berbentuk seperti kelalang atau silinder juga adalah satu tanda pengenalan penting bagi *L. lecanii*. Fialid *L. lecanii* menghasilkan konidium dalam susunan berangkai dan dihasilkan secara berterusan. Rajah 9 menunjukkan konidiofor yang tegak atau sedikit bercabang yang mempunyai konidia di hujungnya. Selain itu, kulat entomopatogen ini diklasifikasikan sebagai *L. lecanii* kerana mempunyai konidium yang berbentuk bujur hingga ellipsoidal seperti kacang. Saiz konidia adalah kecil, berwarna lutsinar, dan disusun dalam rantai atau kelompok pada konidiofor. Perbincangan ini disokong oleh kajian lepas daripada Hajji. et al (2018) yang mempunyai cerapan mikroskopik yang sama. Struktur reproduksi *L. lecanii* adalah pembiakan aseksual melalui konidium yang dihasilkan oleh konidiofor. Rajah 10 menunjukkan struktur pembiakan aseksual *L. lecanii* dengan lebih jelas di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 400× menggunakan kamera kanta mata mikroskop.



Rajah 8. Struktur lengkap bagi *L. lecanii* dibawah mikroskop cahaya pada pembesaran 1000× menunjukkan (a) konidium pada sel konidiogen, (b) konidiofor, (c) hifa, dan (d) konidium berbentuk bujur.



Rajah 9. Struktur konidiofor *L. lecanii* dapat dilihat pada cerapan mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000×.



Rajah 10. Struktur pembiakan aseksual *L. lecanii* dan konidium berbentuk bujur yang disusun dalam kelompok pada konidiofor. Konidium yang paling tua berada di hujung manakala konidium yang lebih muda tersusun dalam rantai secara basipetal iaitu konidium yang lebih muda di bawah konidium yang lebih tua.

3.4 Persediaan kepekatan untuk rawatan terhadap afid

Persediaan kepekatan untuk rawatan terhadap afid menggunakan ampaian kulat daripada *B. bassiana* iaitu kulat entomopatogen yang diperoleh di Selangor dan ampaian kulat daripada *L. lecanii* iaitu kulat entomopatogen yang diperoleh di Perak. Prosedur kajian ini telah dijalankan dengan mengira bilangan konidia atau spora per unit isipadu dalam lima kotak besar pada hemasitometer. Formula kepekatan konidia atau spora telah digunakan untuk menentukan kepekatan konidia atau spora dalam sampel asal. Kepekatan konidia *B. bassiana* dan *L. lecanii* yang telah digunakan ditunjukkan dalam Jadual 1.

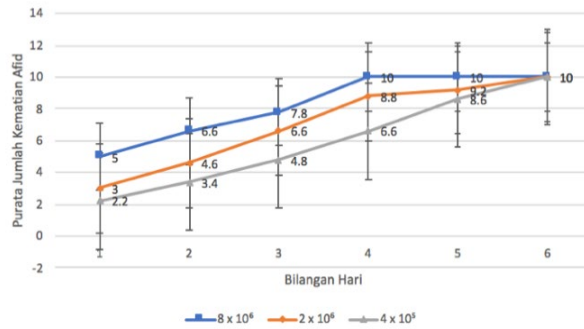
Jadual 1. Kepekatan konidia *Beauveria bassiana* dan *Lecanicillium lecanii*.

Kulat entomopatogen	Kepekatan konidia (spora/mL)
<i>B. bassiana</i> (Selangor)	8×10^6
	2×10^6
	4×10^5
<i>L. lecanii</i> (Perak)	9×10^4
	3×10^4
	2×10^4

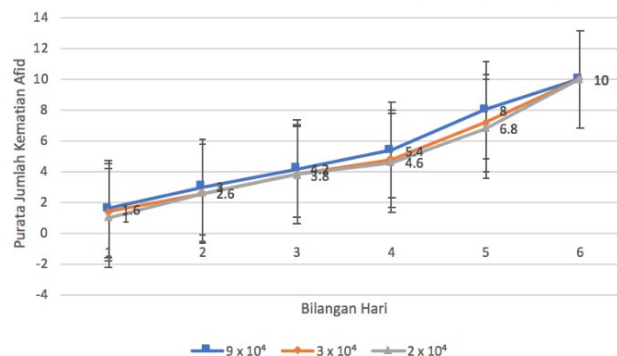
Berdasarkan Jadual 1, kepekatan konidia *B. bassiana* dari Selangor jauh lebih tinggi berbanding *L. lecanii* dari Perak iaitu kepekatan konidia tertinggi *B. bassiana* adalah 8×10^6 spora/mL manakala *L. lecanii* hanya 9×10^4 spora/mL berdasarkan bilangan konidia yang dikira menggunakan hemasitometer. Hal ini mungkin disebabkan oleh variasi dalam penghasilan konidia yang mungkin dipengaruhi oleh faktor persekitaran atau teknik penyediaan sampel. Hasil dan perbezaan antara dua kulat entomopatogen ini menunjukkan bahawa *B. bassiana* lebih berpotensi sebagai agen biopestisid kerana keupayaan *B. bassiana* dalam menghasilkan konidia dalam jumlah yang lebih tinggi seiring dengan hasil daripada kajian lepas (Akhurst et al. 2018; Shah et al. 2021). Kepekatan kulat entomopatogen untuk mengawal afid biasanya sekitar 1×10^6 atau 1×10^8 spora/mL. Kepekatan ini didapati berkesan dan cukup dalam mencapai kadar kematian dalam populasi afid (Keerio et al. 2020). Penghasilan konidia yang tinggi mampu meningkatkan keberkesanannya dalam mengawal serangga perosak terutamanya *T. citricida*. Walau bagaimanapun, faktor lain seperti keberkesanan dalam menjangkiti perumah, kestabilan spora, dan ketahanan terhadap faktor persekitaran masih perlu dikaji untuk menilai kegunaannya dalam aplikasi lapangan. Secara keseluruhan, hasil ini memberi petunjuk awal bahawa *B. bassiana* lebih sesuai untuk dikaji lanjut sebagai agen kawalan biologi berbanding *L. lecanii* sama seperti kajian lepas daripada Mascarin et al. (2016).

3.5 Kadar kematian afid

Kematian afid *Toxoptera citricida* setelah diberi rawatan dengan tiga kepekatan konidia (spora/mL) yang berbeza bagi dua kulat entomopatogen iaitu *B. bassiana* dan *L. lecanii* telah diperhatikan dalam masa enam hari. Sebanyak 10 ekor afid diletakkan di dalam satu piring Petri dan sebanyak lima replikasi telah disediakan bagi setiap piring Petri dan setiap kulat entomopatogen tersebut. Graf garis (purata jumlah afid mati melawan hari) diperhatikan dalam Rajah 11 dan 12.



Rajah 11. Graf garis purata jumlah kematian afid mati melawan hari (*B. bassiana*).



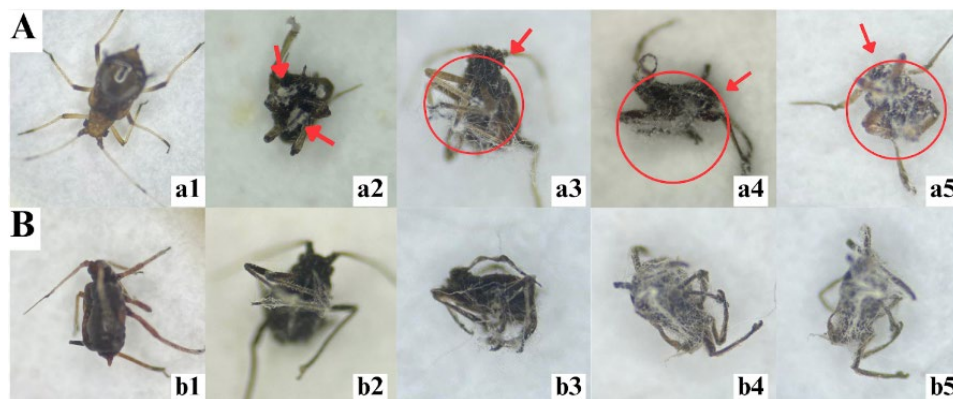
Rajah 12. Graf garis purata jumlah kematian afid mati melawan hari (*L. lecanii*).

Graf garis menunjukkan kesan kepekatan optimum dengan jumlah bilangan spora berbeza bagi kulat entomopatogen *B. bassiana* dan *L. lecanii* terhadap kadar kematian afid sepanjang enam hari. Keputusan menunjukkan bahawa semakin tinggi kepekatan, semakin tinggi kematian afid, dengan *B. bassiana* lebih berkesan secara keseluruhan. Kepekatan tertinggi *B. bassiana* (8×10^6 spora/mL) menyebabkan kematian afid yang pantas, mencapai 100% pada hari ke-4, manakala kepekatan lebih rendah (2×10^6 dan 4×10^5 spora/mL) turut menunjukkan peningkatan berterusan dalam kadar kematian afid, dengan kematian sepenuhnya dicapai pada hari ke-5 dan ke-6. Selain itu, *L. lecanii* pada kepekatan tertinggi (9×10^4 spora/mL) mencapai 100% kematian pada hari ke-6, sementara kepekatan yang lebih rendah (3×10^4 dan 2×10^4 spora/mL) menunjukkan peningkatan secara beransur-ansur dalam kadar kematian afid dari hari ke hari. Keberkesanan *B. bassiana* pada kepekatan yang lebih tinggi adalah lebih pantas dan dikaitkan dengan mekanisme jangkitan yang lebih agresif serta jumlah konidia yang lebih tinggi yang mempercepatkan kolonisasi kulat dan kematian afid (Seabra et al. 2024). Walaupun *L. lecanii* bertindak lebih perlahan, ia tetap mencapai kematian afid sepenuhnya menjelang hari ke-6, menunjukkan potensinya sebagai agen kawalan biologi. Keputusan ini menekankan kepentingan pemilihan kepekatan kulat yang optimum untuk pengurusan perosak yang berkesan di mana kepekatan yang lebih tinggi memberikan kesan kematian yang lebih cepat sementara kepekatan yang lebih rendah masih boleh berkesan dalam tempoh yang lebih lama.

3.6 Kesan morfologi pada afid

Proses jangkitan kulat entomopatogen terhadap *Toxoptera citricida* berlaku secara progresif, bermula dari sentuhan awal sehingga kolonisasi sepenuhnya selepas dirawat oleh kulat entomopatogen *B. bassiana* dan *L. lecanii*. Pada hari kedua, kesan morfologi konidia kulat yang melekat pada kutikel afid dengan tanda awal percambahan terutama diperhatikan pada bahagian kaki dan abdomen ventral iaitu kesan morfologi yang sama seperti kajian daripada Wang et al. (2019). Pada hari ketiga, penembusan hifa menjadi jelas terutamanya di kawasan intersegmen dan sendi di mana kutikel lebih

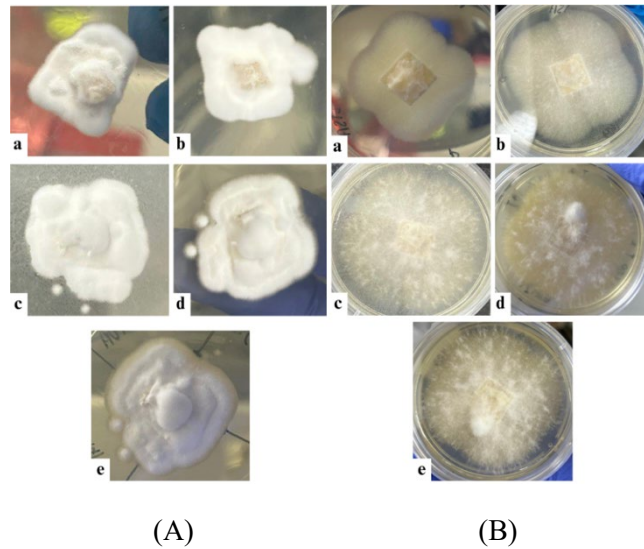
nipis dan lebih mudah terdedah kepada serangan kulat. Apabila jangkitan berterusan sehingga hari kelima, miselium kulat yang kelihatan mula muncul, menyebabkan permukaan kutikel dan perubahan warna terutamanya pada toraks dorsal dan abdomen di mana kelembapan yang lebih tinggi menyokong pertumbuhan kulat seperti kajian daripada Ali (2022). Pengsporaan yang meluas juga meliputi keseluruhan badan afid dengan perkembangan konidia yang padat terutama pada kepala, kaki, dan spirakel abdomen sama seperti kajian lepas daripada Qayyum (2015) dan Ferreira et al. (2024). Kawasan ini kelihatan sebagai tapak utama proliferasi kulat akibat kelemahan struktur dan pengekalan kelembapan yang memudahkan lekatan, penembusan, dan pengsporaan kulat. Rajah 13 menunjukkan kesan morfologi *Toxoptera citricida* selepas dirawat oleh kulat entomopatogen *B. bassiana* dan *L. lecanii*.



Rajah 13. Kesan morfologi afid *Toxoptera citricida* selepas dirawat dengan kulat entomopatogen *B. bassiana* (A) dan (B) menunjukkan morfologi afid selepas dirawat *L. lecanii*. (a1-a5) dan (b1-b5) menunjukkan hari pertama sehingga hari kelima pemerhatian. Anak panah dan bulatan merah menunjukkan pembentukan mikosis berlaku.

3.7 Pertumbuhan semula kulat daripada kaedah pemeliharaan kulat entomopatogen menggunakan teknik kertas turas kering

Berdasarkan Rajah 14, imej yang berturutan menggambarkan perkembangan semula koloni kulat secara progresif dari hari kedua sehingga hari kesepuluh. *B. bassiana* menunjukkan perkembangan secara beransur-ansur dari koloni pusat dengan miselium yang kelihatan lebih tersebar dan bertekstur serbuk (Vega 2015). Koloni menjadi lebih padat menunjukkan proses pengsporaan yang penting bagi keupayaan patogenik dan penyebaran kulat. *L. lecanii* juga menekankan variasi dalam corak pertumbuhan dan kapasiti pengsporaan yang merupakan faktor penting dalam keberkesanan mereka sebagai agen kawalan biologi. Kajian lanjut mengenai kadar pengsporaan dan potensi kevirulenan dalam pelbagai keadaan persekitaran dapat meningkatkan aplikasi kulat ini dalam strategi pengurusan perosak. Pemerhatian ini menjadikan teknik pemeliharaan kulat entomopatogen ini dapat digunakan. Penilaian ukuran pertumbuhan kulat juga dijalankan dengan melibatkan pengukuran diameter koloni pada piring Petri dengan menggunakan kaliper vernier dan Jadual 2 menunjukkan ukuran diameter koloni bagi dua kulat entomopatogen pada selang hari tertentu.

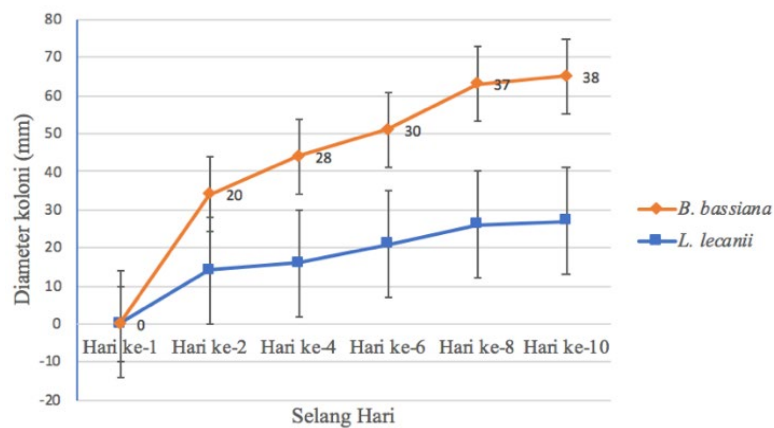


Rajah 14. Pertumbuhan semula kulat entomopatogen *B. bassiana* (A) dan *L. lecanii* (B) pada hari kedua (a), (b) hari keempat, (c) hari keenam, (d) hari kelapan, dan (e) hari kesepuluh.

Penilaian ukuran pertumbuhan kulat juga dijalankan dengan melibatkan pengukuran diameter koloni pada piring Petri dengan menggunakan kaliper Vernier. Jadual 3.2 menunjukkan ukuran diameter koloni bagi dua kulat entomopatogen pada selang hari tertentu dan Rajah 15 menunjukkan graf garis bagi ukuran pertumbuhan koloni.

Jadual 2. Ukuran diameter koloni kulat.

Selang Hari	Purata diameter koloni (mm)	
	<i>B. bassiana</i>	<i>L. lecanii</i>
Hari ke-2	14±	20±
Hari ke-4	16±	28±
Hari ke-6	21±	30±
Hari ke-8	26±	37±
Hari ke-10	27±	38±



Rajah 15. Graf garis bagi ukuran pertumbuhan koloni.

Rajah 15 menunjukkan pertumbuhan diameter koloni *L. lecanii* dan *B. bassiana* sepanjang tempoh 10 hari. Hasil kajian menunjukkan bahawa *L. lecanii* mempunyai kadar pertumbuhan semula yang lebih tinggi berbanding *B. bassiana* dengan peningkatan diameter koloni yang berterusan dari hari ke-2 hingga hari ke-10. *L. lecanii* menunjukkan perkembangan pesat mencapai kira-kira 38 mm pada hari ke-10, manakala *B. bassiana* menunjukkan pertumbuhan yang lebih perlahan iaitu 27mm. Perbezaan kadar pertumbuhan ini mungkin disebabkan oleh perbezaan dalam fisiologi kulat, aktiviti metabolik, dan keupayaan menyesuaikan diri dengan keadaan pertumbuhan yang diberikan (Zhang et al. 2018). Pertumbuhan semula koloni bagi kedua-dua kulat entomopatogen ini penting bagi pemeliharaan kulat entomopatogen sebagai kawalan biologi dengan menggunakan teknik kertas turas kering.

4. Kesimpulan

Kajian ini telah menunjukkan bahawa kulat entomopatogen *B. bassiana* dan *L. lecanii* berjaya mengawal populasi afid *Toxoptera citricida* pada tanaman limau kasturi dengan kepekatan tertinggi *B. bassiana* iaitu 8×10^6 mampu menyebabkan kematian afid 100% pada hari keempat manakala kepekatan 9×10^4 *L. lecanii* menyebabkan kematian afid 100% seawal hari keenam. Kesan morfologi konidia kulat yang melekat pada kutikel afid sebagai percambahan awal dapat diperhatikan seawal hari kedua pada bahagian kaki dan abdomen ventral. Selain itu, teknik pemeliharaan menggunakan kertas turas kering terbukti berkesan berdasarkan pertumbuhan semula menjadikannya kaedah yang praktikal untuk penyimpanan.

Impak kajian ini adalah signifikan dalam menyediakan kulat entomopatogen sebagai kawalan biologi untuk mengawal afid *Toxoptera citricida* dengan mengurangkan kebergantungan kepada racun perosak kimia yang memberi kesan negatif kepada alam sekitar. Penemuan ini membuka peluang inovasi dalam penghasilan produk biopestisid berasaskan kulat entomopatogen yang boleh dikomersialkan kepada industri pertanian.

Penghargaan

Penghargaan diucapkan kepada ahli-ahli penyelidik Makmal Entomologi Gunaan, Pusat Sistemik Serangga UKM dan Taman Botani Bangi UKM yang menjayakan projek kajian ini.

Rujukan

- Akhurst, R. J., & St. Leger, R. J. 2018. Biology of entomopathogenic fungi and their role in pest control. *Fungal Ecology* 35: 1-13.
- Ali, A.A.B. 2022. Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) on eggs and eclosing larvae of the tick *Argas (Persicargas) persicus* (Oken). *Veterinary Parasitology* 306: 109714.
- Broumandnia, F., & Rajabpour, A. 2020. Efficacies of some isolates of *Lecanicillium lecanii* to control *Tribolium castaneum* (Col., Tenebrionidae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 127(5): 625–631.
- El-Maraghy, S.S.M., Abdel-Rahman, M.A.A., Hassan, S.H.M. et al. 2023. Pathogenicity and other characteristics of the endophytic *Beauveria bassiana* strain (Bals.) (Hypocreales: Cordycipitaceae). *Egypt J Biol Pest Control* 33: 79.
- El-Hairiry, A., El-Hairiry, A., & Mahfouz, A. 2024. Aphid-ant relationships: The role of cuticular hydrocarbons and different chemical stimuli in triggering mutualistic behavior. *Agriculture* 14(4): 529.
- Ferreira, J. M., Fernandes, É. K. K., Kim, J. S., & Soares, F. E. F. 2024. The Combination of Enzymes and Conidia of Entomopathogenic Fungi against *Aphis gossypii* Nymphs and *Spodoptera frugiperda* Larvae. *Journal of Fungi* 10(4): 292.
- Francis, F., Fingu-Mabola, J. C., & Ben Fekih, I. 2022. Direct and Endophytic Effects of Fungal Entomopathogens for Sustainable Aphid Control: A Review. *Agriculture* 12(12): 2081.
- Huang, S., Maharachchikumbura, S. S., Jeewon, R., Bhat, D. J., Phookamsak, R., Hyde, K. D., Al-Sadi, A. M., & Kang, J. 2018. *Lecanicillium subprimulinum* (Cordycipitaceae, Hypocreales), a novel species from Baoshan, Yunnan. *Phytotaxa* 348(2): 99.
- Hajji-Hedfi, L., Hlaoua, W., Rhouma, A. et al. 2023. Biological and proteomic analysis of a new isolate of the nematophagous fungus *Lecanicillium* sp. *BMC Microbiol* 23: 108.

- Izham, N.F.M., Jalinas, J., Sundaram, D.A.N., Abba, A. & Khairuddin, W. N. 2024. Pemencilan Nematoda dari Tanah Tanaman Limau Kasturi dan Kesan Nematoda Sebagai Entomopatogen bagi Afid *Toxoptera citricidus*: Isolation of Nematodes from Calamansi Lime Plant Soil and the Effect of Entomopathogenic Nematodes for Aphid (*Toxoptera citricida*). *Semarak Proceedings of Natural and Environmental Sciences* 1(1): 30–35.
- Keerio, A. U., Nazir, T., Abdulle, Y. A., Jatoi, G. H., Gadhi, M. A., Anwar, T., Sokea, T., & Qiu, D. 2020. In vitro pathogenicity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii* at different temperatures against the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(1): 41.
- Kumar, M., Prasad, Y., Yadav, A., & Kumar, A. 2021. Effects of two different surface sterilization (Sodium Hypochlorite and Mercuric Chloride) agents under in-vitro leaf explant in *Gerbera jamesonii*. *The Pharma Innovation Journal* 10(7): 1346–1349.
- Liang, L., Liu, C., Yan, L., Yang, F., Wang, S., & Jiang, X. 2021. New Hybrid Strains via Intraspecific Protoplast Fusion of the Entomopathogenic Fungi *Lecanicillium spp.* *Sains Malaysiana* 50(6): 1639–1650.
- Li, X., Zhang, B., Zou, J., Li, Q., Liu, J., Cai, S., & Lin, S. 2023. Immune responses and transcriptomic analysis of *Nilaparvata lugens* against *Metarhizium anisopliae* YTTR mediated by rice ragged stunt virus. *Plants* 12(2): 345.
- Lima, J. E., Alves, D. A., Cruz, M. C. M., & Soares, M. A. 2020. Alternative insecticides in the control of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Hemiptera: Aphididae). *Scientific Electronic Archives* 13(10): 17–20.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. 2016. The production and formulation of fungal biocontrol agents: From laboratory to field application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(11): 191.
- Mathers, T. C., Wouters, R. H. M., Mugford, S. T., Biello, R., van Oosterhout, C., & Hogenhout, S. A. 2023. Hybridisation has shaped a recent radiation of grass-feeding aphids. *BMC Biology* 21: 157.
- Norjmaa, N., D, N., B, E., & D, B. 2019. Morphological and molecular identification of *Beauveria bassiana* from agricultural soils. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences* 27(02): 20–24.
- Qubbaj, T. and Samara, R. 2022. Efficacy of Three Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* isolates against Black Bean Aphid, *Aphis fabae* (Scop.) (Hemiptera: Aphididae) on Faba bean. *Legume Research* 45(12): 1572–1579.
- Qayyum, M. A., Wakil, W., Arif, M. J., Sahi, S. T., & Dunlap, C. A. 2015. Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. *Biological Control* 90: 200–207.
- Shinde, S. S., & Dale, N. S. 2019. Evaluations of different culture media for mass production of *Beauveria bassiana*. *International Journal of Entomology Research* 4(3): 55–56.
- Seabra, M. G. de J., Santos, T. S., Varize, C. de S., Souto, E. B., Severino, P., & Mendonça, M. da C. 2024. New *Beauveria bassiana* aerial conidia-based bioinsecticide obtained by spray-dried microencapsulation of the entomopathogenic fungi in biopolymers for crop protection. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 34(58).
- Sani, I., Ismail, S.I., Saad, N., Abdullah, S., Jalinas, J. & Jamian, S. 2020a. Insect pests of vegetables in Malaysia and their management using entomopathogenic fungi. *Serangga* 25(3): 126–43.
- Sani I, Ismail S.I., Abdullah S, Jalinas J, Jamian S, Saad N. 2020b. A Review of the Biology and Control of Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with Special Reference to Biological Control Using Entomopathogenic Fungi. *Insects* 11(9):619.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. 2021. Entomopathogenic fungi as biological control agents: How can their efficacy be improved. *Biocontrol Science and Technology* 31(6).
- Subramaniam, M.S.R., Babu, A. & Deka, B. 2021. *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & Gams, as an efficient biocontrol agent of tea thrips, *Scirtothrips bispinosus* Bagnall (Thysanoptera: Thripidae). *Egypt J Biol Pest Control* 31: 38.
- Suherman F.H.S, Nur Adliza Baharom, N. A. & Mohd Nazarudin Anuar, M.N. 2021. Potensi kulat entomopatogen sebagai agen kawalan biologi untuk kawalan lalat putih pada tanaman *Solanaceae*. *Buletin Teknologi MARDI Bil.* 25.
- Tsai, J. H., Liu, Y. H., & Lee, R. F. 2020. Biology and control of brown citrus aphid (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) and *Citrus tristeza* virus. *Radcliffe's IPM World Textbook*.
- Vega, F. E., & Blackwell, M. 2015. Entomopathogenic fungi: An overview and their role in biological control. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 24–36.
- Wang, Y., Li, Z., & Liu, J. 2019. Histopathological and morphological effects of *Beauveria bassiana* on aphids under controlled conditions. *Journal of Economic Entomology* 112(3): 1349–1357.
- Xie, T., Jiang, L., Li, J., Hong, B., Wang, X., & Jia, Y. 2019. Effects of *Lecanicillium lecanii* strain JMC-01 on the physiology, biochemistry, and mortality of *Bemisia tabaci* Q-biotype nymphs. *PeerJ* 7: e7690.
- Zhang, J., & Wang, C. 2018. The effect of preservation methods on the growth and virulence of *Beauveria bassiana* isolates used for biocontrol. *Biological Control* 118: 118–126.

Characterisation of protease and xylanase from *Bacillus subtilis* SUNGB2 (Pencirian protease dan xilanase daripada *Bacillus subtilis* SUNGB2)

Yvonne Yve Wen Thoe, Farah Nazirah Rostam & Izyanti Ibrahim*

*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti
Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: izzy@ukm.edu.my*

Abstract: Industries such as food processing, leather manufacturing, and pulp and paper production require efficient and eco-friendly enzymes to replace harsh chemical processes. *Bacillus subtilis* SUNGB2, a thermophilic bacterium, produces extracellular protease and xylanase with significant industrial potential. However, limited studies have explored their biochemical properties and suitability for large-scale applications. This pioneering study on the newly isolated strain characterises these enzymes at a small laboratory scale, focusing on the effects of pH and temperature on their activity. Partial purification was achieved using 50% ammonium sulphate precipitation for protease and 40% for xylanase, followed by dialysis and Sephadex G-75 gel filtration chromatography. The optimum pH for protease activity was determined using buffers within pH range of 4–9, while xylanase was tested within pH 3–9. The purified enzymes were assayed at different temperatures: 35–80°C for protease and 30–70°C for xylanase. Protease and xylanase had purification factors of 2.38 and 0.71, with recovery rates of 1.12% and 2.89%, respectively. The optimum pH was 7.0 for protease and 5.0 for xylanase, while the optimum temperatures were 60°C and 50°C, respectively. These findings provide valuable insights into *B. subtilis* SUNGB2 enzymes, laying the foundation for optimising their industrial applications and sustainability.

Keywords: *Bacillus subtilis*; pH; protease; temperature; xylanase

Abstrak: Industri seperti pemprosesan makanan, pembuatan kulit, dan pengeluaran pulpa serta kertas memerlukan enzim yang cekap dan mesra alam bagi menggantikan proses kimia yang mencemarkan. *Bacillus subtilis* SUNGB2, suatu bakteria termofili, menghasilkan protease dan xilanase ekstraselular yang mempunyai potensi industri yang tinggi. Namun, kajian mengenai sifat biokimia dan kesesuaian enzim ini untuk aplikasi berskala besar masih terhad. Kajian perintis terhadap strain yang baharu dipencilkan ini mencirikan enzim-enzim tersebut pada skala makmal kecil dengan memberi tumpuan kepada kesan pH dan suhu terhadap aktiviti. Penulenan separa dicapai melalui pemendakan amonium sulfat 50% untuk protease dan 40% untuk xilanase, diikuti dengan dialisis dan kromatografi penurasan gel Sephadex G-75. Julat pH optimum bagi aktiviti protease ditentukan menggunakan penimbal pada julat antara pH 4–9, manakala xilanase dalam julat pH 3–9. Sampel enzim yang telah disepara tulen diuji pada suhu berbeza: 35–80°C untuk protease dan 30–70°C untuk xilanase. Protease dan xilanase masing-masing menunjukkan faktor penulenan sebanyak 2.38 dan 0.71, dengan peratus kembalian sebanyak 1.12% dan 2.89%, masing-masing. Kesimpulannya, pH optimum bagi protease ialah 7.0, manakala bagi xilanase ialah 5.0, dengan suhu optimum masing-masing pada 60°C dan 50°C. Penemuan ini memberikan pemahaman penting mengenai enzim *B. subtilis* SUNGB2, sekali gus menjadi asas untuk mengoptimumkan penggunaannya dalam industri dan kelestariannya.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*; pH; protease; suhu; xilanase

1. Introduction

In the modern era, extensive research on microorganisms, particularly bacteria, has provided valuable insights into their diverse characteristics and applications. Among these microorganisms, *Bacillus* species have been widely studied due to their ability to produce industrially relevant enzymes, antibiotics, and metabolites. Specifically, *Bacillus subtilis*, a thermophilic bacterium, has gained attention for its production of extracellular enzymes that function optimally at high temperatures (50–80°C), making them highly valuable in industrial applications (Danilova et al. 2020). Thermophilic bacteria, classified under extremophiles, thrive in extreme environments, offering unique enzymatic properties that enhance biocatalysis efficiency in various sectors.

One novel strain, *B. subtilis* SUNGB2, that been isolated from Sungai Klah Hot Spring, Perak has been investigated for its production of key industrial enzymes, including protease, amylase, lipase, cellulase, and xylanase. While each enzyme serves distinct functions, their industrial applications are significant. Proteases catalyse the hydrolysis of peptide bonds in proteins while xylanases hydrolyse the β -1,4 linkages in xylan polysaccharides.

Given their broad industrial significance, the characterisation of protease and xylanase from *B. subtilis* SUNGB2 was prioritised in this study. Proteases play a crucial role in multiple industries, including food, leather processing, detergents, and pharmaceuticals (Msarah et al. 2018). Their resilience to extreme conditions, particularly those derived from extremophiles, makes them attractive for industrial applications. In the food industry, proteases improve protein digestibility, enhance flavour, meat tenderiser and aid in bakery processes by modifying gluten strength (Azmi et al. 2023). In leather processing, they facilitate hair removal and reduce chemical pollution (Hasan et al. 2022). Furthermore, proteases serve as biomarkers in medical diagnostics and contribute to bioactive peptide production for regulating blood pressure (Rai et al. 2024).

Similarly, xylanases hold significant promise in the pulp and paper industry, which is regarded as one of the major global polluters due to hazardous liquid waste released during paper manufacturing (Singh et al. 2022). The industry has increasingly adopted enzyme-based methods as a sustainable alternative to chlorine-based bleaching, with xylanase demonstrating particular effectiveness as a bio-bleaching agent. By degrading xylan structures near lignin attachment points, xylanase facilitates lignin removal. It also enhances fiber permeability by hydrolysing short-chain xylan that precipitates on fiber surfaces, thereby mitigating bleaching agent resistance and minimising chlorine dioxide (ClO₂) usage. Consequently, xylanase enhances bleaching efficiency, lowers xylan accumulation, and significantly reduces environmental impact. According to Almeida et al. (2022), xylanase-assisted pulp bleaching process led to a 25% reduction in chlorine dioxide (ClO₂) usage and an 18% decrease in adsorbable organic halides (AOX), without compromising pulp quality or papermaking performance.

This study focuses on the characterisation of protease and xylanase from *B. subtilis* SUNGB2, highlighting their potential in industrial applications. By investigating their biochemical properties and optimizing their activity, this research aims to contribute to the development of enzyme-based solutions for sustainable and efficient industrial processes.

2. Materials and Methods

2.1 Partial Purification

Partial purification of each crude enzyme was carried out by ammonium sulphate precipitation at 4 °C after the optimisation of ammonium sulphate saturation at 40–70% followed by dialysis with slightly modification as in Naveed et al. (2023). The resulting sample through ammonium sulphate precipitation at optimised saturation was purified using Sephadex G-75 gel filtration chromatography (separation range is 3–80 kDa). After partial purification, a purification table was used to observe the effectiveness of enzyme purification.

2.2 Protease assay

A tyrosine standard curve was prepared using 200 µg/mL tyrosine stock, distilled water, 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5 and 20% trichloroacetic acid (TCA). The tyrosine standard curve was plotted with OD₆₆₀ against total tyrosine (µmol). Protease activity assay was performed by adding 0.5 mL of enzyme sample with 2.5 mL of 1% casein as substrate in 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5 and assayed at 55°C for 10 minutes. Next, 0.5 mL of 20% TCA was added to stop the protease enzyme reaction. The solution was placed at room temperature for 30 minutes. After that, 5 mL 0.5 M sodium carbonate (Na₂CO₃) solution and 0.5 mL of 0.1 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent were added and the sample was kept in the dark for 20 minutes. Then, the colour intensity of the sample was read at 660 nm and the absorbance was recorded. All assays were performed in replicates (Raid et al. 2021).

2.3 Xylanase assay

The xylose standard curve was prepared using 1 mg/mL xylose in 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 with dinitrosalicylic acid (DNS) reagent. The xylose standard curve was plotted by measuring the absorbance at OD₅₄₀ against the xylose concentration (µmol). Xylanase assay was performed by adding 0.5 mL of enzyme sample with 0.5 mL of 1% corn cob xylan in 0.05 M citrate buffer, pH 5.0, and incubated at 50°C for 15 minutes (Irfan et al. 2013). The reaction was stopped by adding 1.75 mL of DNS reagent and heating in boiling water for 10 minutes. After cooling, the released xylose was measured spectrophotometrically at 540 nm.

2.4 Protein concentration determination

The protein concentration of the sample was determined using the Bradford Assay. Bradford standard curve was prepared using 100 µg/mL bovine serum albumin (BSA) stock, distilled water and Bradford solution. Aliquots of 0.1 mL BSA with different concentrations ranging from 0– 100 µg/mL were prepared. Then, 0.7 mL of distilled water and 0.2 mL of Bradford solution was added to each tube and mixed well. The tubes were left at room temperature for 5 minutes before OD₅₉₅ was recorded. The tube without BSA was used as blank. All tubes were prepared in triplicates. Bradford standard curve was plotted with OD₅₉₅ against total protein (µg). The protein content of the sample was determined through the Bradford standard curve.

2.5 pH profiling

To determine the effect of pH on protease and xylanase activities, various pH assay solutions were prepared using different buffer: 0.05 M citrate buffer (pH 3.0–6.0), 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0– 8.0) and 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0–9.0). For protease assay with modifications based on Rehman et al. (2025), a total of 0.5 mL of purified protease sample was added to 2.5 mL of 1% casein in buffers of different pH and incubated at 55°C for 10 minutes. As for xylanase, the effects of pH were determined by assaying 0.5 mL of purified xylanase with 1 mL of 0.5% corn cob xylan in different buffers and incubated at 50°C for 15 minutes. The protease and xylanase activities were measured as mentioned in 2.2 and 2.3, respectively.

2.6 Temperature profiling

The enzyme activities were assayed at different temperatures, with protease ranging from 35°C to 80°C and xylanase at 30°C to 70°C. The protease and xylanase activities were assayed and measured according to 2.2 and 2.3 described above.

3. Results and Discussion

3.1 Partial purification

The crude enzyme of protease and xylanase were purified using ammonium sulphate precipitation followed by dialysis and Sephadex G-75 gel filtration chromatography.

The 50% ammonium sulphate precipitation step for protease had removed more than 90% of protein, and at the same time 90% of enzyme activity was also lost (Refer Table 1). Although optimisation had been done to determine the optimum ammonium sulphate concentration, the amount of enzyme activity lost was still high. This may be due to the low initial protein concentration and enzyme instability. Low initial protein concentration (30.70 mg protein) reduces the efficiency of ammonium sulphate precipitation (Grossmann et al. 2023). Lack of inhibitors are the other reason that causes the loss of enzyme activities due to denaturation and digestion of protein by protease enzymes. After the gel filtration chromatography step, the protease of *B. subtilis* SUNGB2 was purified with a purification factor of 2.38 and a recovery percentage of 1.12%, indicating that only a small amount of protease activity was successfully retained from the crude extract. This result was much lower than expected. According to Hashmi et al. (2022), the protease activity of *B. subtilis* using different culture media was 99.8 U/mL. Although the fractions were stored at 4°C after collection, the chromatography, which was not carried out at 4°C, might cause the protease to autocatalysed. With this, protease inhibitors can be added to the crude extract before purification to reduce protease autocatalysis (Jiang et al. 2020).

Table 1. Purification table for protease and xylanase enzymes of *B. subtilis* SUNGB2

Purification Steps	Volume (mL)	Total protein (mg)	Protein concentration (µg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Percentage of recovery (%)
Protease							
Crude enzyme	450	30.70	68.23	116.23	3.79	1.00	100.00
50% Salt precipitation	4.7	0.50	107.39	2.48	4.90	1.30	2.13
Sephadex G-75	10.5	0.14	13.79	1.30	9.00	2.38	1.12
Xylanase							
Crude enzyme	380	1.43	3.75	1.98	1.39	1.00	100.00
40% Salt precipitation	7	0.72	102.9	0.50	0.69	0.50	25.16
Sephadex G-75	6	0.058	9.64	0.057	0.98	0.71	2.89

Whereas, 40% ammonium sulphate precipitation for xylanase resulted in a low purification factor (0.5-fold) and yield (25.16%). The purification factor is generally expected to increase after each purification step, reflecting the efficiency of each stage (Westphal et al. 2021). However, this was not observed during the ammonium sulfate precipitation, as the purification factor decreased by half. This was due to the low protein concentration in the crude enzyme (3.75 µg/mL) compared to Breccia et al. (1998), which reported 358 µg/mL. This difference affected the efficiency of ammonium sulphate precipitation, as higher protein concentrations enhance stability during precipitation (Grossmann et al. 2023). Only 25.16% of enzyme activity was retained while the rest was likely lost, also due to proteolysis by proteases produced by *B. subtilis* SUNGB2, possibly because the temperature during this step was not sufficiently low to inhibit protease activity (Msarah et al. 2018). After gel filtration chromatography, the purification factor and yield were recorded at 0.71-fold and 2.89%, respectively. Although no prior studies have purified xylanase from this specific strain, the current findings contrast with those reported by Kapilan (2015), who achieved a high purification factor of 6.7-fold and a recovery yield of 85% for xylanase from *B. subtilis* using DEAE-Sepharose ion exchange chromatography. The low purification results and decreasing

recovery trend across each purification step were attributed to the low initial protein concentration in the crude extract, which led to greater protein loss in subsequent steps due to nonspecific binding, incomplete elution or adsorption to the purification matrix.

3.2 Effects of pH on enzyme activity of protease and xylanase

The effect of pH on the protease and xylanase activities were performed by assaying partial purified enzyme in reaction solutions with various pH. Various buffers were used to produce different pH assay solutions because each type of buffer has its own buffering capacity.

Based on Figure 2, the optimum pH for *B. subtilis* SUNGB2 protease was pH 7.0 in 0.05 M phosphate buffer with the highest specific activity of 7.45 U/mg (Figure 2). These indicate that this protease may be neutral proteases such as cysteine proteases. At pH 6.0, the specific activity of protease in citrate buffer was 4.5 times higher than that in phosphate buffer. This might be due to the reaction of potassium phosphate buffer with several metal ions including calcium and magnesium ions. This interaction inhibits the reaction of enzymes by affecting the stability of protease enzymes and decreasing enzyme activity. However, this protease maintained 50% of its activity at a pH range of 5.5–8.0. The stability of enzyme at a broad range of pH and neutral optimum (pH 7) make it suitable for food, detergent, leather and bioprocessing. For example, cheese manufacturing uses protease for casein hydrolysis at near-neutral pH, baking industries for gluten hydrolysis. Additionally, the interactions of metal ions with the enzyme must be controlled for optimum activity.

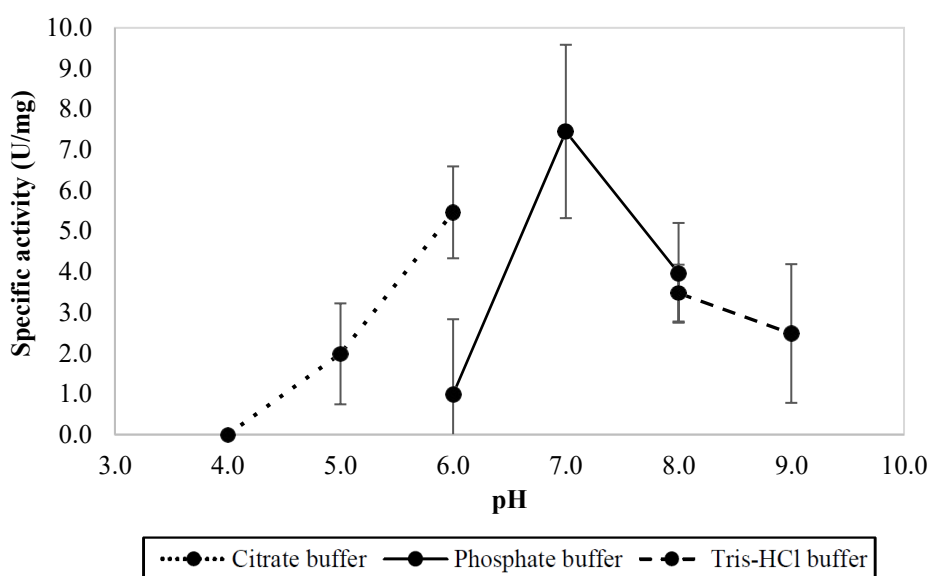


Figure 2. pH profile of *B. subtilis* SUNGB2 protease enzyme activity (n = 4).

Xylanase activity was highest at pH 5.0 in 0.05 M citrate buffer, reaching 0.014 U/mg, consistent with the findings of Irfan et al. (2013). *B. subtilis* SUNGB2 xylanase also retained 50% of its activity between pH 3.0–7.0. Activity increased with pH up to pH 5 but declined at higher alkalinity as pH changes disrupted the ionisation of enzyme functional groups, altering its structure and function, leading to activity loss in unsuitable pH conditions (Sulistiana et al. 2021). Results also showed variations in xylanase activity across different buffers at the same pH. At pH 6, activity decreased by 33%, from 0.012 U/mg in citrate buffer to 0.008 U/mg in phosphate buffer. This reduction was due to phosphate ions reacting with essential metal ions like calcium and magnesium, affecting enzyme activity. Additionally, acidophilic xylanases contain Glu, Asp, and Gln residues at their active sites (Kim et al. 2023). In acidic conditions, Glu and Asp protonation reduces electrostatic repulsion, allowing phosphate ions to interact with the active site via hydrogen bonding. A similar pH-dependent binding behavior was observed in the study by Singh et al. (2022), which, although not directly implicating Glu/Asp protonation, supports a related mechanism that impairs catalytic efficiency. This interaction disrupts enzyme function and reduces the catalytic efficiency of xylanase in the phosphate buffer system.

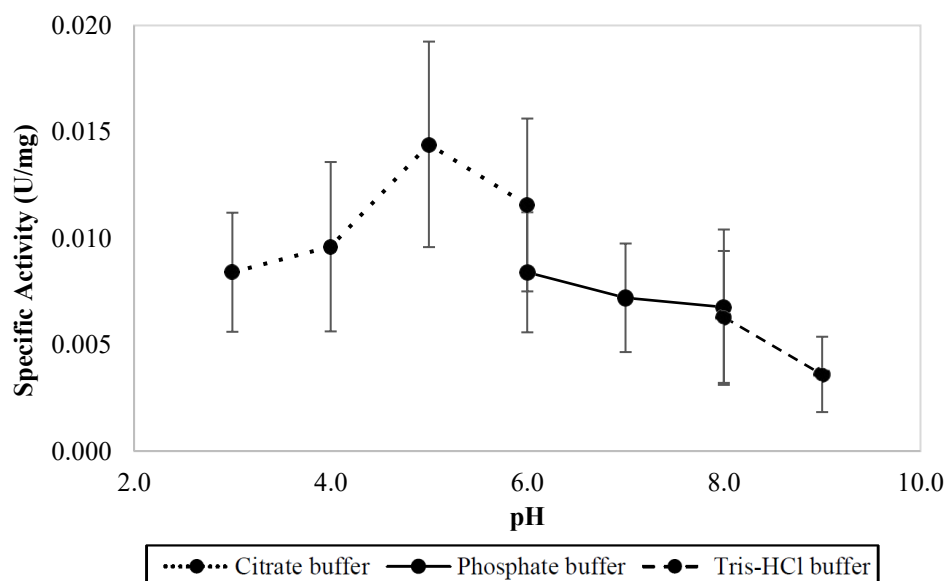


Figure 3. pH profile of *B. subtilis* SUNGB2 xylanase enzyme activity (n = 4).

3.3 Effects of temperature on enzyme activity of protease and xylanase

The effect of temperature on the enzyme activity of partially purified *B. subtilis* SUNGB2 protease and xylanase has been carried out at various assay temperatures.

B. subtilis SUNGB2 protease enzyme has the highest specific activity of 28.81 U/mg at incubation temperature of 60 °C (Figure 4). This result was the same as the study of Naidu (2011) which shows the optimum temperature for *B. subtilis* protease activity is 60 °C. Furthermore, it can be seen that protease can retain more than 50% of its activity in the temperature range of 50–64 °C. The thermotolerance of protease at moderate heat holds a significant potential for food processing that needs to retain the nutritional value of food and detergent that contains many other enzymes with different thermostabilities.

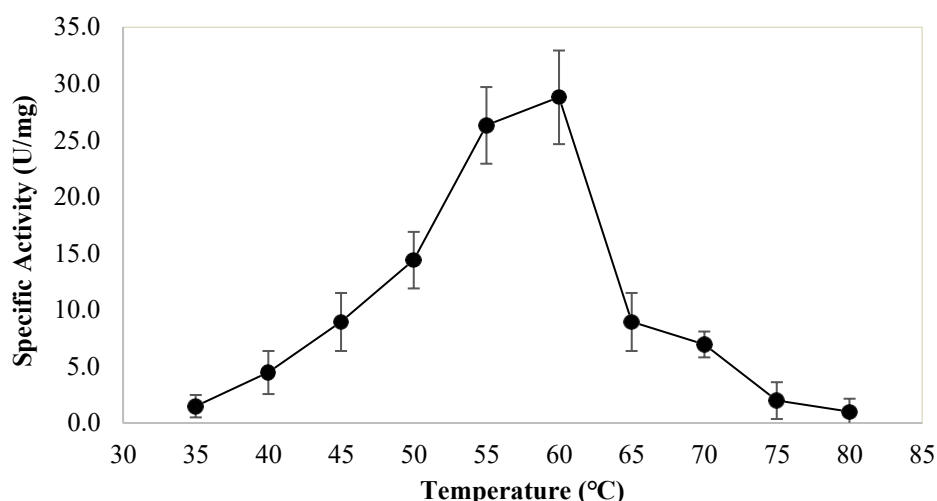


Figure 4. Temperature profile of *B. subtilis* SUNGB2 protease enzyme activity at 35–80°C (n = 4).

Xylanase activity increased with temperature from 30°C to 50°C, reaching a peak of 0.022 U/mg at 50°C. The enzyme retained 50% of its activity between 40°C and 60°C. These findings align with Irfan et al. (2013), who also reported optimal xylanase activity at 50°C. However, other studies have shown that some *Bacillus*-derived xylanases exhibit greater thermostability, with optimal activity at 60°C.

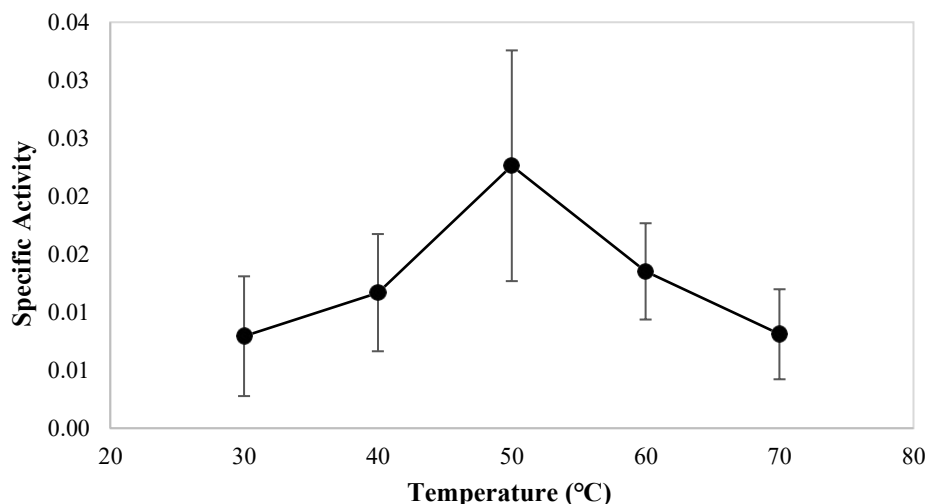


Figure 5. Temperature profile of *B. subtilis* SUNGB2 xylanase enzyme activity at 30–70°C (n = 4).

According to Liu et al. (2025), the kinetic energy of molecules is proportional to temperature. As the incubation temperature increases, the kinetic energy in the sample increases, making molecules move faster and increasing collisions between the enzyme's active site and substrate. With this, enzyme activity will increase as the temperature increases. Based on the Arrhenius equation that explains the relationship between reaction rate and absolute temperature, this will accelerate the formation of enzyme-substrate complexes (Crapse et al. 2021). As the temperature rises, some heat energy will be converted to chemical potential energy. If this potential energy is high enough to break the weak bonds in the protein, the three-dimensional shape of the active protein will break down and causing the enzyme reaction rate to decrease due to the denaturation of the enzyme.

4. Conclusion

After partial purification using ammonium sulphate precipitation followed by dialysis, then Sephadex G-75 gel filtration chromatography, the protease and xylanase enzymes of *B. subtilis* SUNGB2 were purified with a purification factor of 2.38 and 0.71; percentage of recovery 1.12% and 2.89% respectively. The optimum pH for protease activity was pH 7.0 with more than 50% of its activity remained between pH 5.5–8.0; for xylanase was pH 5.0 with more than 50% of its activity remained between pH 3.0 to pH 7.0. The optimum temperature for protease activity was 60°C and more than 50% of its activity remained at 50–64 °C; for xylanase was 50°C and more than 50% of its activity remained at 40–60 °C.

Acknowledgements

The authors acknowledge Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia, for supporting this work.

References

- Almeida, N., Meyer, V., Burnet, A., Boucher, J., Talens-Perales, D., Pereira, S., Ihalainen, P., Levée, T., Polaina, J., Petit-Conil, M., Camarero, S. & Pinto, P. 2022. Use of a Novel Extremophilic Xylanase for an Environmentally Friendly Industrial Bleaching of Kraft Pulps. *International Journal of Molecular Sciences* 23(21): 13423.
- Azmi, S.I.M., Kumar, P., Sharma, N., Sazili, A.Q., Lee, S.J. & Ismail-Fitry, M.R. 2023. Application of Plant Proteases in Meat Tenderization: Recent Trends and Future Prospects. *Foods* 12(6): 1336.
- Breccia, J.D., Siñeriz, F., Baigorí, M.D., Castro, G.R. & Hatti-Kaul, R. 1998. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology* 22(1): 42–49.

- Crapse, J., Pappireddi, N., Gupta, M., Shvartsman, S.Y., Wieschaus, E. & Wühr, M. 2021. Evaluating the Arrhenius equation for developmental processes. *Molecular Systems Biology* 17(8).
- Danilova, I. & Sharipova, M. 2020. The Practical Potential of *Bacilli* and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Grossmann, L. & McClements, D.J. 2023. Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. *Food Hydrocolloids* 137: 108416.
- Hasan, M.J., Haque, P. & Rahman, M.M. 2022. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. *Journal of Cleaner Production* 365.
- Hashmi, S., Iqbal, S., Ahmed, I. & Janjua, H. A. 2022. Production, optimization, and partial purification of alkali-thermotolerant proteases from newly isolated *Bacillus subtilis* S1 and *Bacillus amyloliquefaciens* KSM12. *Processes* 10(6): 1050.
- Irfan, M., Nadeem, M. & Syed, Q. 2013. Purification and kinetics study of thermostable cellulase free Xylanase from *Bacillus subtilis*. *Protein & Peptide Letters* 20(11): 1225–1231.
- Jiang, L., Yuan, C. & Huang, M. 2020. A general strategy to inhibit serine protease by targeting its autolysis loop. *The FASEB Journal* 202.
- Kapilan, R. 2015. Purification of xylanase from *Bacillus subtilis* BS166. *Journal of Science* 57: 511–515.
- Kim, I.J., Kim, S.R., Bornscheuer, U.T. & Nam, K.H. 2023. Engineering of GH11 xylanases for optimal pH shifting for industrial applications. *Catalysts* 13(11).
- Liu, Y. & Baggioli, M. 2025. Revisiting the phonon theory of liquid heat capacity: Low-frequency shear modes and intramolecular vibrations. *Physical Review B* 111(14): 144201.
- Msarah, M.J., Aqma, W.S. & Ibrahim, I. 2018. Isolation of thermophilic bacteria producing extracellular enzyme from Sungai Klah Hot Spring, Malaysia. *Malaysian Applied Biology* 47(5): 269–275.
- Naidu, K.S. 2011. Characterization and purification of protease enzyme. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011(3).
- Naveed, M., Wang, Y., Yin, X., Wajid, M., Aslam, S., Wang, F., Xu, B. & Ullah, A. 2023. Purification, Characterization and Bactericidal Action of Lysozyme, Isolated from *Bacillus subtilis* BSN314: A Disintegrating Effect of Lysozyme on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Molecules* 28(3): 1058–1058.
- Rai, P., Hoba, S.N., Buchmann, C., Subirana-Slotos, R.J., Kersten, C., Schirmeister, T., Endres, K., Bufe, B. & Tarasov, A. 2024. Protease detection in the biosensor era: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 244: 115788–115788.
- Raid, D.T., Mahmood H.M., Essam A. M. & Homady, M.H. 2021. Quantitative Methods for Alkaline Protease Determination and its Applications: A Comprehensive Review. *International Journal of Clinical Case Reports and Reviews* 6(1): 1–4.
- Rehman, K.U., Abdelrahman, E.A., Alissa, M., Khattak, N.S., Alghamdi, A., Alghamdi, S.A., Alshehri, M.A., Aloraini, G.S., Abou-Krishna, M.M. & Alhamzani, A. G. 2025. Thermostable and Solvent-Tolerant Alkaline Protease from *Galium aparine*: Purification and Industrial Applications. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 771: 110529–110529.
- Singh, A.K., Kumar, A. & Chandra, R. 2022. Environmental pollutants of paper industry wastewater and their toxic effects on human health and ecosystem. *Bioresource Technology Reports* 20: 101250.
- Singh, A.K., Kumar, A. & Chandra, R. 2022. Environmental pollutants of paper industry wastewater and their toxic effects on human health and ecosystem. *Bioresource Technology Reports* 20: 101250.
- Sulistiana, D., Anggraini, D.P. & Agustina, D.K. 2021. Characterization of Xylanase Enzymes of *Bacillus subtilis* as a Biobleaching Agent. *Jurnal Pena Sains* 8(1): 22–28.
- Westphal, A.H. & van Berkel, W.J.H. 2021. Techniques for Enzyme Purification. Dlm. de Gonzalo, G. & Lavandera, I. (pnyt.). *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*. hlm. 1–31. First. WILEY-VCH GmbH.

Penentuan Aktiviti Antibakteria Bagi Ekstrak Gaharu *Aquilaria malaccensis* Aruhan Semula Jadi

(Determination of Antibacterial Activity for Naturally Formed *Aquilaria malaccensis* Agarwood Extract)

Siti Shazleena Abdul Aziz¹, Yashirdisai Sampasivam² & Roohaida Othman^{1,2,*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Institute of Systems Biology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: roohaida@ukm.edu.my

Abstrak: Gaharu yang dihasilkan oleh beberapa spesies *Aquilaria* banyak digunakan dalam perubatan tradisional untuk merawat penyakit seperti masalah kolik. Ekstrak gaharu didapati mempunyai beberapa aktiviti biologi namun belum ada kajian mengenai keupayaannya sebagai bahan antibakteria yang berperanan merawat kolik. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk mengekstrak gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi menggunakan empat pelarut iaitu etanol, heksana, kloroform dan etil asetat. Seterusnya, aktiviti antibakteria ekstrak tersebut ditentukan terhadap bakteria Gram-negatif dan bakteria Gram-positif yang masing-masing adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Aktiviti antibakteria yang paling tinggi ditunjukkan oleh ekstrak etanol gaharu *A. malaccensis* dengan diameter zon perencatan masing-masing sepanjang 8.3 dan 8.0 mm bagi *E. coli* dan *S. aureus*. Nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) ekstrak tersebut bagi *E. coli* dan *S. aureus* yang ditentukan menggunakan kaedah mikrodilusi kaldu adalah masing-masing 1 dan 0.5 mg/mL. Namun begitu, terdapat pertumbuhan koloni bakteria dalam ujian kepekatan bakterisidal minimum (MBC) yang ditentukan melalui subkultur bakteria ke dalam piring agar menunjukkan bahawa kesemua ekstrak gaharu *A. malaccensis* tidak dapat membunuh kedua-dua bakteria tersebut. Kesimpulannya, kajian ini menunjukkan bahawa kesemua ekstrak gaharu *A. malaccensis* mempamerkan kesan perencatan dan bukannya aktiviti bakterisidal kemungkinan disebabkan kepekatan ekstrak yang rendah. Potensi gaharu *A. malaccensis* sebagai sumber baharu agen antibakteria boleh dikaji dengan menambahbaik kaedah pengekstrakan untuk memperoleh ekstrak yang lebih berkesan.

Kata kunci: Antibakteria; *Aquilaria malaccensis*; ekstrak gaharu; perubatan tradisional

Abstract: Agarwood produced by several *Aquilaria* species is widely used in traditional medicine to treat diseases such as colic. Agarwood extract has been found to possess several biological activities, however there is no study on its ability as an antibacterial agent that plays a role in treating colic. Therefore, this study was conducted to extract naturally formed *A. malaccensis* agarwood using four solvents, namely ethanol, hexane, chloroform and ethyl acetate. Subsequently, the antibacterial activity of the extract was determined against Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria, namely *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. The highest antibacterial activity was shown by the ethanol extract of *A. malaccensis* agarwood with an inhibition zone diameter of 8.3 and 8.0 mm for *E. coli* and *S. aureus*, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the extract for *E. coli* and *S. aureus*, determined using broth microdilution method, were 1 and 0.5 mg/mL, respectively. However, there was bacterial colony growth in the minimum bactericidal concentration (MBC) test by subculturing onto agar plates, which showed that all *A. malaccensis* agarwood extracts could not kill the two bacteria. In conclusion, this study showed that all the extracts of *A. malaccensis* agarwood exhibited inhibitory effects rather than bactericidal activity, possibly due to the low extract concentration. The potential of *A. malaccensis* agarwood as a new source of antibacterial agents can be explored by improving the extraction method to obtain more effective extracts.

Keywords: Agarwood extract; antibacteria; *Aquilaria malaccensis*; traditional medicine

1. Pendahuluan

Aquilaria malaccensis atau dikenali sebagai pokok karas merupakan spesies *Aquilaria* yang berasal dari famili Thymelaeaceae. Daripada 31 spesies *Aquilaria* di seluruh dunia, hanya 19 spesies *Aquilaria* sahaja yang boleh menghasilkan gaharu. Pokok karas boleh ditemui di Indonesia, Malaysia, China, India, Philippines, Cambodia, Vietnam, Laos, Thailand, Papua New Guinea dan Singapura (Wang et al. 2018). Lima spesies *Aquilaria* boleh dijumpai di Malaysia iaitu *A. malaccensis*, *A. microcarpa*, *A. hirta*, *A. beccariana* dan *A. rostrata* (Jabatan Perhutanan Semenanjung Malaysia 2015).

Gaharu terbentuk dalam batang pokok karas sebagai hasil tindak balas secara semula jadi apabila pokok karas terdedah kepada infeksi fungi dan mikroorganisma berikutan pokok mengalami luka akibat serangan serangga, kebakaran dan panahan kilat. Gaharu dianggap sebagai produk kayu termahal di dunia yang digunakan dalam upacara keagamaan, bahan kosmetik, minyak wangi serta perubatan tradisional sebagai sedatif, analgesik, karminatif dan ubat penenang (Siti Nazirah et al. 2017; Zhang et al. 2014). Lapan spesies *Aquilaria* termasuk *A. malaccensis* telah disenaraikan sebagai spesies terancam dalam International Union for Conservation of Nature (IUCN) Kategori Senarai Merah dan hampir semua spesies *Aquilaria* telah dimasukkan ke dalam senarai Lampiran II Konvensyen Perdagangan Antarabangsa Spesies Liar Flora dan Fauna yang Terancam (CITES) sejak 2004 akibat pembalakan tanpa kawalan bagi memenuhi permintaan tinggi pasaran gaharu (Liu et al. 2013; Wang et al. 2018).

Aroma gaharu yang unik adalah disebabkan kandungan metabolit sekunder yang dihasilkannya seperti seskuiterpena dan terpena yang lain. Seskuiterpena merupakan sebatian kimia utama yang terdapat dalam gaharu dan juga memiliki sifat antibakteria yang membolehkan *A. malaccensis* mengelakkan penyebaran jangkitan mikrob (Nurlaila et al. 2014; Siti Nazirah et al. 2017; Zhang et al. 2014). *A. malaccensis* juga kaya dengan alkaloid, saponin, flavanoid dan tannin yang merupakan metabolit yang turut menyumbang kepada sifat antibakteria spesies ini (Begum 2016; Hendra et al. 2016; Khalil et al. 2013).

Banyak tumbuhan perubatan yang mempunyai aktiviti biologi yang telah digunakan sebagai rawatan infeksi bakteria (Jihadi et al. 2020). Ini termasuklah hidrosol gaharu iaitu air hasil penyulingan gaharu yang dipercayai mempunyai khasiat perubatan untuk merawat pelbagai penyakit (Mohamad Kahar et al. 2021). Kajian lepas telah menunjukkan bahawa daun *A. malaccensis* mempunyai aktiviti antibakteria yang boleh digunakan sebagai rawatan bagi menangani bakteria Gram-negatif rintang seperti *E. coli*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii* dan *Klebsiella pneumoniae* (Hendra et al. 2016; Jihadi et al. 2020). Daun *A. malaccensis* didapati mempunyai metabolit sekunder yang menyumbang kepada aktiviti antibakteria terhadap bakteria Gram-negatif (Hendra et al. 2016; Jihadi et al. 2020). Namun begitu masih tiada lagi kajian terhadap aktiviti antibakteria ekstrak gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi bagi mengesahkan dakwaan mengenai keberkesanan penggunaan gaharu dalam merawat penyakit akibat jangkitan bakteria. Justeru, kajian ini dijalankan bagi menentukan aktiviti antibakteria ekstrak gaharu *A. malaccensis* yang terbentuk secara semula jadi terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Serbuk batang *Aquilaria malaccensis*

Batang daripada pokok *A. malaccensis* yang mengandungi gaharu terbentuk secara aruhan semula jadi diperolehi dari Syarikat Wafiqah Plantation & Service, Hulu Langat, Selangor (3° 7' 0" Utara, 101° 51' 0" Timur). Bahagian kayu pokok *A. malaccensis* yang berwarna kuning keputihan dan coklat diasingkan daripada kayu pokok menggunakan pahat, penukul dan pisau kecil. Seterusnya, sampel kayu *A. malaccensis* dipotong kepada kepingan kecil dan dihantar untuk pengeringan sejuk beku bagi mengurangkan kehilangan metabolit semasa pengekstrakan. Selepas dikeringkan, kepingan kecil tersebut dikisar menjadi serbuk bersaiz 0.5 mm menggunakan mesin pengisar (Fritsch Pulverisette 19, FST UKM).

2.2 Mikroorganisma *E. coli* dan *S. aureus*

Bakteria Gram-negatif dan Gram-positif iaitu masing-masing *E. coli* dan *S. aureus* diperoleh dari Universiti Kebangsaan Malaysia Culture Collection Center (UKMCC). Koloni bakteria diinokulasi ke dalam 10 mL media kaldu Mueller-Hinton dan dieram selama 16 hingga 18 jam pada suhu 37°C. Kultur bakteria semalaman dicairkan menggunakan media kaldu Mueller-Hinton untuk memperoleh inokulum 10^4 CFU/mL dengan merujuk kepada piawaian kekeruhan McFarland (Jihadi et al. 2020).

2.3 Penyediaan Ekstrak Gaharu

Pengekstrakan sampel gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi dilakukan berpandukan kaedah Gao et al. (2014) dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 10 g serbuk gaharu *A. malaccensis* dicampurkan dengan 200 mL pelarut etanol, heksana, kloroform atau etil asetat pada nisbah pepejal kepada cecair 1:20 dalam kelalang dasar bulat 2 L. Kemudian, campuran pelarut dan serbuk gaharu direndam dalam gelap selama 24 jam pada suhu bilik. Ekstrak dikeringkan menggunakan penyejat vakum berputar pada suhu 50°C sehingga pekat. Ekstrak yang dikeringkan tersebut dipindahkan ke dalam tiub 1.5 mL dan dikeringkan sehingga menjadi serbuk menggunakan alat penyejat vakum pada suhu 50°C. Hasil pengekstrakan disimpan pada -80°C.

2.4 Kaedah Penyebaran Cakera

Aktiviti antibakteria bagi ekstrak gaharu *A. malaccensis* terhadap *E. coli* dan *S. aureus* telah dikaji menggunakan kaedah penyebaran cakera menurut Jawatankuasa Eropah mengenai Uji Kerentanan Antimikrob (EUCAST) serta merujuk kepada kaedah Jihadi et al. (2020) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 100 µL kultur bakteria 10^4 CFU/mL disebar ke atas piring agar Mueller-Hinton. Cakera kertas steril yang berdiameter 6 mm (Whatman No.1, 102 Qualitative Middle Rate) diletakkan di atas piring agar kosong. Ekstrak gaharu (5 µL) pada kepekatan yang berbeza iaitu 1 mg/mL dan 2 mg/mL diresapi cakera kertas steril lalu dibiarkan kering. Tetrasiklin (1 mg/mL dan 2 mg/mL) dan metanol 100% (Chemiz, Malaysia) masing-masing digunakan sebagai kawalan positif dan negatif menggunakan kaedah penyebaran cakera. Piring disediakan sebanyak tiga replikat dan dieram pada suhu 37°C selama 16 hingga 18 jam.

2.5 Penentuan Diameter Zon Perencatan

Selepas dieram, zon perencatan jelas terbentuk di sekitar cakera menunjukkan hadirnya aktiviti antibakteria. Aktiviti antibakteria ekstrak *A. malaccensis* dinilai dengan mengukur diameter zon perencatan dalam unit mm menggunakan pembaris dan direkodkan. Ujian diulang sebanyak tiga kali bagi kepastian (Matuschek et al. 2014).

2.6 Pengukuran Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)

Nilai MIC ekstrak kasar *A. malaccensis* terhadap *E. coli* dan *S. aureus* ditentukan menggunakan kaedah mikrodilusi kaldu (Wiegand et al. 2008). Sebanyak 100 µL ekstrak gaharu *A. malaccensis* pada kepekatan 2 mg/mL dimasukkan ke dalam plat mikro 96-telaga dan pencairan bersiri dua kali ganda telah dilakukan. Hasil pencairan bersiri ini telah memberikan kepekatan ekstrak gaharu *A. malaccensis* antara 0.004 mg/mL hingga 2.000 mg/mL. Sebanyak 50 µL inokulum bakteria 10^4 CFU/mL kemudian ditambahkan ke dalam setiap telaga. Kaldu tanpa antibiotik dan bakteria bertindak sebagai kawalan pertumbuhan. Plat dieram pada suhu 37 °C selama 16 hingga 18 jam. Berdasarkan bacaan spektrofotometer pada jarak gelombang 600 nm (OD_{600}), peratus perencatan dikira bagi setiap kepekatan menggunakan persamaan:

$$[1 - (OD_{600} \text{ sampel} - OD_{600} \text{ kawalan positif}) / (OD_{600} \text{ kawalan negatif} - OD_{600} \text{ kawalan positif})] \times 100$$

Nilai kepekatan perencatan minimum separuh maksimum (MIC_{50}) ditentukan berdasarkan persamaan garis regresi plot graf kepekatan ekstrak melawan peratus perencatan. Nilai MIC adalah kepekatan yang rendah daripada nilai MIC_{50} (Balouiri et al. 2016; Jihadi et al. 2020).

2.7 Pengukuran Kepekatan Bakterisidal Minimum (MBC)

Nilai MBC ekstrak gaharu *A. malaccensis* terhadap *E. coli* dan *S. aureus* ditentukan melalui subkultur 100 μ L bakteria dari setiap telaga dari ujian MIC ke atas piring agar Mueller-Hinton (Balouiri et al. 2016). Piring dieram pada suhu 37 °C selama 16 hingga 18 jam. Nilai MBC diambil pada kepekatan ekstrak terendah yang tidak menghasilkan pertumbuhan koloni bakteria tunggal atau subkultur pada piring agar (Jihadi et al. 2020).

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Pengekstrakan Gaharu *A. malaccensis*

Ekstrak gaharu *A. malaccensis* yang mengandungi resin gaharu aruhan semula jadi berjaya diperoleh menerusi kaedah pengekstrakan menggunakan pelarut (Gao et al. 2014) dengan menggunakan empat pelarut berbeza iaitu etanol, kloroform, heksana dan etil asetat. Pengekstrakan menggunakan etanol menunjukkan peratusan kembalian yang paling tinggi iaitu sebanyak 2.07% diikuti oleh kloroform, etil asetat dan akhir sekali heksana iaitu sebanyak 0.16% (Jadual 1).

Jadual 1. Hasil pengekstrakan gaharu *A. malaccensis* menggunakan pelarut berbeza.

Pelarut	Berat (mg)	Peratus Kembalian (%)
Etanol	207	2.07
Heksana	16	0.16
Kloroform	188	1.88
Etil asetat	84	0.84

Dalam kajian lepas yang menggunakan daun *A. malaccensis*, ekstrak etanol yang diperoleh menggunakan kaedah pengekstrakan Soxhlet memberikan hasil pengekstrakan yang tinggi iaitu sebanyak 17.84% selanjutnya menyumbang kepada kepekatan ekstrak yang tinggi (Jihadi et al. 2020). Pengekstrakan Soxhlet ialah teknik makmal yang digunakan untuk mengekstrak sebatian daripada bahan pepejal melibatkan pembasuhan sampel secara berterusan menggunakan pelarut melalui kitaran pendidihan dan pemeluwapan, membolehkan pengekstrakan yang cekap bagi sebatian yang dikehendaki (Redfern et al. 2014). Dalam kajian lain, ekstrak metanol daun *A. malaccensis* (9.2%) memberikan peratus kembalian yang tertinggi diikuti oleh kloroform (3.4%) dan seterusnya air (1.9%) (Hendra et al. 2016) manakala dalam kajian yang dilakukan oleh Halim et al. (2022) pula, ekstrak etanol (10.7%) memiliki peratus kembalian yang tertinggi diikuti dengan etil asetat (8.07%) dan n-heksana (5.23%).

3.2 Aktiviti Antibakteria Ekstrak Gaharu *A. malaccensis*

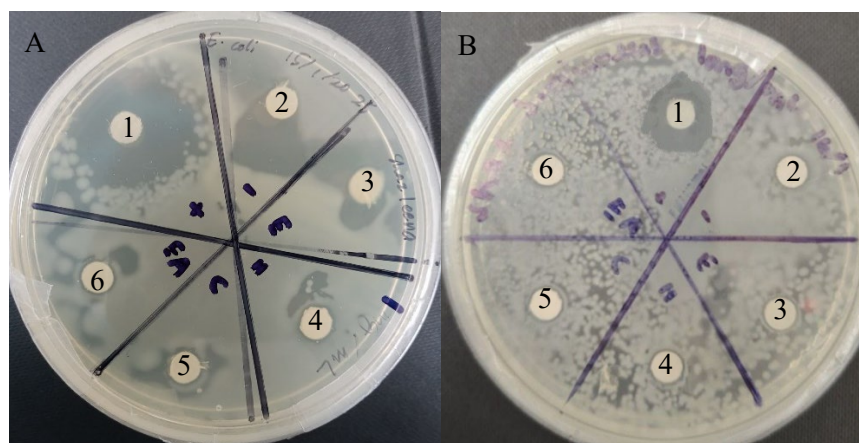
3.2.1 Penentuan Diameter Zon Perencatan

Hasil ujian kaedah penyebaran cakera bagi ekstrak gaharu *A. malaccensis* terhadap *E. coli* dan *S. aureus* adalah seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1 bagi kepekatan ekstrak 1 mg/mL dan dalam Rajah 2 bagi kepekatan ekstrak 2 mg/mL. Ujian ini menunjukkan bahawa ekstrak gaharu *A. malaccensis* mampu merencat pertumbuhan kedua-dua bakteria *E. coli* dan *S. aureus* (Jadual 2). Antibiotik tetrasiklin yang bertindak sebagai kawalan positif menunjukkan zon perencatan yang jelas dan paling tinggi terhadap kedua-dua bakteria Gram-negatif dan Gram-positif yang diuji (Jadual 2) bagi tiga ulangan ujian ($N = 3 \pm SD$). Sebaliknya, metanol yang bertindak sebagai kawalan negatif juga menunjukkan zon perencatan yang minimum terhadap kedua-dua jenis bakteria Gram-negatif dan Gram-positif yang dinilai dalam kajian ini. Ekstrak etanol pada kedua-dua kepekatan telah menunjukkan zon perencatan yang tertinggi terhadap *E. coli* dan *S. aureus* diikuti dengan ekstrak kloroform, ekstrak heksana dan akhirnya dengan ekstrak etil asetat. Walau bagaimanapun, diameter zon perencatan yang terbentuk adalah tidak berbeza secara signifikan berbanding kawalan negatif.

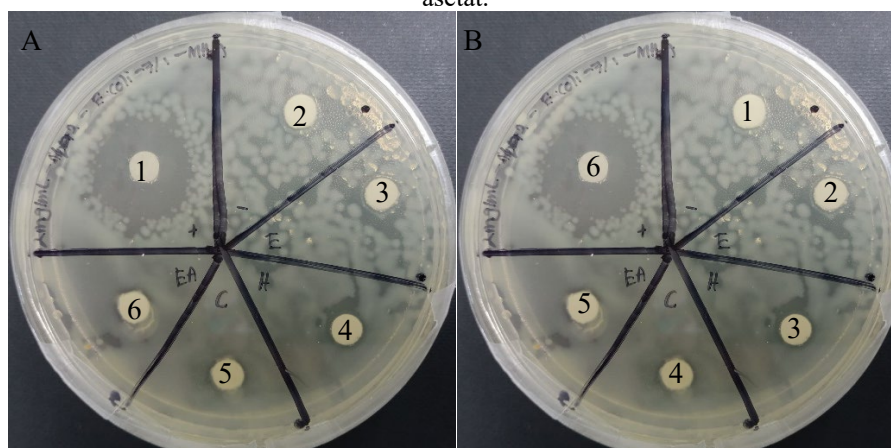
Oleh kerana ketiadaan kajian aktiviti antibakteria bagi ekstrak gaharu *A. malaccensis*, perbandingan hanya boleh dibuat dengan kajian aktiviti antibakteria bagi ekstrak etanol daun *A. malaccensis* pada kepekatan 100 mg/mL dan 200 mg/mL yang telah menunjukkan hasil zon

perencatan yang ketara masing-masing 9.0 mm dan 14.0 mm terhadap bakteria Gram-negatif *Acinetobacter baumannii* (Jihadi et al. 2020). Namun begitu, zon perencatan terhadap *E. coli* adalah masing-masing sepanjang 3 mm dan 3.3 mm bagi ekstrak etanol masing-masing pada kepekatan 100 mg/mL dan 200 mg/mL (Jihadi et al. 2020). Selain itu, ekstrak kloroform (150 mg/mL) telah dilaporkan menghasilkan zon perencatan masing-masing berdiameter 7.42 mm dan 7.75 mm terhadap *S. aureus* dan *E. coli* (Hendra et al. 2016). Manakala ekstrak kloroform daun *A. malaccensis* pada kepekatan 50 mg/mL telah turut menunjukkan aktiviti antibakteria yang baik terhadap *E. coli* dengan diameter zon perencatan sepanjang 17 mm (Begum 2016).

Pelbagai kajian telah menunjukkan bahawa jenis pelarut yang digunakan untuk pengekstrakan tumbuhan memberi kesan yang signifikan kepada amaun dan keberkesanan ekstrak yang diperolehi (Koffi et al. 2010; Hendra et al. 2016). Dalam kajian ini, pelarut yang digunakan memiliki tingkat kepolaran yang berbeza iaitu etanol sebagai pelarut polar, heksana dan kloroform sebagai pelarut bukan polar serta etil asetat yang merupakan pelarut semi polar. Perbezaan pelarut dalam pengekstrakan mempengaruhi jumlah kandungan komponen bioaktif dalam ekstrak yang disebabkan oleh perbezaan kepolaran pelarut (Santoso et al. 2022). Pelarut polar seperti etanol berkeupayaan mengekstrak metabolit sekunder seperti quersetin dan kaempferol yang merupakan sebatian flavonoid, tannin, katekin dan lupeol iaitu sejenis triterpenoid daripada daun *A. malaccensis* yang berkemungkinan besar menyumbang kepada aktiviti antibakteria (Batubara et al. 2021; Eissa et al. 2020). Pemprofilan metabolit bagi gaharu yang dilakukan menggunakan hidrodistilasi menunjukkan kehadiran seskuiterpena, monoterpena, diterpena, triterpena, aldehid, poliketida, fenol, ester, terbitan asid lemak, alkaloid, hidrokarbon dan kromon (Abdul Kadir et al. 2020).



Rajah 1. Hasil ujian kaedah penyebaran cakera bagi ekstrak batang *A. malaccensis* aruhan semula jadi (1 mg/mL) terhadap (A) *E. coli* dan (B) *S. aureus*. 1, tetrasiklin sebagai kawalan positif (1 mg/mL); 2, metanol sebagai kawalan negatif; 3, ekstrak etanol; 4, ekstrak heksana; 5, ekstrak kloroform; 6, ekstrak etil asetat.



Rajah 2. Hasil ujian kaedah penyebaran cakera bagi ekstrak batang *A. malaccensis* aruhan semula jadi (2 mg/mL) terhadap (A) *E. coli* dan (B) *S. aureus*. 1, tetrasiklin sebagai kawalan positif (2 mg/mL); 2, metanol sebagai kawalan negatif; 3, ekstrak etanol; 4, ekstrak heksana; 5, ekstrak kloroform; 6, ekstrak etil asetat.

Jadual 2. Diameter zon perencatan bagi ekstrak gaharu *A. malaccensis* pada kepekatan berbeza.

Ekstrak / Kawalan	Diameter Zon Perencatan (mm $\pm$ SD)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	1 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
Etanol	8.0 $\pm$ 1.0	8.3 $\pm$ 0.6	8.0 $\pm$ 2.0	8.0 $\pm$ 1.0
Heksana	7.7 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 1.5	6.7 $\pm$ 0.6
Kloroform	7.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 1.5	7.0 $\pm$ 1.0	7.7 $\pm$ 1.2
Etil Asetat	7.7 $\pm$ 1.2	7.7 $\pm$ 1.2	7.7 $\pm$ 1.5	7.7 $\pm$ 1.2
Tetrasiklin (+)	21.7 $\pm$ 1.5	23.3 $\pm$ 1.5	16.0 $\pm$ 2.0	17.7 $\pm$ 1.5
Metanol (-)	7.3 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.6

3.2.2 Pengukuran Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) dan Kepekatan Bakterisidal Minimum (MBC)

Nilai MIC₅₀ berdasarkan peratus perencatan dan kepekatan minimum bagi perencatan 50% pertumbuhan kedua-dua bakteria *E. coli* dan *S. aureus* telah ditentukan bagi semua ekstrak gaharu *A. malaccensis*. Jadual 3 menunjukkan nilai MIC₅₀ dan kepekatan minimum ekstrak yang mampu merencat pertumbuhan bakteria bagi semua jenis ekstrak gaharu *A. malaccensis*.

Jadual 3. Nilai MIC₅₀ dan kepekatan minimum ekstrak gaharu *A. malaccensis* yang merencat pertumbuhan bakteria *E. coli* dan *S. aureus*.

Ekstrak / Pelarut	Nilai MIC ₅₀ (mg/mL)		Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) (mg/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Etanol	1.27	0.92	1	0.5
Heksana	1.3	1.15	1	1
Kloroform	1.04	1.35	1	1
Etil Asetat	1.27	1.64	2	2

Nilai MIC merupakan petunjuk penting bagi tahap kerentanan atau kerintangan strain bakteria terhadap dadah yang dikaji (Phillips et al. 1998). Dalam kajian ini, nilai MIC bagi ekstrak etanol gaharu *A. malaccensis* adalah masing-masing 1 mg/mL dan 0.5 mg/mL terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Kajian lepas mengenai ekstrak etanol daun *A. malaccensis* menunjukkan nilai MIC adalah 32 μ g/mL terhadap *S. aureus* (Suhardiman & Tamrin 2020) dan 64 mg/mL terhadap *E. coli* (Jihadi et al. 2020). Oleh itu nilai MIC yang diperoleh bagi ekstrak etanol gaharu dalam kajian ini adalah lebih baik berbanding ekstrak etanol daun dalam kajian Jihadi et al. (2020).

Ujian pengukuran kepekatan bakterisidal minimum (MBC) dalam kajian ini pula menunjukkan pertumbuhan koloni bakteria pada piring agar bagi kedua-dua bakteria *E. coli* dan *S. aureus*. Hal ini membuktikan bahawa semua kepekatan ekstrak gaharu *A. malaccensis* tidak dapat membunuh bakteria yang diuji. Dalam kajian Jihadi et al. (2020) menggunakan ekstrak daun *A. malaccensis*, nilai MIC dan MBC yang sama diperoleh menunjukkan bahawa kepekatan ekstrak tersebut mampu menghalang pertumbuhan bakteria serta mencukupi bagi membunuh bakteria tersebut. Oleh itu, ekstrak daun *A. malaccensis* boleh dibangunkan sebagai agen bakterisidal. Namun begitu, dalam kajian ini nilai MBC tidak dapat ditentukan yang menunjukkan bahawa ekstrak gaharu *A. malaccensis* hanya mampu merencat pertumbuhan bakteria dan tidak mampu membunuh bakteria tersebut. Hal ini adalah kerana kepekatan ekstrak yang digunakan adalah rendah dan tidak mencukupi bagi membunuh bakteria. Hasil yang serupa didapati dalam kajian mengenai aktiviti antibakteria bagi *Canarium patentinervium* yang mendapati bahawa walaupun sesetengah ekstrak menunjukkan kesan perencatan terhadap pertumbuhan bakteria, kepekatan ekstrak yang digunakan tidak mencukupi untuk mencapai MBC bagi bakteria sasaran (Mogana et al. 2020).

4. Kesimpulan

Dalam kajian ini, ujian penyebaran cakera dan pengukuran kepekatan perencatan minimum (MIC) telah menunjukkan ekstrak gaharu *A. malaccensis* yang diekstrak menggunakan empat jenis pelarut mampu merencat pertumbuhan kedua-dua bakteria *E. coli* dan *S. aureus*. Namun begitu ujian pengukuran kepekatan bakterisidal minimum (MBC) menunjukkan bahawa kesemua ekstrak gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi yang diuji tidak mampu membunuh kedua-dua bakteria *E. coli* dan *S. aureus*. Secara keseluruhannya, hasil kajian ini menunjukkan bahawa ekstrak gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi daripada kaedah pengekstrakan menggunakan pelarut menunjukkan aktiviti antibakteria yang minimum bagi kedua-dua bakteria yang diuji.

Penghargaan

Kajian ini dijalankan di bawah geran penyelidikan Kementerian Pengajian Tinggi FRGS/1/2021/WAB04/UKM/02/2. Penghargaan ditujukan kepada staf Makmal Genomik INBIOSIS di atas segala sokongan yang diberikan sepanjang kajian ini dijalankan.

Rujukan

- Abdul Kadir, F. A., Azizan, K. A. and Othman, R. 2020. Datasets of essential oils from naturally formed and synthetically induced *Aquilaria malaccensis* agarwoods. *Data in Brief* 28:104987.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2):71–79.
- Batubara, R., Wirjosentono, B., Siregar, A. H., Harahap, U. and Tamrin 2021. Bioactive compounds of ethanol extract from agarwood leaves (*Aquilaria malaccensis*) and antimicrobial activity against bacteria and fungi growing on the skin. *Biodiversiti* 22(5):2884–2890.
- Begum, Y. 2016. Study on agarwood (*Aquilaria malaccensis*) to evaluate antibacterial and antioxidant activities of n-hexane, chloroform and ethyl acetate extracts. *PharmaTutor* 4(2):47–50.
- Eissa, M. A., Hashim, Y. Z. H.-Y., El-Kersh, D. M., Abd-Azziz, S. S. S., Salleh, H. M., Isa, M. L. M. and Abd Warif, N. M. 2020. Metabolite profiling of *Aquilaria malaccensis* leaf extract using liquid chromatography-Q-TOF-mass spectrometry and investigation of its potential antilipoxygenase activity in-vitro. *Processes* 8(2):202.
- Gao, X., Xie, M., Liu, S., Guo, X., Chen, X., Zhong, Z., Wang, L. & Zhang, W. 2014. Chromatographic fingerprint analysis of metabolites in natural and artificial agarwood using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric methods. *Journal of Chromatography B* 967:264–273.
- Halim, A.P., Wijayanti, N., Hidayati, L. & Nuringtyas, T.R. 2022. Antioxidant activity evaluation of agarwood *Aquilaria malaccensis* Lamk. leaves extract using DPPH, FRAP and ABTS assays. *Advances in Biological Science Research* 22:18–25.
- Hendra, H., Moeljopawiro, S. & Nuringtyas, T.R. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) leaves. *Advanced of Science and Technology for Society, AIP Conference Proceedings* 1755:140004-1–140004-9.
- Jabatan Perhutanan Semenanjung Malaysia. 2015. *Manual pengecaman spesies Aquilaria di Semenanjung Malaysia*. Malaysia: Alamedia Sdn. Bhd.
- Jihadi, N. I. M., Hashim, Y. Z. H. Y., Rahim, N. A., Kamal, K. M., Noor, N. M., Sani, M. S. A. and Maifiah, M. H. M. 2020. Antibacterial activity of ethanolic leaf extract of *Aquilaria malaccensis* against multidrug-resistant gram-negative pathogen. *Food Research* 4(6):1962–1968.
- Khalil, A. S., Rahim, A. A., Taha, K. K. and Abdallah, K. B. 2013. Characterization of methanolic extracts of agarwood leaves. *Journal of Applied and Industrial Sciences* 1(3):78–88.
- Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y. and Soro, S. 2010. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty-three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences* 5(3):550–558.
- Matuschek, E., Brown, D. F. J. and Kahlmeter, G. 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20(4):255–266.
- Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R. and Wiart, C. 2020. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 20:55.
- Mohamad Kahar, E. E., Talip, B. A., Mohd Fauzi, N. A., Kamarulzaman, S. N., Zakaria, F., Muhammad, N., Rajat Mamat, T. N. A. and Basri, H. 2021. Properties and potential of agarwood hydrosol as a drink: A review. *Food Research* 5(3):29–35.

- Phillips, I., Acar, J., Bergan, T., Degener, J., Baquero, F., Forsgren, A., Schito, G-C. & Wiedemann, B. 1998. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Terminology, Clinical Microbiology and Infection* 4(5): 291–296.
- Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D. and Verran, J. 2014. Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties. *Journal of Microbiology & Biology Education* 15(1):45–46.
- Santoso, B., Anggraini, N., Yuliati, K. and Pangawikan, A. D. 2022. Phenol compound content and antibacterial activity of gaharu leaf extract products (*Aquilaria malaccensis*). *Bioscience Journal* 38: e38009.
- Siti Nazirah, I., Maulidiani, M., Muhammad Tayyab, A., Faridah, A., Intan Safinar, I., Alfi Khatib, Nor Azah, M. A. and Khozirah, S. 2017. Discriminative analysis of different grades of gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) via ¹H-NMR-Based metabolomics using PLS-DA and random forests classification models. *Molecules* 22(10):1612.
- Suhardiman A. and Tamrin A. R. R. 2020. Antibacterial activity of extract and fraction of agarwood leaves (*Aquilaria malaccensis* Lam) against *Staphylococcus aureus* and bioautography test. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences* 9(5):983–988.
- Wang, S., Yu, Z., Wang, C., Wu, C., Guo, P. and Wei, J. 2018. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and aquilaria plants. *Molecules* 23(2):342.
- Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3(2):163–75.
- Zhang, Z., Wei, J., Han, X., Liang, L., Yang, Y., Meng, H., Xu, Y. and Gao, Z. 2014. The sesquiterpene biosynthesis and vessel-occlusion formation in stems of *Aquilaria sinensis* (lour.) gilg trees induced by wounding treatments without variation of microbial communities. *International Journal of Molecular Sciences* 15(12):23589–23603.

Pemencilan dan Pencirian Rizobakteria Penggalak Pertumbuhan Tumbuhan (PGPR) daripada Rizosfera Pokok Bunga di Malaysia

Nur Hanis Solehah Norizam¹, Mona Fatin Syazwanee Mohamed Ghazali² & Abdul Munir Abdul Murad^{1,*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Pusat PERMATA@Pintar Negara, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: munir@ukm.edu.my

Abstrak: Tanaman landskap ialah tumbuhan yang digunakan untuk mencantik dan meningkatkan nilai sesuatu kawasan seperti di taman-taman serta tepian jalan. Namun, kos baja kimia dalam pengurusan tanaman landskap semakin meningkat serta penggunaan berlebihan boleh mengakibatkan pencemaran alam sekitar. Selain itu, tumbuhan landskap sering menghadapi pelbagai tekanan abiotik. Untuk meneroka alternatif baja mampan, kajian ini tertumpu pada pemencilan dan pencirian rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR) daripada rizosfera pelbagai pokok bunga. Pemencilan dilakukan daripada rizosfera beberapa pokok bunga yang berbeza di tepi jalan serta taman-taman. Sifat-sifat PGPR yang disaring termasuklah pengikatan nitrogen, pemecahan 1-aminosiklopropan-1-asid karboksilat (ACC), pelarutan fosfat dan penghasilan asid indol-3-asetik (IAA). Identiti bagi pencilan yang terpilih ditentukan melalui penjujukan gen 16S rRNA. Nyatakan hasil daripada awal pemencilan, berapa pencilan positif bagi saringan sifat PGPR. Pencilan daripada rizosfera pokok bunga Pinwheelflower telah dikenal pasti sebagai *Burkholderia* sp. UKM PIN4, manakala pencilan daripada rizosfera pokok Heliconia ialah *Enterobacter* sp. UKM HEL5. Pencilan daripada rizosfera pokok Spider Lily pula ialah *Enterobacter* sp. UKM SPI4 dan pencilan daripada rizosfera pokok Peacock dikenal pasti sebagai *Bacillus* sp. UKM PEA1. Pencilan daripada rizosfera pokok Petunia dikenal pasti sebagai *Enterobacter* sp. UKM PET3. Pencilan-pencilan ini mempamerkan keseluruhan sifat-sifat PGPR yang disaring, menjadikannya calon yang berpotensi dalam menyokong pertumbuhan tumbuhan berbunga secara mampan yang wujud secara semula jadi.

Keywords: PGPR; tanaman berbunga; baja bio; rizobakteria; pertanian lestari

Abstract: Landscape plants are ornamental species used to enhance the beauty and value of areas such as parks and roadside spaces. However, the rising cost of chemical fertilizers in landscape plant management, along with their excessive use, contributes to environmental pollution. Additionally, landscape plants are frequently exposed to various abiotic stresses. To explore sustainable alternatives to chemical fertilizers, this study focused on the isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of various flowering plants. Since different plant species attract different types of rhizobacteria, isolations were carried out from the rhizosphere of several flowering species found along roadsides and in parks. The PGPR traits screened included nitrogen fixation, degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), phosphate solubilization, and production of indole-3-acetic acid (IAA). The identities of selected isolates were determined through 16S rRNA gene sequencing. The isolate from the rhizosphere of the Pinwheel flower was identified as *Burkholderia* sp. UKM PIN4, while the isolate from *Heliconia* was identified as *Enterobacter* sp. UKM HEL5. The isolate from the rhizosphere of Spider Lily was identified as *Enterobacter* sp. UKM SPI4, and the isolate from the Peacock flower rhizosphere was identified as *Bacillus* sp. UKM PEA1. An additional isolate from the rhizosphere of *Petunia* was identified as *Enterobacter* sp. UKM PET3. These isolates exhibited all the screened PGPR traits, making them promising candidates to support the sustainable growth of naturally occurring flowering landscape plants.

Kata kunci: PGPR; flowering plant; biofertilizer; rhizobacteria; sustainable agriculture

1. Pengenalan

Tanaman landskap ialah tumbuhan yang digunakan untuk mencantikkan, memperindah dan meningkatkan nilai estetika sesuatu kawasan melalui perancangan dan susun atur landskap yang teratur. Ia sering ditanam di taman-taman awam, kawasan perumahan, institusi, serta di sepanjang tepian jalan untuk mewujudkan persekitaran yang nyaman dan menarik. Dalam pengurusan tanaman landskap, penyediaan nutrien yang mencukupi merupakan aspek penting bagi memastikan pertumbuhan tumbuhan yang sihat dan berdaya tahan. Baja berperanan sebagai sumber utama nutrien dan boleh dikategorikan secara meluas kepada beberapa jenis berdasarkan komposisi, sumber dan cara penggunaannya.

Baja kimia masih menjadi pilihan utama dalam pengurusan tanaman landskap di Malaysia kerana ia mudah digunakan serta menunjukkan kesan yang pantas. Namun demikian, penggunaannya secara berlebihan bukan sahaja menyebabkan pencemaran tanah dan air, malah memberi kesan negatif terhadap keseimbangan ekosistem setempat. Kos penghasilan dan pembelian baja kimia juga semakin meningkat dari tahun ke tahun, sekali gus membebankan pihak berkuasa tempatan dan pengurus landskap (International Fertilizer Association 2024).

Kesan negatif akibat penggunaan baja kimia termasuklah pengumpulan nitrat dan kehilangan fosfat yang larut ke dalam tanah atau dibawa oleh air hujan (*runoff*), yang akhirnya meningkatkan kepekatan nitrogen dan fosfat dalam sistem perairan. Fenomena ini mendorong kepada pertumbuhan alga secara berlebihan (*algal bloom*) yang menjejaskan kualiti air serta menurunkan paras oksigen dalam sungai (Fazelian et al. 2022). Keadaan ini boleh mengakibatkan kematian hidupan akuatik dan membawa kepada eutrofikasi, seterusnya meningkatkan risiko banjir apabila berlaku hujan lebat (Akinawo 2023).

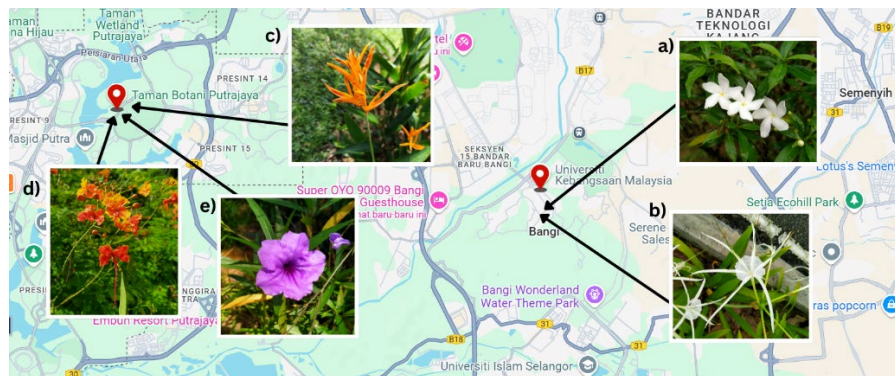
Dalam masa yang sama, tumbuhan landskap terutamanya yang tumbuh di tepi jalan turut terdedah kepada pelbagai tekanan abiotik. Antara tekanan tersebut termasuklah pencemaran udara, suhu tinggi, kekeringan, pemadatan tanah, pengekalan air yang rendah, kerosakan mekanikal serta kekurangan nutrien (Khan et al. 2006; Praeg et al. 2019). Oleh itu, pendekatan pengurusan yang lebih lestari dan mesra alam amat diperlukan bagi memastikan tanaman landskap terus berkembang dalam keadaan yang sihat dan mampan.

Salah satu strategi yang semakin mendapat perhatian ialah penggunaan rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR) sebagai alternatif kepada baja kimia. PGPR ialah mikrob bermanfaat yang hidup di zon akar (rizosfera), mampu mengkolonisasi akar tumbuhan dan memberi kesan positif terhadap pertumbuhan tumbuhan melalui pelbagai mekanisme, sama ada secara langsung atau tidak langsung (Munees et al. 2014). Sehubungan itu, kajian ini dijalankan untuk memencil dan mencirikan PGPR daripada rizosfera pelbagai spesies tumbuhan berbunga. Selain itu, identiti pencilan terpilih turut ditentukan melalui penjujukan gen 16S rRNA bagi memastikan ketepatan taksonomi.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Sumber bakteria

Rizobakteria dipencilkan daripada tanah berdekatan akar pokok bunga dari lima kawasan penanaman pokok bunga yang berbeza iaitu; pokok bunga Pinwheelflower (*Tabernaemontana divaricata*) di seberang jalan Kolej Ungku Omar, UKM, Bangi (2.9225° N, 101.7740° E), pokok bunga Spider lily (*Hymenocallis littoralis*) di seberang jalan Tadika Tunas Permata UKM, Bangi (2.9296° N, 101.7810° E), pokok bunga Heliconia (*Heliconia* sp.), Peacock (*Caesalpinia pulcherrima*) dan Petunia (*Ruellia simplex*) di kawasan Taman Botani, Putrajaya (2°56'51.0"N, 101°41'47.3"E) (Rajah 1). Bakteria *E. coli* strain DH5 α digunakan sebagai bakteria kawalan negatif, manakala bakteria *Bacillus altitudinis* strain UKM RB11 (Rafedzi et al. 2024) digunakan sebagai bakteria kawalan positif. Kawalan ini diperoleh daripada Koleksi Kultur Bakteria, Makmal Mikologi Molekul, UKM.



Rajah 1. Peta lokasi pemencilan bakteria di Kolej Ungku Omar UKM, Tunas Permata UKM, Bangi dan Taman Botani, Putrajaya. Senarai pokok bunga adalah seperti berikut, a) Pinwheelflower, b) Spider Lily, c) Heliconia, d) Peacock, e) Petunia.

2.2 Pemencilan rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR)

2.2.1 Pemencilan bakteria pengikat nitrogen

Untuk memencilkan rizobakteria pengikat nitrogen daripada rizosfera pokok bunga, 1 g tanah ditimbang dan dimasukkan ke dalam 10 mL air suling yang steril. Pencairan bersiri bagi setiap sampel dilakukan sehingga 10^{-2} dan alikuat sebanyak 100 μL daripada setiap pencairan (10^{-0} , 10^{-1} , 10^{-2}) digunakan secara terus dalam penyaringan sifat-sifat PGPR iaitu disebarkan di atas piring agar Burks (Burk 1930) dengan dua replikasi bagi setiap sampel. Koloni-koloni tunggal dipilih selepas piring dieram selama 72 jam pada suhu 28°C . Koloni-koloni yang berjaya hidup ini menjalani pensubkulturasi sebanyak tiga kali untuk mendapatkan kultur tulen dan mengesahkan keupayaan mengikat nitrogen yang sebenar.

2.3 Pencirian sifat-sifat rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR)

Kesemua pencilan yang berupaya mengikat nitrogen disaring untuk sifat-sifat PGPR yang lain seperti kebolehan untuk menghasilkan 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminase, melarutkan fosfat serta menghasilkan fitohormon asid indol asetik (IAA).

2.3.1 Saringan keupayaan penghasilan 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminase

Saringan ini dilakukan melalui dua kaedah iaitu secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, pencilan terpilih dicoretkan di atas agar garam Dworkin Foster (DF) yang mengandungi 3.0 mM substrat ACC dan dieram selama 72 jam pada suhu 28°C . Pencilan yang berjaya hidup diteruskan dalam saringan secara kuantitatif iaitu mengukur penghasilan α -ketobutirat. Pencilan yang terpilih dieram di dalam 5 mL kaldu Triptin Soya (TSB) pada suhu 28°C hingga mencapai fasa pegun (OD_{600}) sebelum dipindahkan ke dalam larutan DF untuk memaksimumkan aktiviti metabolik pencilan tersebut (Madigan et al. 2017). Sel-sel dicuci menggunakan Tris-HCL (pH 7.5) dan dikumpul melalui pengemparan 10 000 rpm selama 5 minit. Pelet kemudian diampai dengan 2 mL larutan garam Dworkin Foster (DF) yang mengandungi 3.0 mM substrat ACC dan dieram selama 72 jam pada suhu 28°C dengan goncangan 120 rpm.

Sel-sel daripada larutan DF dikumpul dengan emparan 3000 rpm selama 5 minit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dua kali dengan Tris-HCL (pH 7.5) dan sel diampai dengan 200 μL Tris-HCL (pH 8.5). Toluena 5% (v/v) ditambahkan untuk melabihkan sel dan divorteks pada kelajuan tinggi selama 30 s. Sebanyak 50 μL ampai sel ditambah dengan 20 μL 0.3 M ACC dan campuran tersebut dieram di dalam tiub selama 30 minit pada suhu 28°C . Sebanyak 500 μL HCL 0.56 N ditambah pada setiap campuran dan divorteks. Debris sel dikeluarkan dengan emparan pada 12 000 rpm selama 5 minit. Sebanyak 500 μL supernatan dipindahkan ke tabung uji kaca baharu dan 400 μL HCL 0.56 N beserta 150 μL larutan DNPH (0.1 g 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam 100 mL HCL 2 N) dicampurkan ke dalam tabung uji dan dieramkan selama 30 minit pada suhu 28°C . Sebanyak 1.0 mL NaOH 2 N dicampurkan ke dalam tabung uji dan bacaan serapan diukur pada 540 nm.

2.3.2 Saringan keupayaan melarutkan fosfat

Saringan ini dilakukan melalui dua kaedah iaitu secara kualitatif dan kuantitatif. Bagi kaedah kualitatif, pertumbuhan dilakukan di atas agar Pikovskaya yang mengandungi trikalsium fosfat tidak larut $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Kertas resapan cakera yang steril diletakkan di atas agar dan sebanyak 5 μL pencairan rizobakteria diletakkan di tengah-tengah kertas resapan cakera. Agar seterusnya dieram selama seminggu pada suhu 28°C. Sebarang pembentukan zon halo diperhatikan dan diameter koloni serta diameter zon halo diukur untuk pengiraan indeks pelarutan fosfat (*Phosphate Solubilization Index*) (Nautiyal 1999).

Manakala kaedah kuantitatif diuji dengan pertumbuhan di dalam larutan Pikovskaya. Pencilan yang terpilih diinokulasikan ke dalam larutan dan dieram selama seminggu dengan goncangan 150 rpm pada suhu 28°C. Larutan diempar pada kelajuan 10 000 rpm selama 5 minit dan supernatan dituras menggunakan kertas turas bersaiz 0.45 μm . Sebanyak 1 mL larutan yang terkumpul di dalam tiub ditambah dengan 160 μL reagen biru molibdenum selama 10-15 minit dan larutan blank adalah 1 mL larutan Pikovskaya tanpa emparan. Bacaan serapan diukur pada 880 nm dan kepekatan fosforus ditentukan melalui lengkung kepekatan fosforus.

2.3.3 Saringan keupayaan menghasilkan asid indol asetik (IAA)

Pencilan yang terpilih diinokulasikan dalam larutan LB yang mengandungi L-triptofan 1% (i/i) dan dieram selama 48 jam pada suhu 28°C. Selepas pengeraman, larutan diempar pada kelajuan 10 000 rpm selama 5 minit dan 1 mL supernatan yang terhasil dicampurkan dengan 1 mL reagen Salkowski. Campuran dieram selama 30 minit di dalam gelap pada suhu bilik (Gordon et al. 1951). Bacaan serapan diukur pada 530 nm dan kepekatan IAA yang terhasil ditentukan melalui lengkung piawai kepekatan IAA.

2.4 Pengenalpastian identiti PGPR berdasarkan jujukan gen 16S rRNA

2.4.1 Amplifikasi gen 16S rRNA melalui kaedah koloni-PCR

Gen DNA ribosom 16S (16S rDNA) bagi setiap pencilan terpilih diamplifikasi melalui kaedah koloni-PCR dengan langkah tambahan iaitu melisiskan sel. Sebelum PCR dilakukan, kultur tulen daripada koloni agar LB diambil dan dilarutkan ke dalam 200 μL penimbal AE (campuran asid asetik dan etilenadiamintetraasetik asid EDTA) untuk melindungi DNA dari degradasi oleh DNase. Larutan tersebut dikukus pada suhu 70°C selama 10-15 minit (Lutz et al. 2012). Pencetus ke hadapan yang digunakan adalah 27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') dan pencetus ke belakang adalah 1492r (5' GGTTACCTTGTACGACTT 3'). Produk PCR yang diperoleh seterusnya dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 1%.

2.4.2 Analisis Jujukan DNA

Produk PCR yang telah diamplifikasikan seterusnya dihantar ke 1st BASE untuk perkhidmatan penjujukan DNA. Data jujukan nukleotida yang mengekod subunit ribosom 16S digunakan untuk analisis *Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide)*, BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) di pangkalan data *National Center of Biotechnology Information*, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bagi mengenal pasti identiti spesies PGPR yang dipencilkan.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Pemencilan rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR)

Hasil daripada setiap pencairan digunakan secara terus dalam penyaringan sifat PGPR iaitu keupayaan untuk mengikat nitrogen daripada atmosfera. Langkah ini bertujuan untuk memastikan rizobakteria yang bakal disaring untuk sifat-sifat PGPR yang lain berupaya untuk mengikat nitrogen. Sebanyak 30 pencilan bakteria pengikat nitrogen telah berjaya dipencilkan daripada rizosfera lima jenis pokok bunga

di kawasan yang berbeza. Sebanyak tujuh koloni berjaya dipencilkan daripada rizosfera pokok Pinwheelflower, enam koloni daripada rizosfera pokok Spider lily, lima koloni daripada rizosfera pokok Heliconia, enam koloni daripada rizosfera pokok Peacock dan enam koloni daripada rizosfera pokok Petunia.

Pemencilan dari pelbagai rizosfera pokok bunga ini adalah untuk mendapatkan rizobakteria yang khusus terhadap tanaman itu sendiri supaya kesan rangsangan yang lebih baik dapat diberikan kepada pertumbuhan tumbuhan tersebut. PGPR yang ditemui di dalam rizosfera bagi setiap tumbuhan perumah adalah berbeza-beza dan spesifik interaksinya. Pengkhususan perumah dalam interaksi tersebut dipengaruhi oleh kedua-dua penyesuaian bakteria dan ciri unik tumbuhan perumah. Pengkhususan ini terhasil daripada pengawalan pelbagai gen yang berbeza bergantung kepada interaksi antara bakteria dan tumbuhan hos (Khan et al. 2022). Oleh itu, spesies PGPR yang sesuai dalam rizosfera spesies tumbuhan perlu dikenal pasti terlebih dahulu sebelum diaplikasikan kepada tumbuhan supaya kesan yang optimum dan efisien dapat dicapai (Lotfi et al. 2022).

3.2 Pencirian sifat-sifat rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR)

3.2.1 Keupayaan mengikat nitrogen

Pengikatan nitrogen bermaksud molekul gas nitrogen difiksasi kepada ammonia dengan bantuan enzim nitrogenase, dan kemudian diasimilasikan menjadi nitrogen organik. Mikroorganisma diazotropik ialah kumpulan organisma yang menukar nitrogen atmosfera (N_2) kepada nitrogen biotersedia iaitu ammonia (NH_3) untuk pengambilan dan kegunaan tumbuhan. Proses ini memerlukan tenaga yang tinggi iaitu sehingga 16 molekul ATP diperlukan daripada mikroorganisma. Mikroorganisma hidup-bebas (*free-living*) akan hidup pada kawasan rendah oksigen, mengawal respirasi mereka semasa pengikatan nitrogen, menghasilkan bakteriohemoglobin yang mengikat nitrogen, dan membentuk ruang khas heterosista yang terpisah daripada ruang penghasilan oksigen dalam sel mereka (Zhang et al. 2021).

Bagi memastikan setiap pencilan yang diperoleh memang berupaya untuk mengikat nitrogen, pensubkulturan di atas agar Burk diulang sebanyak tiga kali. Pencilan yang berjaya hidup pada agar Burks di akhir pensubkulturan menunjukkan keupayaan untuk mengikat nitrogen daripada atmosfera tanpa kehadiran sumber nitrogen di dalam medium atau menggunakan sumber nitrogen daripada sel yang telah mati. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahawa, kesemua rizosfera pokok bunga mempunyai bakteria pengikat nitrogen. Daripada 30 pencilan, hanya 20 pencilan sahaja yang mampu hidup selepas tiga kali pensubkulturan di atas agar Burks. Kesemua rizosfera pokok bunga mempunyai sekurang-kurangnya tiga pencilan yang berupaya mengikat nitrogen (Jadual 1). Pencilan yang berjaya hidup tersebut berupaya mengikat nitrogen di atmosfera secara hidup bebas tanpa kehadiran sumber nitrogen di dalam agar. Baki pencilan yang gagal tumbuh pada akhir pensubkulturan pula menunjukkan ketidakupayaan mengikat nitrogen di atmosfera dan hanya bergantung kepada sumber nitrogen daripada sel yang telah mati untuk pertumbuhan.

Jadual 1. Pencilan daripada rizosfera pokok bunga yang berjaya hidup pada akhir pensubkulturan di atas agar Burks.

Rizosfera pokok bunga	Nama pencilan	Rizosfera pokok bunga	Nama pencilan
Pinwheelflower	PIN1	Peacock	PEA1
	PIN2		PEA2
	PIN3		PEA3
	PIN4		PEA4
Heliconia	HEL1	Petunia	PEA5
	HEL2		PET1
	HEL5		PET3
Spider Lily	SPI1		PET4
	SPI2		PET6
	SPI3		
	SPI4		
Jumlah pencilan			20

3.2.2 Keupayaan menghasilkan 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminase

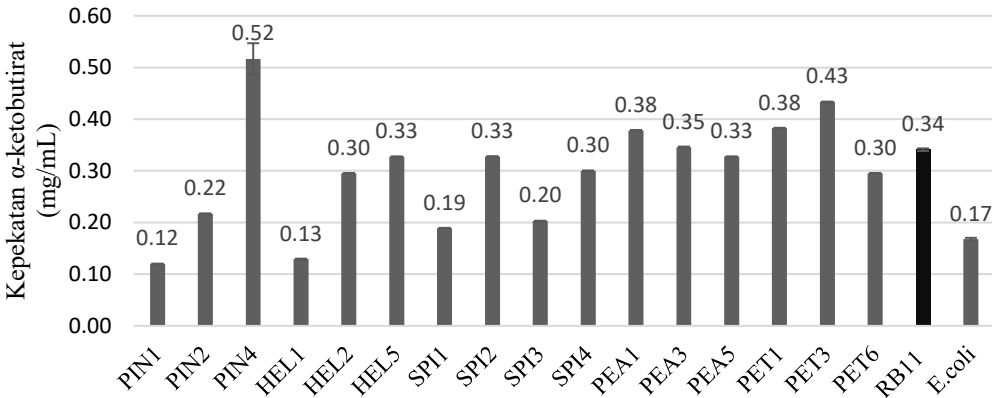
ACC merupakan prekursor dalam biosintesis hormon etilena di dalam tumbuhan. Tumbuhan menghasilkan jumlah etilena yang mencukupi dalam keadaan normal, tetapi pengeluarannya meningkat di bawah tekanan abiotik dan biotik. Bakteria yang mampu menghasilkan enzim 1-aminosiklopropan-1-asid karboksilat deaminase (ACC deaminase) dapat menghidrolisis ACC kepada ammonia dan α -ketobutirat, dengan itu menggalakkan pemanjangan akar dan pertumbuhan tumbuhan walaupun di bawah tekanan (Barnawal et al. 2017). Produk daripada hidrolisis ACC kemudian digunakan oleh bakteria sebagai sumber nitrogen dan karbon. Dengan mengurangkan paras etilena yang tinggi, bakteria ini meningkatkan daya tahan tanaman bunga dalam persekitaran yang mencabar.

Saringan awal terhadap penghasilan enzim ini dapat dikenal pasti melalui pertumbuhan di atas agar garam DF yang mengandungi 3.0 mM substrat ACC. Sebanyak 16 jumlah pencilan yang berjaya hidup daripada keseluruhan rizosfera pokok bunga dan kesemua rizosfera pokok bunga mempunyai sekurang-kurangnya tiga pencilan yang menunjukkan keupayaan menghasilkan ACC deaminase (Jadual 2).

Jadual 2. Pencilan bakteria daripada rizosfera pokok bunga yang berjaya hidup atas agar DF.

Rizosfera pokok bunga	Nama pencilan	Rizosfera pokok bunga	Nama pencilan
Pinwheelflower	PIN1	Spider Lily	SPI1
	PIN2		SPI2
	PIN4		SPI3
	HEL1		SPI4
Heliconia	HEL2	Petunia	PET1
	HEL5		PET3
	PEA1		PET6
Peacock	PEA3		
	PEA4		

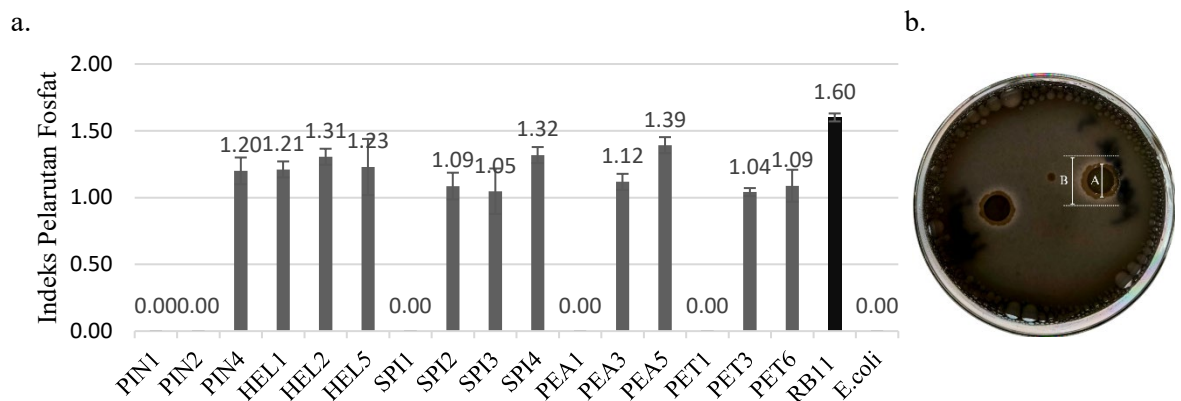
Penilaian pemecahan ACC oleh enzim ACCD ditentukan melalui ujian kolorimetrik 2,4-dinitrofenilhidrazin untuk mengesan kehadiran dan mengukur kepekatan α -ketobutirat yang terhasil daripada hidrolisis ACC. Terdapat lima pencilan yang menghasilkan nilai kepekatan α -ketobutirat lebih tinggi daripada nilai kawalan RB11 (0.34 ± 0.04 mg/mL) seperti PIN4, PEA1, PEA3, PET1 dan PET3 (Rajah 2). Nilai kepekatan α -ketobutirat yang tertinggi iaitu 0.52 ± 0.42 mg/mL dihasilkan oleh pencilan empat rizosfera pokok Pinwheelflower (PIN4). Menurut Rajah 2, setiap rizosfera mempunyai sekurang-kurangnya satu pencilan yang menunjukkan nilai kepekatan α -ketobutirat yang menghampiri atau melebihi dengan nilai kawalan. Pencilan yang menghasilkan kepekatan α -ketobutirat yang menghampiri atau melebihi nilai kawalan menunjukkan aktiviti deaminase ACC yang lebih kuat. Ini bermakna pencilan tersebut berupaya mengurangkan tahap etilena dalam tumbuhan dengan baik seterusnya membantu pertumbuhan tumbuhan yang berada di bawah tekanan.



Rajah 2. Graf bar kepekatan α -ketobutirat yang terhasil bagi setiap pencilan terpilih.

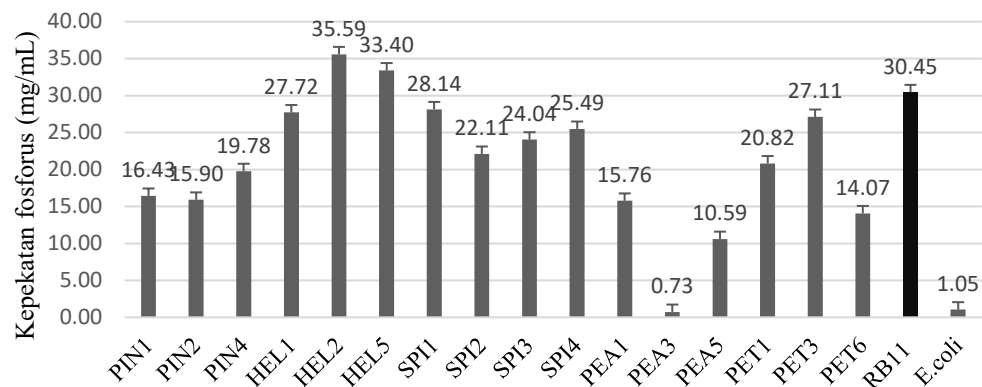
3.2.3 Keupayaan melarutkan fosfat

Kebanyakannya fosfat yang hadir di dalam tanah adalah dalam bentuk yang tidak boleh dicapai secara terus oleh tumbuhan dan memerlukan mikroba untuk menguraikan fosfat organik kepada bentuk yang boleh diambil oleh tumbuhan (Miller et al. 2010). Saringan awal ditentukan melalui pembentukan zon halo di sekeliling koloni dan ia menunjukkan kebolehan sesuatu pencilan untuk melarutkan fosfat organik (trikalsium fosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) di dalam agar. Indeks pelarutan fosfat digunakan untuk mengukur pelarutan fosfat secara kualitatif di atas agar. Hasil diperoleh menunjukkan terdapat sebelas pencilan yang membentuk zon halo dan nilai indeks pelarutan fosfat yang tertinggi dihasilkan oleh pencilan PEA5 (Rajah 3). Piring pada Rajah 3b menunjukkan zon halo yang terhasil bagi pencilan PEA5. Selain itu, setiap rizosfera menunjukkan sekurang-kurangnya satu pencilan yang mempunyai nilai indeks pelarutan fosfat di atas agar Pikovskaya.



Rajah 3. (a) Graf bar indeks pelarutan fosfat bagi setiap pencilan terpilih dan (b) pembentukan zon halo di sekeliling koloni pencilan PEA5 di atas agar Pikovskaya.

Kepekatan larutan fosforus yang terhasil daripada pelarutan fosfat dapat ditentukan melalui lengkung piawai fosforus (P). Rajah 4 menunjukkan bahawa, terdapat dua pencilan yang menghasilkan nilai kepekatan fosforus lebih tinggi daripada nilai kawalan RB11 (30.45 ± 0.42 mg/mL) iaitu pencilan dari pokok Heliconia HEL2 (35.59 ± 1.03 mg/mL) dan HEL5 (33.40 ± 3.66 mg/mL). Nilai kepekatan fosforus yang tertinggi iaitu 35.59 ± 1.03 mg/mL dihasilkan oleh pencilan dua daripada rizosfera pokok bunga Heliconia (HEL2). Berdasarkan hasil pada Rajah 4, setiap rizosfera mempunyai sekurang-kurangnya dua pencilan yang melarutkan fosfat, membentuk fosforus iaitu bentuk yang boleh dicapai dan boleh digunakan dalam pertumbuhan tumbuhan. Analisis kuantitatif memberikan nilai kepekatan yang tepat dan lebih terperinci, berguna untuk penyelidikan yang memerlukan pengukuran tepat pelarutan fosfat.

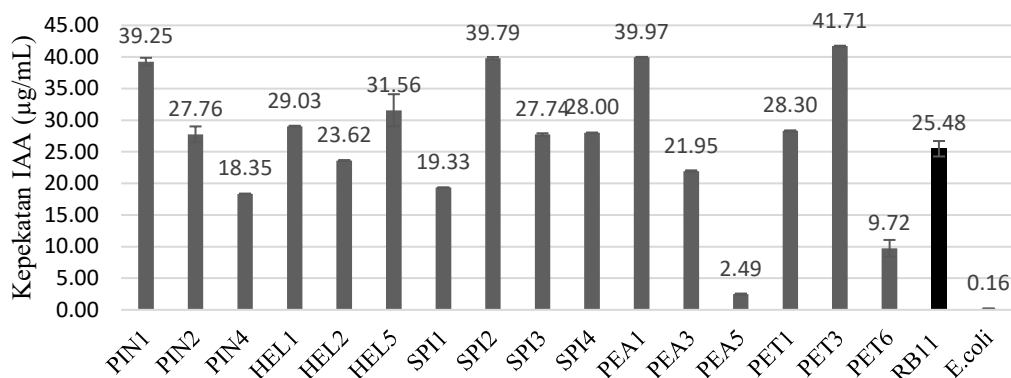


Rajah 4. Graf bar kepekatan fosforus yang terhasil bagi setiap pencilan terpilih.

3.2.4 Keupayaan menghasilkan asid indol asetik (IAA)

Asid indol-3-asetik (IAA) merupakan fitohormon yang membantu dalam perkembangan tumbuhan seperti pembahagian sel dan pemanjangan akar untuk menyediakan luas permukaan akar yang besar supaya penyerapan nutrien dan air dapat ditingkatkan. Di bawah keadaan semula jadi, akar tumbuhan mengeluarkan sebatian organik, termasuk L-triptofan (L-Trp) yang boleh digunakan oleh rizobakteria dalam biosintesis IAA untuk membantu tumbuhan rintang terhadap tekanan biotik dan abiotik (Lebrazi et al. 2020).

Kehadiran IAA yang terhasil dikesan menggunakan reagen Salkowski dan pengukuran kepekatan IAA ditentukan melalui lengkung piawai kepekatan IAA. Terdapat sepuluh pencilan yang menghasilkan nilai kepekatan IAA yang lebih tinggi daripada nilai kawalan RB11 ($25.48 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$) seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 5. Nilai kepekatan IAA yang tertinggi iaitu $41.71 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ dihasilkan oleh pencilan tiga pokok Petunia (PET3). Hasil pada Rajah 5 menunjukkan setiap rizosfera mempunyai sekurang-kurangnya dua pencilan yang menunjukkan nilai kepekatan IAA yang menghampiri atau melebihi dengan nilai kawalan RB11. Ini menunjukkan bahawa pencilan-pencilan ini lebih cekap dalam menghasilkan IAA dan mempunyai keupayaan menggalakkan pertumbuhan tumbuhan yang lebih baik dalam persekitaran yang tertekan seperti kemarau.



Rajah 5. Graf bar kepekatan IAA yang terhasil bagi setiap pencilan terpilih.

3.3 Pengenalpastian pencilan terpilih

Pengenalpastian pencilan terpilih ditentukan berdasarkan jujukan 16S rDNA. Hasil daripada analisis penjujukan 16S rDNA menunjukkan bahawa, pencilan terpilih dari setiap rizosfera pokok bunga dapat dikategorikan dalam tiga genera yang berbeza iaitu *Burkholderia* (satu pencilan), *Bacillus* (satu pencilan) dan *Enterobacter* (tiga pencilan). Identiti strain terhampir yang disenaraikan dalam pangkalan data NCBI diberi dalam Jadual 4.3. Pengenalpastian setiap pencilan terpilih dengan spesies yang disenaraikan dalam pangkalan data NCBI adalah berdasarkan peratusan persamaan dengan gen 16S rDNA yang terhampir dan nombor capaian bagi setiap spesies adalah seperti dalam Jadual 3.

Jadual 3. Senarai pencilan dan maklumat strain terhampir dari pangkalan data NCBI.

Pencilan	Strain terhampir	No. aksesii strain terhampir	Peratus persamaan dengan gen 16S rRNA	Nama baharu pencilan
PIN4	<i>Burkholderia aenigmatica</i>	NR_174230.1	96.51%	<i>Burkholderia</i> sp. UKM PIN4
HEL5	<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i>	NR_179166.1	96.86%	<i>Enterobacter</i> sp. UKM HEL5
SPI4	<i>Enterobacter cloacae</i>	NR_102794.2	93.11%	<i>Enterobacter</i> sp. UKM SPI4
PEA1	<i>Bacillus cereus</i>	OR016763.1	81.39%	<i>Bacillus</i> sp. UKM PEA1
PET3	<i>Enterobacter asburiae</i>	NR_024640.1	90.43%	<i>Enterobacter</i> sp. UKM PET3

4. Kesimpulan

Daripada 30 rizobakteria yang berjaya dipencilkan, hanya lima pencilan yang terpilih mempunyai sifat-sifat PGPR tertinggi mengikut rizosfera khusus masing-masing. Pencilan daripada rizosfera pokok Pinwheelflower telah dikenal pasti sebagai *Burkholderia* sp. UKM PIN4, manakala pencilan daripada rizosfera pokok Heliconia ialah *Enterobacter* sp. UKM HEL5. Pencilan daripada rizosfera pokok Spider Lily pula ialah *Enterobacter* sp. UKM SPI4 dan pencilan daripada rizosfera pokok Peacock dikenal pasti sebagai *Bacillus* sp. UKM PEA1. Pencilan daripada rizosfera pokok Petunia dikenal pasti sebagai *Enterobacter* sp. UKM PET3. Pencilan-pencilan ini mempamerkan sifat-sifat PGPR yang tertinggi dalam kajian ini, menjadikannya calon yang berpotensi dalam menyokong pertumbuhan tumbuhan berbunga secara mampan yang wujud secara semula jadi, iaitu sebagai baja bio. Penggunaan baja bio alternatif kepada baja kimia adalah penting untuk pemuliharaan nutrien dalam tanah, memelihara tanaman dan mengelakkan pencemaran serta membantu dalam mengurangkan kos pengurusan tanaman.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh dana penyeliaan pelajar prasiswazah, Fakulti Sains dan Teknologi, UKM.

Rujukan

Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. 2017. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and *TaCTR1/TaDREB2* expression. *Physiologia Plantarum* 161(4): 502-514.

Burk, W. E. 1930. The influence of calcium, magnesium, and potassium on the growth of *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology* 19(6): 389-417.

Gordon, S. A., & Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26(1): 192-195.

International Fertilizer Association. 2024. *Public summary: medium-term fertilizer outlook 2024-2028*. Paris, Perancis, 22 Julai. <https://api.ifastat.org/reports/download/14147> [1 Februari 2025].

Khan, A. R., Ullah, I., Waqas, M., Shahzad, R., Hong, S. J., Park, G. S., Jung, B. K., Lee, I. J., & Shin, J. H. 2022. In-depth characterization of plant growth promotion potentials of endophytic bacteria from *Solanum nigrum* L. and their interaction with host and non-host plants. *Frontiers in Microbiology* 13: 863702.

Khan, M. A., & Gul, B. 2006. Halophyte seed germination and their potential uses in vegetation rehabilitation. *Handbook of Seed Science and Technology* 945-963.

Lebrazi, S., Fadil, M., & Chraibi, M. 2020. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18(21).

Lotfi, N., Soleimani, A., & Çakmakçı, R. 2022. Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria

- (PGPR) in Persian walnut associated with drought stress tolerance. *Science Reports* 12(1): 12725
- Lutz, P. E., Almeida, D., Fiori, L. M., Turecki, G., & Cruceanu, C. 2012. Optimized analysis of DNA methylation and gene expression from small, anatomically-defined areas of the brain. *Journal of Neuroscience Methods* 209(1): 131–136.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. 2017. *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). USA: Pearson.
- Miller S. H., Browne P., Prigent-Cambaret C., Combes-Meynet E., Morrissey J. P., & O'Gara F. 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilisation in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 2(3): 403–411.
- Munees, A., & Mulugeta, N. 2014. Mechanisms of plant growth promotion and disease suppression by plant-associated bacteria. *Frontiers in Plant Science* 5: 539.
- Fazelian, N., & Yousefzadi, M. 2022. Chapter 8-nano-biofertilizers for enhanced nutrient use efficiency. *Nano-enabled Agrochemicals in Agriculture, Iran: Academic Press* 1(8): 145-158.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170(1): 265-270.
- Praeg, N., Pauli, H., & Illmer, P. 2019. Microbial diversity in alpine soils: effects of roadside pollution and vegetation type. *Applied Soil Ecology* 144: 98-106.
- Rafedzi E. A. K., Bharudin I., Kamaruddin S., Abu Bakar F. D., Murad A. M. A. 2024. Effectiveness of the drought-tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that supports paddy growth in drought condition. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 18(1): 297-310.
- Akinnawo, S. O. 2023. Eutrophication: causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. *Environmental Challenges* 12: 100733.
- Zhang, X., Tian, C., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, Y., & Li, X. 2021. Strategies of nitrogen-fixing bacteria to overcome oxygen stress and their application in agriculture. *Frontiers in Microbiology* 12: 628379.

The Impact of Salinity Stress on The Growth of NMR IS21 and NMR 191 Rice Varieties

Liong Ee Yan¹, Wan Asrina Wan Yahya², Sobri Hussein³ & Nurulhikma Md Isa^{1,*}

¹*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia*

²*Department of Crop Science, Faculty of Agricultural Science and Forestry, UPM Bintulu Sarawak Campus*

³*Agrotechnology and Biosciences Division, Malaysia Nuclear Agency, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.*

** e-mail of corresponding author: hikma@ukm.edu.my*

Abstract: Salinity is an abiotic stress that affects growth and reduces crop yields. Paddy is among the crops affected by salinity because it is a type of glycophytic plant that is sensitive to high salinity. In this study, two paddy varieties were used, namely NMR IS21 and NMR 191 which are varieties produced by the Malaysian Nuclear Agency. This study aimed to identify the effects of salinity on the development of the vegetative, reproductive and agronomic characteristics of NMR IS21 and NMR 191. The salt treatment used was at a concentration of 40 mM sodium chloride (NaCl) solution. Results showed that NMR IS21 experienced a significant decline in agronomic traits, with a $\pm 15.52\%$ decrease in the percentage of filled grains. NMR 191 exhibited substantial negative effects in both vegetative and reproductive growth, including a reduction in plant height by ± 12.1 cm, root length is also affected by ± 6.32 cm, and panicle weight decreased by ± 0.26 g. The results of this study show that salinity has a negative effect on NMR IS21 and NMR 191 paddy in terms of vegetative growth, reproductive growth and agronomic characteristics. However, NMR IS21 showed better tolerance to salinity. This study is expected to provide a basic understanding of the characteristics of NMR IS21 and NMR 191 paddy as well as be a guide for further research to improve paddy.

Keywords: NMR IS21; NMR 191; paddy; salinity

Abstrak: Saliniti merupakan tekanan abiotik yang menjejaskan tumbesaran dan mengurangkan hasil tanaman. Padi adalah antara tanaman yang terjejas akibat kesan saliniti kerana ianya yang merupakan sejenis tumbuhan glikofit yang sensitif terhadap tekanan garam tinggi. Dalam kajian ini, dua varieti padi digunakan iaitu NMR IS21 dan NMR 191 yang merupakan padi keluaran Agensi Nuklear Malaysia. Kajian ini bertujuan untuk mengenal pasti kesan tekanan saliniti terhadap perkembangan peringkat vegetatif, reproduktif dan juga ciri agronomi padi NMR IS21 dan NMR 191. Rawatan garam yang digunakan adalah pada kepekatan 40 mM larutan natrium klorida (NaCl). Padi NMR IS21 menunjukkan perencatan yang signifikan dari segi ciri agronomi dengan pengurangan bijirin berisi sebanyak $\pm 15.52\%$. Padi NMR 191 pula menunjukkan perencatan yang signifikan dari segi pertumbuhan vegetatif dan reproduktif. Ketinggian pokok terbantut sebanyak ± 12.1 cm, panjang akar turut terjejas dan berkurang ± 6.32 cm dan berat panikel berkurang sebanyak ± 0.26 g berbanding kawalan. Hasil dapatan kajian ini menunjukkan bahawa tekanan saliniti memberi kesan negatif terhadap padi NMR IS21 dan NMR 191 dari segi perkembangan vegetatif, perkembangan reproduktif dan ciri agronomi, namun NMR IS21 lebih baik dari segi ketahanan terhadap saliniti. Kajian ini diharapkan dapat memberi pemahaman asas tentang ciri padi NMR IS21 dan NMR 191 serta menjadi panduan untuk kajian lanjut bagi penambahbaikan padi.

Kata kunci: NMR IS21; NMR 191; padi; saliniti

1. Introduction

Paddy (*Oryza sativa*) is a crucial crop in the agricultural sector, serving as a staple food for millions, particularly in Asian countries (Firdaus et al. 2020). Rice is a staple food for almost all ethnic groups because of its high carbohydrate content, which supplies energy for daily activities (Xu et al. 2018). It is also a good source of fiber and essential vitamins, which contribute to human health. Rice is grown in over 100 countries worldwide, making it a significant global agricultural commodity (Fukagawa & Ziska 2019).

Paddy is scientifically categorized under the Gramineae family. The paddy growth can be divided into three stages: vegetative, reproductive, and maturation (Moldenhauer, Counce & Hardke 2018). Paddy is highly sensitive to salinity stress, especially during its vegetative and reproductive phases (Thorat et al. 2018). Global warming and rising sea levels has led to soil salinization, particularly along coastal areas of Malaysia (Ghazali et al. 2018). This has a detrimental impact on paddy yields, reducing agricultural productivity (Sah et al. 2021).

To overcome this problem and ensure sufficient supply, effort has been made by the Malaysia Nuclear Agency which has develop new paddy cultivars through nuclear radiation, supported by the International Atomic Energy Agency (IAEA) and the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO) (Shahidan et al. 2022). Varieties such as NMR IS21 and NMR 191 were developed to enhance resilience to abiotic stresses like drought and disease (Raina et al. 2020; Kiong Ling 2024). However, the salinity tolerance of these two varieties remains underexplored. This study aims to investigate the effect of salinity stress on NMR IS21 and NMR 191, offering essential insights into their adaptability in saline-prone areas, which will help farmers make informed decisions about paddy variety selection for optimal yield.

2. Materials and Methods

2.1 Study area

Preparation work at the initial stage such as dormancy breaking and seed sterilization is done at the Malaysian Genome and Vaccine Institute (MGVI). Subsequently, the preparation of experiment plots, sowing of seeds, harvesting of grains as well as the collection of research data are carried out at the Greenhouse of the Plant House Complex, Universiti Kebangsaan Malaysia.

2.2 Experimental design

In this study, the experimental design used is Randomized Complete Block Design (RCBD). A total of three blocks were used, three replications for each type of treatment. Each block consists of two main plots which are the control plot and the salt water treatment plot and each main plot consists of two subplots which are NMR IS21 and NMR191. The arrangement of paddy varieties in the plot is random. A total of three paddy seedlings were planted in one subplot (bucket).

2.3 Treatment preparation

The salt water used is a 40 millimolar (mM) sodium chloride solution. According to the study of Sansenya et al. (2019), the concentration of sodium chloride solution 20 mM can affect the physiological characteristics of rice. Study also shows that the salinity treatment of 34.2 mM NaCl is sufficient to affect the growth and production of rice (Zhang et al. 2022). This is because rice is a glycophyte that is very sensitive to salinity stress. In general, the threshold of salinity stress for paddy is 3 dS/m or 30 mM NaCl (Thorat et al. 2018). In terms of agricultural land, soil will be classified as saline when it exceeds 4 dS/m or 40 mM NaCl (Rodríguez Coca et al. 2023). Therefore, the concentration of saltwater treatment used is 40 mM NaCl so that it can have an effect of salinity stress on the growth of paddy. Sodium chloride solution is prepared by dissolving 2.34g of sodium chloride, NaCl in each liter of water.

$$\text{Weight of NaCl (g)} = \frac{40}{1000} (\text{mM}) \times 58.44 (\text{g})$$

2.4 Data analysis

In this study, data obtained were analyzed using excel software. The type of test that is used is the Analysis of Variance (ANOVA) test to identify the significant difference between the type of treatment and the varieties of paddy.

3. Results and Discussion

3.1 Height of paddy plant

The highest mean height of paddy plant is recorded by NMR 191 in the control plot (92.1 cm), followed by NMR IS21 in the control plot (87.8 cm), NMR IS21 in the treatment plot (82.4 cm) and lastly NMR 191 in the treatment plot (80.0 cm). Under saline condition, the mean height of NMR IS21 is higher than NMR 191 by 2.4 cm. However, the difference between varieties did not achieve significant value. In general, the mean height of paddy plants in the control plot is higher than the treatment plot. The difference between control and treatment plot is significant. This is because the salt water used in salinity treatment contains a high sodium content (40mM NaCl). When the soil is treated with salt water, the sodium content in the soil increases and the water potential decreases. This causes osmotic pressure on the paddy plants because the water potential in the soil is lower compared to plant cells. Osmotic pressure will limit the absorption of water and nutrients into plants (Lu & Fricke 2023). In addition, osmotic pressure will also result in stomatal closure. The carbon dioxide assimilation process is hindered and the photosynthesis process cannot be carried out in plants (Thorat et al. 2018). Thus, the paddy plants lack of sufficient nutrients and its growth will be retarded. As a result, the height of the paddy plants became shorter. The results of this finding have proven that salt water have a negative effect on the height of paddy plants.

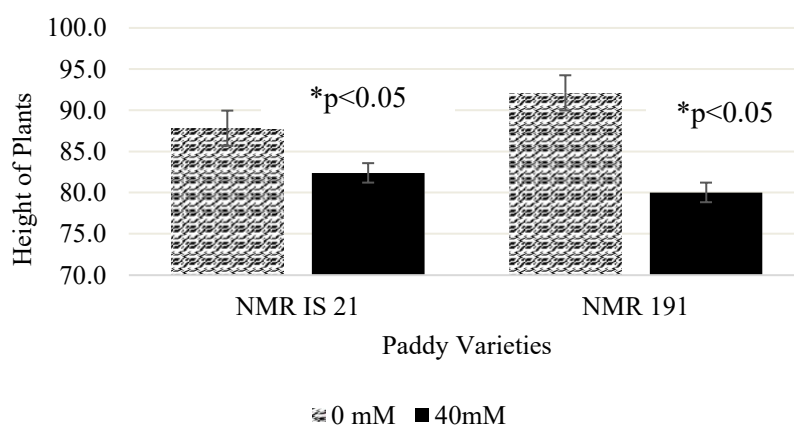


Figure 1. Mean height of NMR IS21 and NMR 191 paddy plants under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Table 1. Two-way ANOVA analysis of mean height of NMR IS21 and NMR 191 paddy plants under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Source	SS	Degree of freedom	MS	F-value	P-value
Types of treatment	689.94	1	689.94	20.68	0.00
Paddy varieties	8.22	1	8.22	0.25	0.62
Types of treatment * Paddy varieties	99.33	1	99.33	2.98	0.09
Error	1067.60	32	33.36		
Total	1865.09	35			

3.2 Length of root

The highest mean root length is recorded by NMR IS21 control plot (42.22 cm), followed by NMR IS21 treatment plot (39.67 cm), NMR 191 control plot (37.86 cm) and lastly NMR 191 treatment plot (31.53 cm). Under saline condition, the mean root length of NMR IS21 is significantly higher than NMR 191 by 8.13 cm. In general, the mean root length in the control plot is higher than the treatment plot. This shows that the salinity treatment (40mM) had a negative impact on the root length of paddy plants. This is because salt water contains a high concentration of sodium which can interfere with the absorption of water and minerals into the roots. Roots are plant organs that are in direct contact with sodium ions in the soil, thus the roots will receive negative effects on their growth including retarded root length. Lack of water results in cellular dehydration and osmotic stress in the root. Salinity stress results in inhibition of root cell division and expansion. In this context, root length will experience growth retardation (Rachmawati et al. 2021). In this study, both NMR IS21 and NMR 191 that received salt water treatment showed a retardation in root length compared to paddy plants that received normal water. The results of this finding have proven that salt water will have a negative effect on the length of paddy roots.

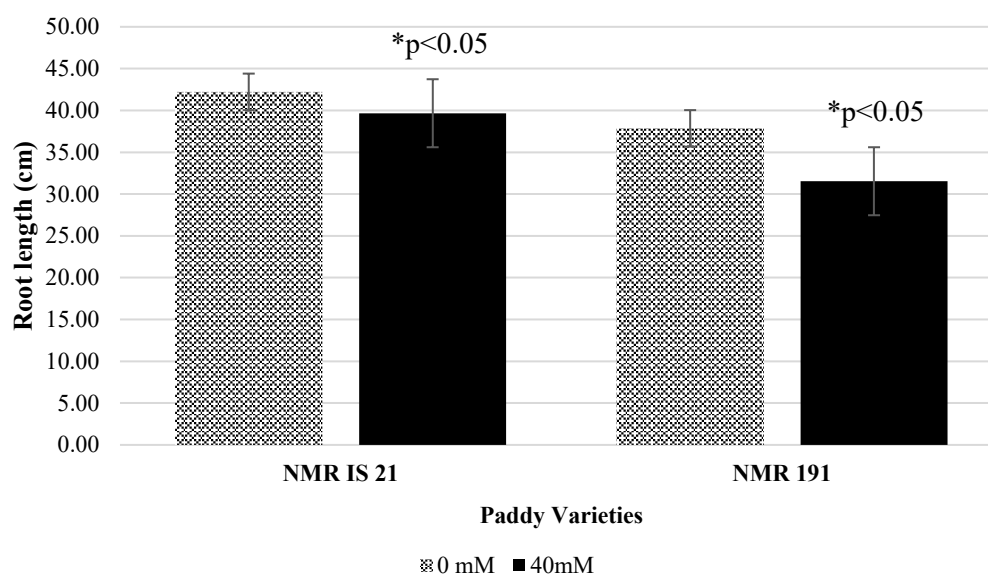


Figure 2. Mean root length of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Table 2. Two-way ANOVA analysis of mean root length of NMR IS21 and NMR 191 paddy plants under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Source	SS	Degree of freedom	MS	F-value	P-value
Types of treatment	177.33	1	177.33	33.79	0
Paddy varieties	351.56	1	351.56	66.99	0
Types of treatment * Paddy varieties	31.92	1	31.92	6.08	0.02
Error	167.94	32	5.25		
Total	728.76	35			

3.3 Panicle weight

Panicle weight is better under control environment (water with no NaCl) for both varieties compared to saline condition (40mM NaCl). When the paddies were treated with salt water, the mean panicle weight of NMR IS21 showed a significant decrease by 0.12 g whereas NMR 191 decreased significantly by 0.26 g. This shows that the salinity treatment (40mM) had a negative impact on the panicle weight. Panicle weight is an important parameter as the weight of panicle is directly proportional to the yield of grains. Paddy plants with higher panicle weight have higher grain yield (Bian et al., 2020). Generally, the panicle weight will be affected by the rate of grain filling through the process of starch accumulation in grains. However, salinity will limit the absorption and utilization of nutrients in grains, resulting in nutrient deficiency or imbalance. As a result, the grain filling process is disturbed (Li et al. 2023). Due to the low grain filling rate, panicle weight decreases. In this study, both NMR IS21 and NMR 191 showed a decrease in panicle weight under salinity stress. These findings show that salinity has a negative effect on the panicle weight.

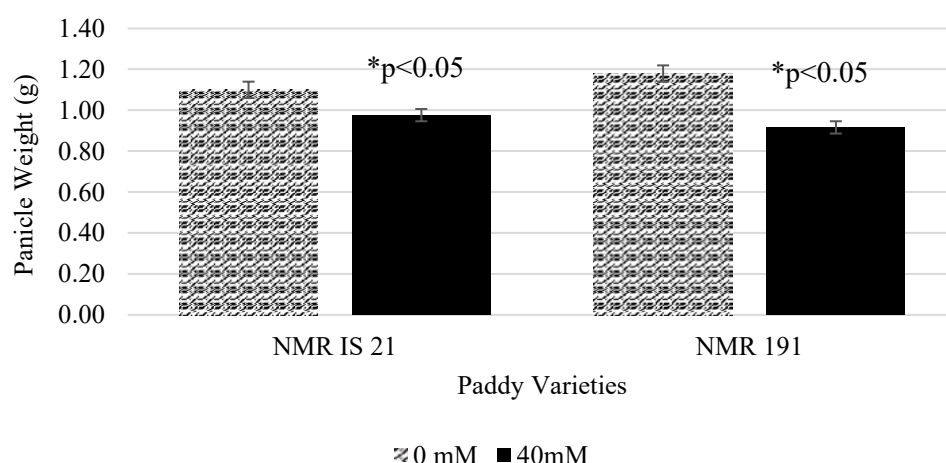


Figure 3. Mean panicle weight of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Table 3. Two-way ANOVA analysis of mean panicle weight of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Source	SS	Degree of freedom	MS	F-value	P-value
Types of treatment	0.34	1.00	0.34	4.72	0.04
Paddy varieties	0.00	1.00	0.00	0.01	0.91
Types of treatment * Paddy varieties	0.04	1.00	0.04	0.62	0.44
Error	2.28	32.00	0.07		
Total	2.66	35.00			

3.4 Hundred grain weight

Hundred grain weight is better under control environment (water with no NaCl) for both varieties compared to saline condition (40mM NaCl). The hundred grain weight of both varieties showed significant decrease under saline condition. When the paddies were treated with salt water, the mean of hundred grain weight of NMR IS21 decreased by 0.42 g whereas NMR 191 decreased by 0.41 g. In general, the mean of hundred grain weight in the control plot is higher than the treatment plot. This shows that the salinity treatment (40mM) had a negative impact on the grain weight. Thousand grain weight is a key parameter in assessing paddy production rate (Choudhary, Machavaram & Soni 2023). However, 100 grain weight was used in this study because salinity reduced the quantity of grain produced to less than 1000 grains. Therefore, 100 grain weight was used as a parameter as in previous studies (Singh et al. 2021). Salinity reduces the grain weight because the supply of nutrients and water required for grain filling is limited. Before the flowering process, the source of nutrients for grain filling comes from the stored nutrients in the paddy stem, while after the flowering process, the nutrients come from photosynthetic product (Liu et al. 2025). Salt stress will cause stomata closure. The CO₂ concentration in the cells decreases causing the rate of photosynthesis to decrease significantly. The transport of photosynthetic product into the grain is also hindered (Li et al. 2023). Disruption of grain filling causes the grain weight to decrease. In this study, both NMR IS21 and NMR 191 grain weight decreases when salt water treatment is given. These findings show that salinity stress has a negative effect on grain weight.

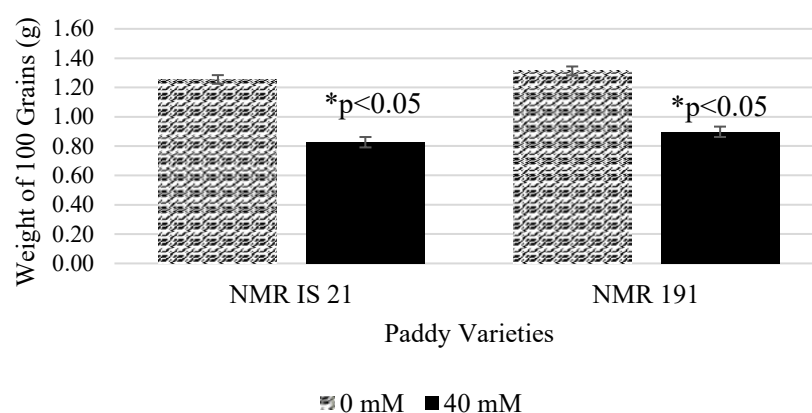


Figure 4. Mean of hundred grain weight of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Table 4. Two-way anova analysis for mean percentage of filled grain of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Source	SS	Degree of freedom	MS	F-value	P-value
Types of treatment	1.60	1.00	1.60	35.68	0.00
Paddy varieties	0.04	1.00	0.04	0.86	0.36
Types of treatment * Paddy varieties	0.00	1.00	0.00	0.01	0.93
Error	1.44	32.00	0.04		
Total	3.08	35.00			

3.5 Percentage of filled grain

Percentage of filled grain is better under control environment (water with no NaCl) for both varieties compared to saline condition (40m M NaCl). The percentage of filled grain of both varieties showed significant decrease under saline condition. When the paddies were treated with salt water, the mean percentage of filled grain of NMR IS21 reduced by 15.52%, whereas NMR 191 reduced by 6.57%. In general, the mean percentage of filled grain in the control plot is higher than the treatment plot. This shows that the salinity treatment (40 mM) had a negative impact on the percentage of filled grain. The percentage of filled grain is an important parameter to measure the productivity of a paddy plant to produce grains. A high percentage of filled grains can symbolize the high productivity of paddy plant. However, salinity will cause reduction in the percentage of filled grains. This is because salinity will interfere with water absorption in the paddy root. The high content of sodium ions (Na^+) in the roots will prevent the absorption of water through the roots and affect the metabolic process (Rachmawati et al. 2021). At the same time, salinity stress also causes stomatal closure and affects the photosynthesis process (Li et al. 2023). The lack of production and transport of nutrients and water into the grain will cause the grain produced to be empty (Nasrudin, Isnaeni & Fahmi 2022). In this study, both NMR IS21 and NMR 191 showed a reduction in terms of the percentage of filled grains. The results of this findings show that salinity has a negative effect on the percentage of filled grains.

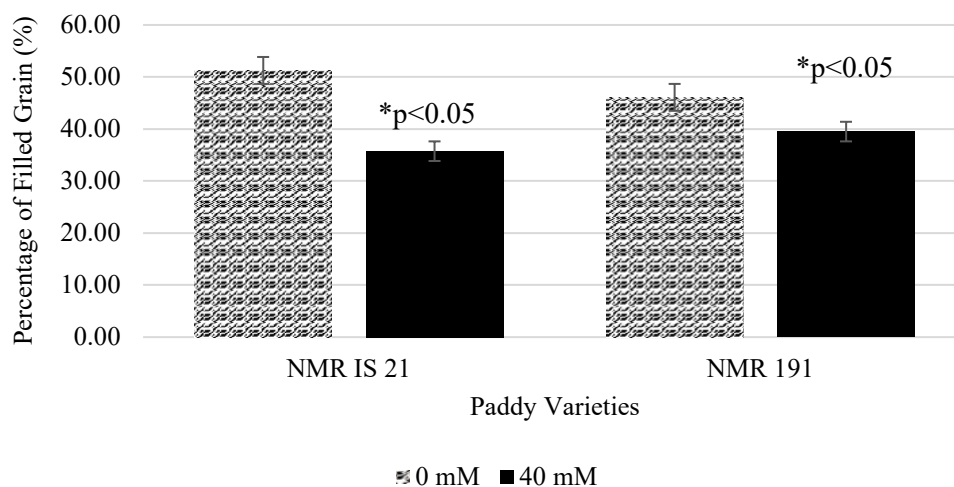


Figure 5. Mean percentage of filled grain of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Table 5. Two-way anova analysis for mean percentage of filled grain of NMR IS21 and NMR 191 under control water with no NaCl and 40mM NaCl.

Source	SS	Degree of freedom	MS	F-value	P-value
Types of treatment	1098.38	1.00	1098.38	36.30	0.00
Paddy varieties	4.37	1.00	4.37	0.14	0.71
Types of treatment * Paddy varieties	180.12	1.00	180.12	5.95	0.02
Error	968.34	32.00	30.26		
Total	2251.21	35.00			

4. Conclusion

This study shows the distinct responses of two paddy varieties, NMR IS21 and NMR 191, to salinity stress during both vegetative and reproductive stages and also the effect of salt stress towards its agronomic traits. In general, salinity stress cause negative impact on both paddy varieties. However, NMR IS21 exhibited greater resilience to salinity stress than NMR 191 as the rate of growth retardation is lower than NMR 191. Whereas NMR 191 showed better performance than NMR IS21 in agronomic traits when both varieties is given salt stress. The findings emphasize the importance of selecting appropriate paddy varieties based on salinity tolerance for optimal agricultural productivity. This study contributes significantly to the field by offering valuable insights into paddy development under stress conditions, which can aid farmers in making informed decisions about paddy variety selection and cultivation practices. This study also contributes to future research by providing fundamental information of the NMR IS21 and NMR 191 characteristics under salinity stress.

Acknowledgements

This research was funded by Tabung Agihan Penyelidikan, UKM (TAP-K019990).

References

- Bian, J. Long, Ren, G. Lei, Han, C., Xu, F. Fu, Qiu, S., Tang, J. Hua, Zhang, H. Cheng, Wei, H. Yan & Gao, H. 2020. Comparative analysis on grain quality and yield of different panicle weight indica-japonica hybrid rice (*Oryza Sativa* L.) Cultivars. *Journal of Integrative Agriculture* 19(4): 999–1009.
- Choudhary, V., Machavaram, R. & Soni, P. 2023. Optimizing mat quality and transplanter performance using soil mix with vermicompost and farmyard manure in paddy tray nursery: a sustainable smart farming approach in India. *Farming System* 1(3).
- Firdaus, R.B.R., Leong Tan, M., Rahmat, S.R. & Senevi Gunaratne, M. 2020. Paddy, rice and food security in malaysia: a review of climate change impacts. *Cogent Social Sciences* 6(1): 1818373.
- Fukagawa, N.K. & Ziska, L.H. 2019. Rice: importance for global nutrition. *Journal of nutritional science and vitaminology* 65:S2-S3
- Ghazali, N.H.M., Awang, N.A., Mahmud, M. & Mokhtar, A. 2018. Impact of sea level rise and tsunami on coastal areas of north-West Peninsular Malaysia. *Irrigation and Drainage* 67: 119-129.
- Kiong Ling, A.P. 2024. Biochemical and transcriptomic analysis of disease resistance and early-maturity-related genes In Nmr-191 and Nmr-192 rice mutant lines. *International Journal of Science and Technology* 10(2): 01–24.
- Li, Y., Ai, Z., Mu, Y., Zhao, T., Zhang, Y., Li, L., Huang, Z., Nie, L. & Khan, M.N. 2023. Rice yield penalty and quality deterioration is associated with failure of nitrogen uptake from regreening to panicle initiation stage under salinity. *Frontiers in Plant Science* 14.
- Liu, J., Wu, M.-W. & Liu, C.-M. 2025. Cereal endosperms: development and storage product accumulation. *Annual review of plant biology* 73(1): 255-291.
- Lu, Y. & Fricke, W. 2023. Salt Stress—Regulation of root water uptake in a whole-plant and diurnal context. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8070.
- Moldenhauer, K., Counce, P., & Hardke, J. 2018. Arkansas Rice Production Handbook (MP192). University of Arkansas Division of Agriculture Cooperative Extension Service.
- Nasrudin, N., Isnaeni, S. & Fahmi, P. 2022. The effect of high salt stress on the agronomic, chlorophyll content, and yield characteristics of several rice varieties. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 995(1): 012028.
- Rachmawati, D., Ramadhani, A. N., & Fatikhasari, Z. 2021. The effect of silicate fertilizer on the root development of rice and its tolerance to salinity stress. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 724(1):012004.
- Raina, A., Khan, S., Sahu, P. K., & Sao, R. (2020). Increasing rice grain yield under abiotic stresses: Mutagenesis, genomics and transgenic approaches. In A. Roychoudhury (Ed.), *Rice research for quality improvement: Genomics and genetic engineering* (Vol. 1: Breeding techniques and abiotic stress tolerance, pp. 753–777). Springer Singapore.

- Rodríguez Coca, L.I., García González, M.T., Gil Unday, Z., Jiménez Hernández, J., Rodríguez Jáuregui, M.M. & Fernández Cancio, Y. 2023. Effects Of Sodium Salinity on Rice (*Oryza Sativa L.*) Cultivation: A Review. Mdpi.
- Sah, S.S., Maulud, K.N.A., Sharil, S., Karim, O.A. & Nahar, N.F.A. 2021. Impact of Saltwater Intrusion on Paddy Growth in Kuala Kedah, Malaysia. *Journal of Sustainability Science and Management* 16(6): 15–30.
- Sansenya, S., Hua, Y., Chumanee, S. & Sricheewin, C. 2019. The Combination Effect of Gamma Irradiation and Salt Concentration On 2-Acetyl-1-Pyrroline Content, Proline Content and Growth of Thai Fragrant Rice (Kdml 105). *Oriental Journal of Chemistry* 35(3): 938–946.
- Shahidan, M.S., Fatah, F.A. & Lim, H.E. 2022. Econometric Modelling for Estimating of Paddy Yield and Rice Production in Melaka, Malaysia. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1059(1): 012078.
- Singh, R.K., Kota, S. & Flowers, T.J. 2021. Salt tolerance in rice: seedling and reproductive stage QTL mapping come of age. *Theoretical and Applied Genetics* 134(11): 3495-3533.
- Thorat, B., Thorat Scholar, B., Sawant Konkan Krishi Vidyapeeth, B. & Correspondence Thorat Scholar, I.B. 2018. Responses Of Rice Under Salinity Stress: A Review Bs Thorat, Ta Bagkar and Sm Raut. *International Journal of Chemical Studies* 6(4): 1441–1447.
- Xu, Z., Xu, W., Peng, Z., Yang, Q. & Zhang, Z. 2018. Effects Of Different Functional Units on Carbon Footprint Values of Different Carbohydrate-Rich Foods in China. *Journal of Cleaner Production* 198: 907–916.
- Zhang, R., Wang, Y., Hussain, S., Yang, S., Li, R., Liu, S., Chen, Y., Wei, H., Dai, Q. & Hou, H. 2022. Study on the Effect of Salt Stress on Yield and Grain Quality Among Different Rice Varieties. *Frontiers in Plant Science* 13.

Extracellular ATP and ADP Signalling Molecules Influence *Arabidopsis thaliana* Root Growth Under Salinity Stress

Wan Aimi Nabilah Wan Marzuki & Amirah Mohammad-Sidik*

*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti
Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: amirahsidik@ukm.edu.my*

Abstract: Soil salinity stress is a major agricultural challenge, reducing crop yield through osmotic stress, ion toxicity, and physiological disturbances. This study investigates the role of extracellular adenosine triphosphate (eATP) and adenosine diphosphate (eADP) in *Arabidopsis thaliana* root growth under salinity stress to identify their potential to enhance plant tolerance. The methodology involved applying eATP and eADP under salinity conditions and assessing primary root length, lateral root density, root orientation, and overall fresh mass. The results showed that eATP significantly increased lateral root density on Day 5 post-transfer ($p < 0.05$), promoting lateral root growth despite salinity stress. Meanwhile, eADP significantly improved primary root growth by Day 8 post-transfer, reduced root waviness, and maintained partial root gravitropism ($p < 0.05$), suggesting its protective role in root stability under severe salinity stress. These findings highlight the signalling function of eATP and eADP in modulating root growth responses under salinity stress, offering potential applications for improving crop resilience in saline environments.

Keywords: eATP; eADP; salinity stress; root growth; *Arabidopsis thaliana*

Abstrak: Tekanan saliniti dalam tanah merupakan cabaran utama dalam sektor pertanian kerana ia mengurangkan hasil tanaman melalui tekanan osmotik, ketoksikan ion, dan gangguan fisiologi tumbuhan. Kajian ini bertujuan untuk memahami peranan molekul isyarat luar sel adenosin trifosfat (eATP) dan adenosin difosfat (eADP) dalam pertumbuhan akar *Arabidopsis thaliana* di bawah tekanan saliniti untuk mengenal pasti potensi molekul ini dalam meningkatkan toleransi tumbuhan. Metodologi kajian melibatkan aplikasi eATP dan eADP dalam keadaan tekanan saliniti serta penilaian terhadap panjang akar utama, kepadatan akar sisi, paksi akar dan berat segar. Keputusan mendapati bahawa aplikasi eATP meningkatkan kepadatan akar sisi secara signifikan pada Hari ke-5 selepas pemindahan ($p < 0.05$), menggalakkan pertumbuhan akar lateral walaupun dalam tekanan saliniti. Sementara itu, eADP meningkatkan pertumbuhan akar tunggal dengan signifikan pada Hari ke-8 selepas pemindahan, mengurangkan alunan akar dan mengekalkan gravitropisme akar ($p < 0.05$), menunjukkan kesan perlindungan terhadap kestabilan akar. Penemuan ini menekankan fungsi isyarat eATP dan eADP dalam mengawal tindak balas pertumbuhan akar di bawah tekanan saliniti, sekali gus menawarkan potensi dalam meningkatkan daya tahan tanaman terhadap persekitaran saliniti tinggi.

Kata kunci: eATP; eADP; tekanan saliniti; pertumbuhan akar; *Arabidopsis thaliana*

1. Introduction

Soil salinity is a critical environmental challenge that limits plant growth and productivity by reducing water availability, causing ion toxicity, and disrupting nutrient homeostasis. High salt concentrations in soil lead to osmotic stress, which impairs water uptake and results in reduced germination rates, wilting, and even plant death. Additionally, salt stress induces ion toxicity, particularly through excessive sodium (Na^+) accumulation, which competes with essential potassium (K^+) uptake, disrupting cellular functions and leading to reduced biomass accumulation. The combination of these factors significantly decreases agricultural yield and economic output. With climate change accelerating soil salinization, it is projected that up to 50% of global agricultural land could be affected by the mid-21st century, further threatening food security (Hultgren et al. 2025).

Recent studies have highlighted the role of extracellular adenosine triphosphate (eATP) and adenosine diphosphate (eADP) as crucial signalling molecules in plant stress responses. These molecules bind to the purinergic receptor family P2K, consisting of P2K1 (also known as Does not Respond to Nucleotides 1, DORN1) and P2K2, triggering intracellular signalling cascades that modulate stress adaptation. Activation of P2Ks by eATP leads to a rapid increase in cytosolic free calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), generation of reactive oxygen species (ROS), and transcriptional changes that influence plant stress responses (Choi et al. 2014; Pham et al. 2020). Additionally, eATP has been implicated in regulating root architecture, mediating plant-microbe interactions, and enhancing tolerance to environmental stressors (Myers et al. 2022; Sowders et al. 2023; Tripathi et al. 2018). Although eADP can bind to P2K receptors and induce a transient increase in free $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, it does not trigger intracellular ROS accumulation (Demidchik et al. 2011), suggesting that its signalling pathway is distinct from that of eATP.

Despite the growing recognition of eATP and eADP in stress signalling, their specific impact on root morphology and biomass accumulation under salinity stress remains largely unexplored. This study investigates how eATP and eADP influence root growth in *Arabidopsis thaliana* exposed to saline conditions. The research focuses on key root traits, including primary root length, lateral root density, root waviness, degree of skewness, Horizontal Growth Index (HGI), and fresh seedling biomass under different treatment conditions. By analysing these parameters, this study aims to deepen our understanding of how extracellular nucleotides contribute to root system plasticity in response to salinity stress. Based on the role of eATP and eADP in inducing cytosolic calcium ion influx as a secondary messenger, we hypothesize that exogenous application of these molecules will partially rescue root growth under salinity stress by enhancing primary root and lateral root growth through the P2K signalling pathway. The findings from this study provide insights into novel molecular targets for improving crop resilience, particularly in saline environments. By elucidating the role of eATP and eADP in modulating root architecture under stress conditions, this research contributes to broader efforts in improving plant adaptation mechanisms to ensure sustainable food production in the face of increasing soil salinity.

2. Materials and Methods

2.1 Plant materials and growth conditions

Seeds of *A. thaliana* Columbia (Col-0) were surface-sterilized by washing sequentially with 70% ethanol (v/v) and sterile distilled water, followed by treatment with 10% (v/v) sodium hypochlorite and 0.05% (v/v) Triton-X for 5 minutes. The sterilized seeds were rinsed five times with sterile distilled water before being plated on half-strength Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) medium (©Duchefa Biochemie) supplemented with 0.8% (w/v) phytoagar and 1% (w/v) sucrose (System). The pH of the medium was adjusted to 5.6 using 0.1 M KOH. Seeds were stratified at 4°C for two days in darkness before being transferred to a growth chamber maintained at 23°C with a 16-h light/8-h dark photoperiod. Seedlings were grown in a vertical orientation.

2.2 Preparation of treatment conditions

A split-plate system was used to evaluate root responses to different treatments. The upper portion of the plate contained a control medium, while the lower portion contained a treatment medium (prepared with $\frac{1}{2}$ MS medium as a background) to expose only the roots to the treatment. Growth media were prepared using half-strength $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 0.8% (w/v) phytoagar and 1% (w/v) sucrose. Four media conditions were established: control ($\frac{1}{2}$ MS), 100 mM NaCl, 100 mM NaCl with 0.3 mM ATP (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt trihydrate, Abcam AB146525-5G), and 100 mM NaCl with 0.3 mM ADP (Adenosine 5'-diphosphate disodium salt, Sigma-Aldrich, SIG-01897-1G).

2.3 Root system architecture and biomass assessment

Seedlings were germinated on a control medium, stratified in darkness for two days, and subsequently transferred to a growth chamber. Five-day-old seedlings were carefully transferred to treatment plates and grown for an additional eight days. Growth responses were monitored and recorded on Day 1, Day 3, Day 5, and Day 8 post-transfer (DPT). Experiments were conducted in three independent biological replicates, with each treatment consisting of 50 to 55 seedlings. Root systems were imaged using an Epson Perfection V300 Photo scanner at 800 dpi resolution. ImageJ software was used to process and analyse the scanned images. Primary root length was measured, and lateral root density was determined by counting the number of lateral roots divided by the primary root length. Root growth orientation and waviness were analysed to assess spatial responses to treatment conditions. ImageJ was used to quantify lateral displacement and deviation from the vertical axis. In this study, the Horizontal Growth Index (HGI) was defined as the ratio between the horizontal distance covered by the root tip and the total primary root length. Root bending angles were measured relative to the initial growth direction (Wells et al. 2012). Fresh weight of seedlings was recorded at 12 days post-germination using a laboratory analytical balance. Measurements were taken from pooled samples of 8–10 seedlings per replicate to minimize variability.

2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R (version 4.4.2). Data were first tested for normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. For normally distributed data, a one-way ANOVA followed by Tukey's Honest Significant Difference (HSD) post-hoc test was employed. Non-parametric data were analysed using the Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test with a Bonferroni correction for multiple comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$, with 95% confidence intervals applied to all analyses.

3. Results and Discussion

3.1 Effects of different treatments on primary root length

The primary root length of *A. thaliana* was measured to assess the effects of eATP and eADP under high salinity stress. At Day 1 DPT, root lengths across all treatments were comparable, indicating that the treatments had yet to influence root growth. However, from Day 3 to Day 8 DPT, the Control treatment produced significantly longer roots than all other treatments, confirming that salinity stress inhibited root elongation (Figure 1). The reduction in primary root length in NaCl, ADP + NaCl, and ATP + NaCl treatments reflects the inhibitory effects of osmotic stress and ion toxicity on cell elongation and division (Gupta & Huang 2014). Salinity stress reduces the plant's ability to absorb water, directly affecting cell elongation and division, ultimately leading to a lower root growth rate.

By Day 3 and Day 5 DPT, a notable difference emerged between the nucleotide treatments. Seedlings treated with ADP + NaCl had significantly longer roots than those treated with ATP + NaCl. By day 8, exogenous addition of ADP treatment showed significantly longer roots compared to roots grown in ATP+NaCl treatment and NaCl treatment alone (Figure 1). The lack of root recovery in ATP + NaCl treatments likely reflects receptor saturation from endogenous eATP accumulation during salt stress, triggering irreversible growth suppression via P2K1-mediated signalling cascades (Kim et al.

2023). In contrast, ADP's significantly longer roots may stem from its weaker binding to P2K1 and faster hydrolysis, which could transiently interfere with eATP's inhibitory effects without counteracting osmotic and ionic toxicity. In addition, previous studies have reported that eADP does not elicit an intracellular ROS burst, in contrast to eATP (Demidchik et al. 2011). This observation raises the possibility that the elevated intracellular ROS levels induced by eATP could negatively affect root growth, particularly under saline stress. At 100 mM NaCl, the intensity of salinity stress may surpass the threshold at which eADP can promote adaptive morphogenic responses, potentially leading to slightly reduced growth rather than full recovery comparable to the control phenotype. It is also possible that the 0.3 mM eADP concentration was insufficient to influence these pathways under such severe stress conditions.

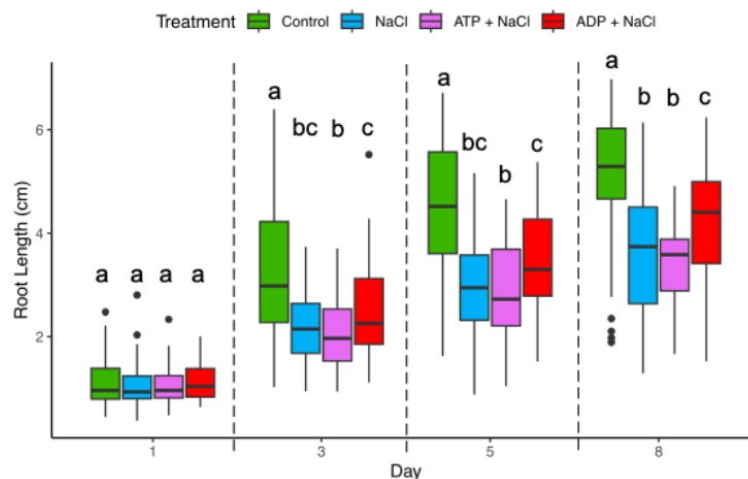


Figure 1. Boxplot of primary root length of *A. thaliana* under four treatments on Day 1 DPT, Day 3 DPT, Day 5 DPT, and Day 8 DPT. Treatments were compared within each post-transfer day. Sample size (N) for each treatment group ranges from 50 to 55 seedlings, depending on the treatment. Different letters (a, b, c) denote a statistically significant difference between treatments for that specific day (Tukey's HSD, $p < 0.05$).

3.2 Effects of different treatments on lateral root density

Salinity stress significantly impacted lateral root density, an effect that was transiently modulated by the application of extracellular ATP (Figure 2). Box plot analysis shows variations in lateral root density of *A. thaliana* under different treatments: Control, NaCl, ATP + NaCl, and ADP + NaCl. Observations were recorded on Days 1, 3, 5, and 8 DPT to assess treatment effects on lateral root development. On day 5 DPT, the ATP + NaCl treatment phenocopied the lateral root formation observed in the Control treatment, indicating that ATP supplementation alleviated the NaCl-induced inhibition of lateral root development. The observed suppression of lateral root density under salinity stress aligns with the well-documented effects of osmotic and ionic stress on root development, as salinity disrupts water uptake and ion homeostasis, leading to inhibited cell division and elongation in root tissues (Wang et al. 2022; Xiao & Zhou 2023). The ability of exogenous ATP to partially rescue lateral root inhibition may be attributed to its role as a DAMP, activating signalling pathways such as ROS and Ca^{2+} signalling that could transiently promote lateral root initiation. (Xiao & Zhou 2023).

However, by Day 8 DPT, this effect was no longer evident, suggesting that prolonged salinity stress overwhelms these adaptive responses. This could be due to receptor desensitization or excessive ROS accumulation, which exacerbates oxidative damage (Xiao & Zhou 2023). The absence of notable differences between ADP + NaCl and NaCl alone highlights ADP's weaker or distinct role in DAMP signalling, likely due to lower receptor binding affinity or faster hydrolysis compared to ATP (Xiao & Zhou 2023). These findings suggest that while eATP has a transient effect on lateral root development under salinity stress, higher concentrations or alternative application strategies may be required to sustain its downstream effects.

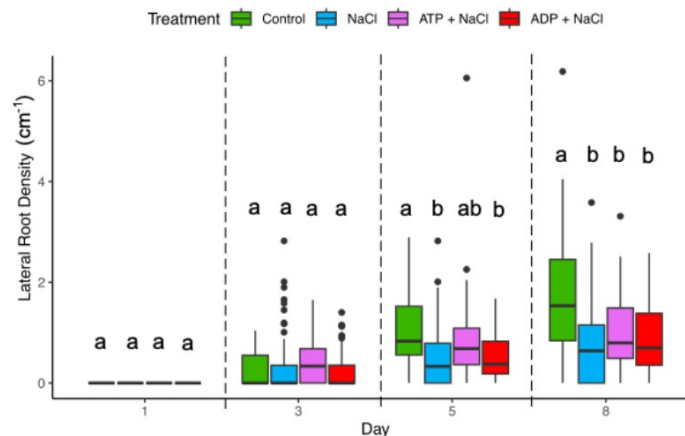


Figure 2. Boxplot of Lateral Root Density of *A. thaliana* under four treatments on Day 1 DPT, Day 3 DPT, Day 5 DPT, and Day 8 DPT. Treatments were compared within each post-transfer day. Sample size (N) for each treatment group ranges from 50 to 55 seedlings, depending on the treatment. Different letters (a, b, c) denote a statistically significant difference between treatments for that specific day (Tukey's HSD, $p < 0.05$).

3.3 Effects of Different Treatments on Waviness

The boxplot in Figure 3 illustrates root waviness, reflecting the linearity of root growth. A waviness value close to 1.0 indicates straighter growth, while lower values suggest wavy development. On Day 1 DPT, no significant difference was observed between Control and NaCl treatments. However, the ATP + NaCl and ADP + NaCl treatments already resulted in significantly wavier roots compared to the NaCl treatment. By Day 3 and Day 5 DPT, ATP + NaCl significantly increased waviness compared to the Control. ADP + NaCl, on the other hand remained significantly similar to the NaCl and Control on Day 3 DPT, indicating a stabilizing effect. On Day 8 DPT, ATP + NaCl treatment produced the waviest roots, but ADP + NaCl showed significantly straighter roots, highlighting its mitigating influence under prolonged stress.

These trends align with DAMP signalling, where extracellular ATP (eATP) amplifies stress responses through ROS and calcium signalling (Sun et al. 2021). This perhaps causes microtubule alignment destabilisation and promotes asymmetric elongation. While NaCl may transiently suppress thigmotropic bending by stabilizing microtubules or modulating redox states, eATP overrides this by mimicking mechanical obstruction, triggering an avoidance-like growth pattern (Ponce et al. 2017; Zhang et al. 2022). Compared to eADP, eATP showed stronger effects, suggesting functional specificity under salinity stress. Consequently, ATP supplementation intensified stress perception and redirected growth priorities toward defense-driven morphological adaptations.

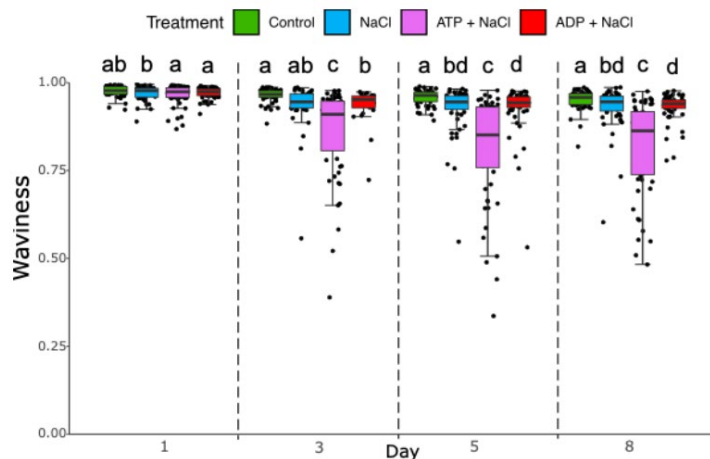


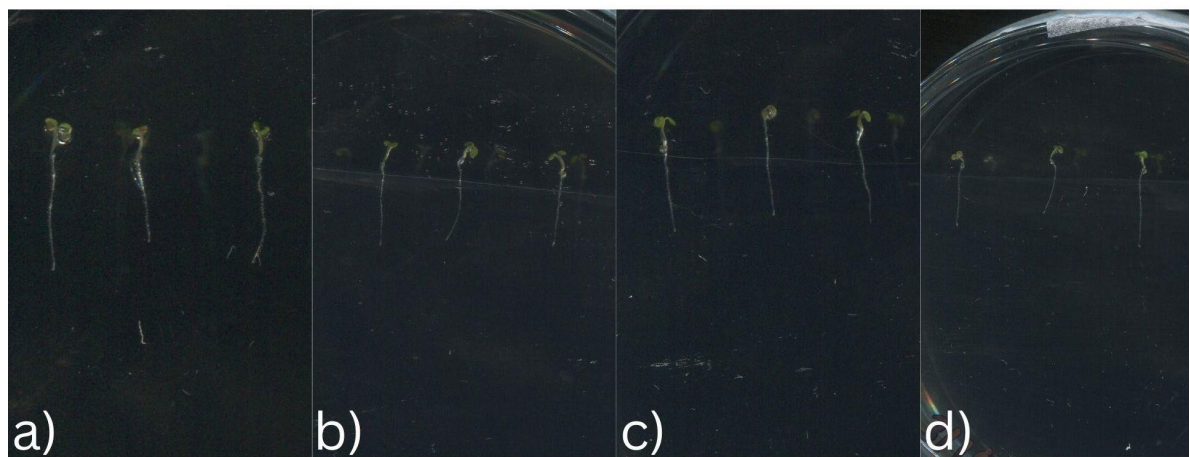
Figure 3. Boxplot of Waviness of *A. thaliana* under four treatments on Day 1 DPT, Day 3 DPT, Day 5 DPT, and Day 8 DPT. Treatments were compared within each post-transfer day. Sample size (N) for each treatment group ranges from 50 to 55 seedlings, depending on the treatment. Different letters (a, b, c) denote a statistically significant difference between treatments for that specific day (Tukey's HSD, $p < 0.05$).

3.4 Effects of different treatments on degree of skewness and horizontal growth index (HGI)

This study investigates root skewness under salinity stress using the Horizontal Growth Index (HGI) value, which quantifies root deviation from downward growth. Positive values indicate rightward movement, while negative values reflect leftward deviation. Figure 4 shows the representative images of skewed growth of roots grown in saline conditions and in the presence of nucleotide treatments compared to the control. Box plot analyses show that control roots maintained stable growth across all time points, with consistently positive values of HGI close to 0.0 and a minimal degree of skewness (Figure 5a, b), highlighting their undisturbed gravitropic response. By Day 1 DPT, salinity stress alone or with either exogenous ATP or ADP caused a slight leftward movement compared to the control. However, ATP and ADP with salinity significantly reduced skewness compared to salinity alone (Figure 5a), indicating partial mitigation of growth asymmetry (Tanaka et al. 2014). By Day 3 DPT, the destabilizing effect of salinity intensified, showing significantly pronounced skewness in NaCl treatment compared to control and treatment containing ATP and ADP (Figure 5a). By Day 5 DPT and Day 8 DPT, both ATP and ADP reduced this deviation, but ADP with salinity had a significantly stronger stabilizing effect, aligning HGI values and degree of skewness closer to the control (Figure 5). Salinity treatment and ATP with salinity treatment exhibited further skewing, while ADP with salinity consistently mitigated leftward movement, achieving values between salinity alone and the control.

These findings suggest a DAMP signalling mechanism regulating root responses under salinity stress. While both ATP and ADP modulate stress pathways, ADP more effectively stabilizes gravitropism, likely by regulating calcium signalling or cytoskeletal dynamics, which are critical for root reorientation (Singh et al. 2017). Unlike ATP, which can amplify stress signals through prolonged extracellular ATP-induced oxidative bursts, ADP appears to enhance cellular resilience, preserving root growth symmetry under salinity (Tanaka et al. 2014). In summary, salinity stress disrupts gravitropism by inducing leftward skewness, but ADP counters this effect potentially through signalling pathways that stabilize root growth. The limited efficacy of ATP suggests distinct roles for nucleotide derivatives in stress responses, with ADP potentially modulating gravitropic precision under salinity stress. These insights improve current understanding of how plants utilise molecular signalling to balance stress survival with developmental progress.

Day1



Day 8

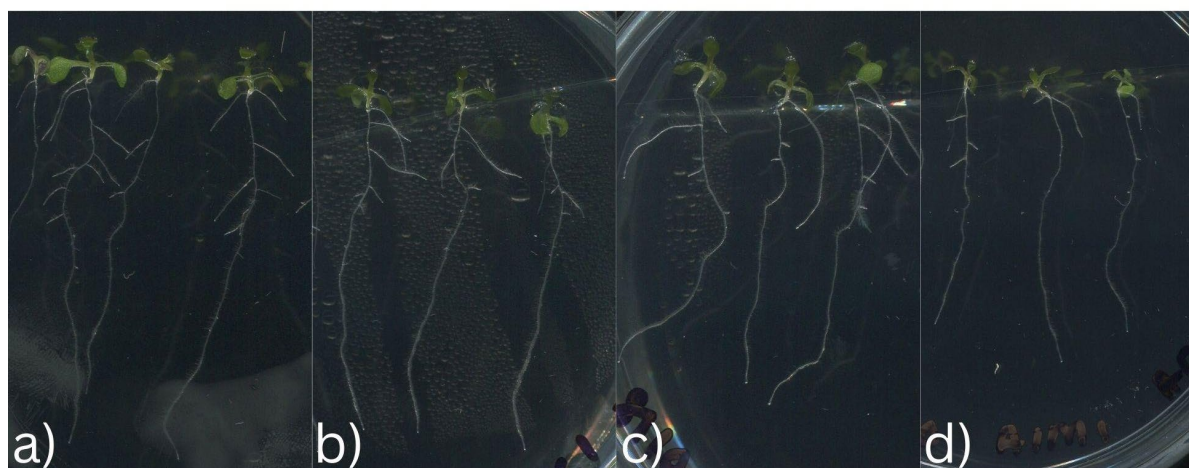


Figure 4. Representative seedlings on Day 1 and Day 8 DPT under different treatments: (a) Control, (b) NaCl, (c) ATP + NaCl, and (d) ADP + NaCl.

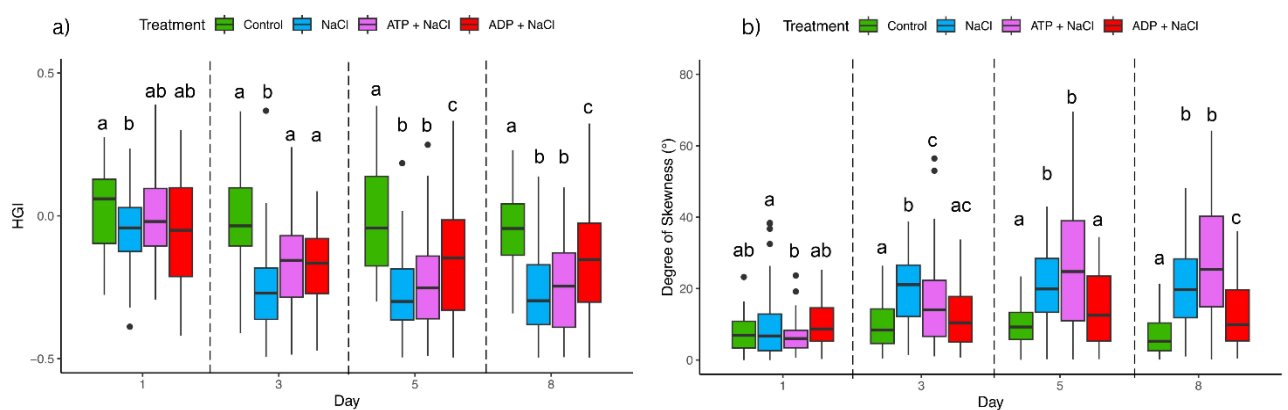


Figure 5. Boxplot of HGI (a) and Degree of Skewness (b) of *A. thaliana* under four treatments on Day 1 DPT, Day 3 DPT, Day 5 DPT, and Day 8 DPT. Comparisons were made within each treatment only, not across different days. Sample size (N) for each treatment group ranges from 50 to 55 seedlings, depending on the treatment. Different letters (a, b, c) denote a statistically significant difference between treatments for that specific day (Tukey's HSD, $p < 0.05$).

3.5 Effects of different treatments on fresh weight

The overall fresh weight of seedlings was assessed on Day 12 to determine the cumulative impact of the treatments on biomass (Figure 6). While there were no statistically significant differences among the treatments (ANOVA, $p > 0.05$), clear trends were observed. As expected, the median fresh weight of seedlings under NaCl stress was lower than that of the untreated Control. Notably, both ATP+NaCl and ADP+NaCl treatments exhibited a trend towards biomass recovery, with median fresh weights intermediate between the NaCl and Control groups. The high variance observed within all treatment groups may have precluded the detection of statistically significant differences. These findings suggest that while the nucleotide treatments did not fully rescue the biomass phenotype under these conditions, they may partially mitigate the severe growth inhibition caused by salinity.

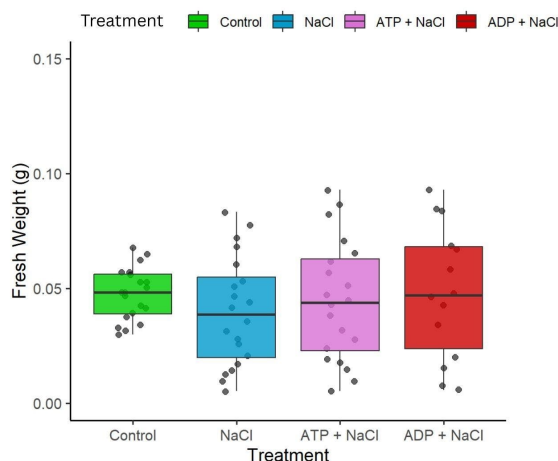


Figure 6: Boxplot of Fresh Weight by Treatment after 12 days of *A. thaliana*. Sample size (N) for each treatment group ranges from 50 to 55 seedlings, depending on the treatment.

4. Conclusion

This study examines the effects of extracellular ATP and ADP on *A. thaliana* root growth and architecture under salinity stress. Results show that salinity significantly alters root curvature and growth dynamics. NaCl treatment induced root morphological changes, including increased root curvature. ATP application helped mitigate salinity stress by enhancing lateral root density, while ADP showed significant improvement of primary root growth and protective effects, as seen in differences in root length and root curvature compared to NaCl alone. However, eATP and eADP did not significantly affect seedling fresh weight. Despite this, their role in plant signalling and growth regulation remains important. Future studies should investigate the downstream events following cytosolic Ca^{2+} ion release, particularly the differential effects of eATP and eADP on plant cytoskeletal dynamics that differentiate the stabilizing effects of ADP from ATP.

Acknowledgements

Research reported in this publication was supported by Universiti Kebangsaan Malaysia, Geran Galakan Penyelidik Muda (GGPM-2024-074). A heartfelt appreciation is extended to Behn Meyer Agricare (M) Sdn Bhd for their generous sponsorship, which played a crucial role in the success of this project. Additionally, the authors would like to express sincere gratitude to Dr. Nurulhikma Md Isa from Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) for her invaluable contribution to this research, particularly for providing the Col-0 seeds, which were essential for this study.

References

- Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., Lee, S. Y. & Stacey, G. 2014. Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science* 343(6168): 290–4.
- Demidchik, V., Shang, Z., Shin, R., Colaço, R., Laohavisit, A., Shabala, S. & Davies, J. M. 2011. Receptor-like activity evoked by extracellular adp in arabidopsis root epidermal plasma membrane. *Plant Physiology* 156(3): 1375–1385.
- Hultgren, A., Carleton, T., Delgado, M., Gergel, D. R., Greenstone, M., Houser, T., Hsiang, S., et al. 2025. Impacts of climate change on global agriculture accounting for adaptation. *Nature* 642(8068): 644–652. doi:10.1038/s41586-025-09085-w
- Kim, D., Yanders, S. & Stacey, G. 2023, November 1. Salt stress releases extracellular ATP to activate purinergic signaling and inhibit plant growth. *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists.
- Munns, R. & Tester, M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59(1): 651–681.
- Myers, R. J., Fichman, Y., Stacey, G. & Mittler, R. 2022. Extracellular ATP plays an important role in systemic wound response activation. *Plant Physiology* 189(3): 1314–1325.
- Pham, A. Q., Cho, S. H., Nguyen, C. T. & Stacey, G. 2020. Arabidopsis lectin receptor kinase P2K2 is a second plant receptor for extracellular atp and contributes to innate immunity. *Plant Physiology* 183(3): 1364–1375.
- Ponce, G., Corkidi, G., Eapen, D., Lledías, F., Cárdenas, L. & Cassab, G. 2017. Root hydrotropism and thigmotropism in *Arabidopsis thaliana* are differentially controlled by redox status. *Plant Signaling and Behavior* 12(4).
- Singh, M., Gupta, A. & Laxmi, A. 2017, July 27. Striking the right chord: Signaling enigma during root gravitropism. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.
- Sowders, J. M., Jewell, J. B., Tripathi, D. & Tanaka, K. 2023. The intrinsically disordered C-terminus of purinoceptor P2K1 fine-tunes plant responses to extracellular ATP. *FEBS Letters* 597(16): 2059–2071.
- Sun, J., Ning, Y., Wang, L., Wilkins, K. A. & Davies, J. M. 2021. Damage signaling by extracellular nucleotides: a role for cyclic nucleotides in elevating cytosolic free calcium? *Frontiers in Plant Science* 12.
- Tripathi, D., Zhang, T., Koo, A. J., Stacey, G. & Tanaka, K. 2018. Extracellular ATP acts on jasmonate signaling to reinforce plant defense. *Plant Physiology* 176(1): 511–523.
- Wang, C. F., Han, G. L., Yang, Z. R., Li, Y. X. & Wang, B. S. 2022, April 7. Plant Salinity Sensors: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.
- Wells, D. M., French, A. P., Naeem, A., Ishaq, O., Traini, R., Hijazi, H., Bennett, M. J., et al. 2012. Recovering the dynamics of root growth and development using novel image acquisition and analysis methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1595): 1517–1524.
- Xiao, F. & Zhou, H. 2023, January 6. Plant salt response: Perception, signaling, and tolerance. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.
- Zhang, Z., van Ophem, D., Chelakkot, R., Lazarovitch, N. & Regev, I. 2022. A mechano-sensing mechanism for waving in plant roots. *Scientific Reports* 12(1).

Ecotoxicological Impact of Sunscreen-Derived Titanium Dioxide (TiO₂) on the Loss of Symbiotic Algae of *Anemonia majano*

(Kesan Ekotoksikologi Titanium Dioksida (TiO₂) daripada Krim Pelindung Matahari
terhadap Kehilangan Alga Simbiotik *Anemonia majano*)

Siti Nuraisyah Zailani¹, Suriyanti Su Nyun Pau^{2,3} & Herryawan Ryadi Eziwar
Dyari^{2,3,*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti
Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²Department of Earth Sciences and Environment, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan
Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

³Marine Ecosystem Research Centre, The Centre for Natural and Physical Laboratory Management,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 86800 Mersing, Johor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: herry@ukm.edu.my

Abstract: Coral reefs rely on symbiosis between cnidarians and zooxanthellae, yet this relationship is increasingly disrupted by pollutants such as titanium dioxide (TiO₂), a common sunscreen ingredient. This study aimed to investigate the bleaching response of *Anemonia majano* under TiO₂ exposure while confirming the taxonomic identity of its zooxanthellae. Genomic DNA was extracted using the CTAB method, and the internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with Miseq-ITSintfor2 and ITS2-reverse primers. Gel electrophoresis confirmed a 338 bp amplicon, and sequencing identified the zooxanthellae as *Cladocopium* sp. C1 with 97.61% identity. Phylogenetic analysis using MUSCLE alignment and Maximum Likelihood (ML) supported this classification. To evaluate bleaching, *A. majano* was exposed to TiO₂ concentrations of 0, 0.75, 1.5, and 2.25 mg/ml for 96 hours. RGB values obtained through image analysis increased with TiO₂ concentration, reflecting tissue bleaching severity. Zooxanthellae count revealed that the 1.5 mg/ml treatment produced the highest expulsion rate (7.04×10^4 cells/ml), exceeding even the 2.25 mg/ml treatment. This non-linear response suggests that moderate stress levels induce active zooxanthellae expulsion, whereas higher concentrations may suppress host responses through tissue damage or mucus trapping. These results highlight the complex, non-linear effects of TiO₂ exposure on cnidarian symbiosis and bleaching. Overall, the study underscores the ecotoxic effects of TiO₂, highlighting its potential to cause coral reef bleaching.

Keywords: Titanium dioxide; zooxanthellae; coral bleaching; ecotoxic effect

Abstrak: Terumbu karang bergantung kepada simbiosis antara cnidaria dan zooxanthellae, namun hubungan ini semakin tergugat oleh pencemar seperti titanium dioksida (TiO₂), iaitu bahan asas dalam krim pelindung matahari. Kajian ini bertujuan untuk menyelidik tindak balas pelunturan *Anemonia majano* apabila terdedah kepada TiO₂ serta mengesahkan identiti zooxanthellae. DNA genomik telah diekstrak menggunakan kaedah CTAB, dan kawasan *internal transcribed spacer* (ITS) digandakan dengan primer Miseq-ITSintfor2 dan ITS2-reverse. Elektroforesis gel mengesahkan amplicon bersaiz 338 bp, dan penjujukan mengenal pasti zooxanthellae tersebut sebagai *Cladocopium* sp. C1 dengan tahap kesamaan 97.61%. Analisis filogenetik menggunakan penjajaran MUSCLE dan Maximum Likelihood (ML) menyokong pengelasan ini. Untuk menilai kelunturan, *A. majano* didedahkan kepada kepekatan TiO₂ sebanyak 0, 0.75, 1.5, dan 2.25 mg/ml selama 96 jam. Nilai RGB yang diperoleh melalui analisis imej meningkat dengan kepekatan TiO₂, mencerminkan tahap kelunturan tisu. Kiraan zooxanthellae menunjukkan bahawa rawatan 1.5 mg/ml menghasilkan kadar pengeluaran zooxanthellae tertinggi (7.04×10^4 sel/ml), melebihi rawatan 2.25 mg/ml. Tindak balas bukan linear ini mencadangkan bahawa tahap tekanan sederhana merangsang pengeluaran zooxanthellae secara aktif, manakala kepekatan lebih tinggi mungkin menekan tindak balas perumah melalui kerosakan tisu atau perangkap mukus. Hasil ini menonjolkan kesan kompleks dan tidak linear pendedahan TiO₂ terhadap simbiosis cnidaria dan kelunturan. Secara keseluruhan, kajian ini fokus terhadap kesan ekotoksik TiO₂, yang berpotensi menyebabkan kelunturan terumbu karang.

Kata kunci: Titanium dioksida; zooxanthellae; kelunturan karang; kesan ekotoksik

1. Introduction

Coral reefs are among the most productive and biodiverse ecosystems on Earth, supporting critical services such as coastal protection, fisheries, and global carbon cycling. Despite their importance, reefs are under increasing threat from anthropogenic stressors including climate change, pollution, and overfishing (Hughes et al. 2017). In addition to these global pressures, local stressors such as sunscreen pollution have gained attention in recent years. Ultraviolet (UV) filters contained in sunscreens, including inorganic compounds such as titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles, are widely detected in coastal waters frequented by tourists (Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez 2015). These compounds can accumulate in marine organisms, generate reactive oxygen species (ROS), and disrupt the delicate symbiosis between corals and their dinoflagellate symbionts, leading to bleaching (Corinaldesi et al. 2021).

To investigate these ecotoxic effects, laboratory models that replicate coral–algal symbiosis are invaluable. *Anemonia majano* serves as a practical and ecologically relevant model organism because it shares a fundamental symbiotic relationship with photosynthetic zooxanthellae, similar to reef-building corals. Unlike coral polyps, *A. majano* is relatively large, simple in anatomy, and easy to maintain under laboratory conditions, making it suitable for non-lethal sampling and continuous monitoring of bleaching responses. In this study, *A. majano* was exposed to increasing concentrations of TiO₂ to examine its effects on bleaching, quantified using both RGB image analysis as a proxy for color loss and zooxanthellae counts as a measure of symbiont expulsion. This integrated approach provides insight into the mechanisms of TiO₂-induced bleaching and emphasizes the broader ecotoxicological risks that sunscreen ingredients pose to coral reef ecosystems.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling location

Anemonia majano samples were collected from the waters of Tanjung Biru, Port Dickson. The samples then acclimated in an aquarium containing artificial seawater (35 ppt) for 24 hours. Salinity was verified using a refractometer.

2.2 DNA extraction using CTAB

The samples were then cryogenically ground in a mortar with liquid nitrogen until a fine powder was obtained for DNA extraction and stored at –20°C in 1.5-ml centrifuge tubes until further analysis. The crushed *Anemonia majano* tissue was placed in 1.5 ml centrifuge tubes with 500 µl CTAB buffer, vortexed, and incubated at 60°C for 30 minutes. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes, the supernatant was transferred and extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol. This process was repeated until the upper phase was clear. DNA was precipitated with cold isopropanol at - 20°C overnight, then centrifuged, cleaned with ethanol, and dried. The DNA pellet was finally dissolved in 50 µl TE buffer.

2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR for the ITS2 sequence (~320 bp) was performed using the primers ITS intfor2 and ITS2-Reverse on the Illumina MiSeq platform. The PCR process included three main steps: denaturation, annealing, and extension. The PCR mixture (25 µL) consisted of 12.5 µL 2×Taq Master Mix, 0.5 µL primers, 1 µL DNA template (114 ng/µL), and 10.5 µL dH₂O. The PCR cycle involved an initial denaturation (94°C, 5 minutes), followed by 30 cycles (94°C, 30 seconds; 52°C, 30 seconds; 72°C, 30 seconds), and a final extension (72°C, 5 minutes). PCR products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis at 90 V for 60 minutes.

2.4 Sequencing Data Analysis

DNA sequences were manually aligned using BioEdit and compared to a DNA database through BLASTn. Phylogenetic relationships were visualized using MEGA 11, with bootstrapping analysis of 1000 replications using the Maximum Likelihood (ML) method based on the Kimura-2-parameter model.

2.5 Effects of TiO₂ on *Anemonia Majano*

Artificial seawater (150 ml, 35 ppt) was prepared using commercial artificial salt (Aquaforest, Poland). A titanium dioxide (TiO₂) stock solution (0.9 mg/ml) was prepared by dissolving 0.09 g of TiO₂ in 100 ml of artificial seawater. From this stock, three working solutions were prepared at final concentrations of 0.75 mg/ml, 1.5 mg/ml, and 2.25 mg/ml, each in 20 ml. Seawater without TiO₂ was used as control. Each treatment was performed with three biological replicates, and the mean values were used for analysis.

2.6 RGB Colour Analysis

RGB data were analyzed using ImageJ software from images taken over four points (24 h, 48 h, 72 h, and 96 h). The TiO₂ treatments (0.75 mg/ml, 1.5 mg/ml, and 2.25 mg/ml) influenced both the release of zooxanthellae and the degree of color bleaching, as reflected by changes in RGB values obtained through image analysis.

2.7 Zooxanthellae Counting

Expelled zooxanthellae were counted on day four (96 h) using a Sedgewick Rafter chamber with a fixed volume of 1 ml. Samples from each TiO₂ treatment (0.75 mg/ml, 1.5 mg/ml, and 2.25 mg/ml) as well as the control were examined under a microscope, and zooxanthellae were enumerated within defined grids of the chamber. Each treatment was performed with three biological replicates, and mean values were used for analysis.

2.8 Statistical Analysis

RGB values and zooxanthellae counts were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) to test for differences among treatment groups. All statistical analyses were performed using Microsoft Excel, with significance determined at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Molecular identification of zooxanthellae from *Anemone majano*

Genomic DNA from *Anemonia majano* was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method to maximize purity and yield from its mucosal tissues and symbiont-rich cells, a challenge often encountered in anemone DNA isolation (Pinto et al. 2000). The extracted DNA was assessed for purity and concentration using spectrophotometry before proceeding to PCR amplification. The internal transcribed spacer (ITS) region (~300–400 bp) was amplified using the Miseq-ITSintfor2 and ITS2-reverse primers, targeting zooxanthellae-specific ribosomal sequences. Successful amplification was confirmed by gel electrophoresis via the presence of a single 338 bp band; negative controls validated contamination-free results. Sequencing of the PCR products followed, and BLAST analysis matched the symbiont DNA to *Cladocopium* sp. C1 with 97.61% identity (Figure 1), confirming its taxonomic affiliation. Sequence alignment was done using MUSCLE, and a phylogenetic tree was constructed via Maximum Likelihood analysis under the Kimura-2-parameter model, with 1,000 bootstrap replicates to assess support and reliability of the inferred relationships.

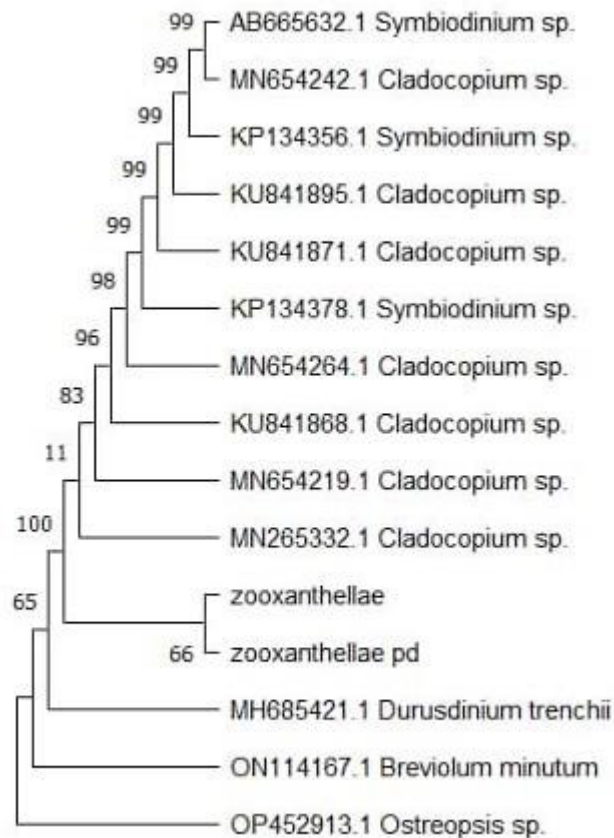


Figure 1. Phylogenetic tree of zooxanthellae from *Anemonia majano* based on ITS sequences, constructed using the Maximum Likelihood method with the Kimura 2-parameter model.

3.2 Effect of TiO_2 on *Anemonia majano* bleaching

TiO_2 concentration significantly influenced the average red, green, and blue (RGB) values at each time point. The control group consistently recorded the lowest RGB values, whereas the 2.25 mg/ml treatment showed the highest, indicating the most pronounced color bleaching compared to the control and other concentrations. Over the 96-hour period, TiO_2 continued to impact RGB values, with the control group displaying an initial increase followed by a decline after 72 hours (Figure 2).

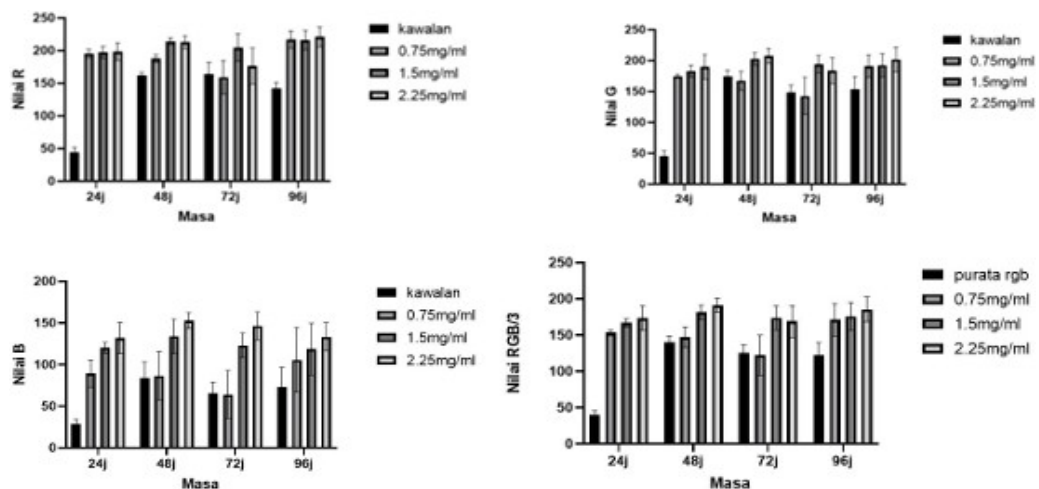


Figure 2. Mean RGB values of *Anemonia majano* exposed to TiO_2 concentrations (0, 0.75, 1.5, and 2.25 mg/mL) at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h. Values represent mean $\pm$ SD ($n = 3$). Increased RGB values indicate higher tissue brightness and bleaching.

These RGB shifts reflect symbiotic breakdown and pigment loss during bleaching. Higher RGB values correlate with reduced symbiont density and chlorophyll content, making color brightness a reliable proxy for bleaching severity. In fact, studies have demonstrated a strong linear relationship between the Red Index and symbiont cell density (R^2 up to 0.97), confirming the utility of RGB metrics for non-invasive bleaching quantification. Additionally, the development of RGB-based color scoring systems, originally used in field surveys, supports the notion that color changes closely mirror symbiont loss (Siebeck et al. 2006).

Using RGB image data thus allows us to monitor bleaching dynamics quantitatively and continuously. This method is especially valuable in laboratory studies of *A. majano*, where direct observation of bleaching over time is feasible and can be linked to specific stressor concentrations like TiO_2 .

3.3 Effect of TiO_2 on zooxanthellae expelled from *Anemonia majano*

Zooxanthellae count (Figure 3) showed significant differences among TiO_2 treatments, with the control group recording the lowest value (875 cells/ml). The 1.5 mg/ml treatment produced the highest expulsion rate (7.04×10^4 cells/ml), although with considerable variation, while the 0.75 mg/ml and 2.25 mg/ml treatments showed lower and inconsistent responses. Thus, 1.5 mg/ml appears to be the optimal concentration for observing symbiont expulsion in this study.

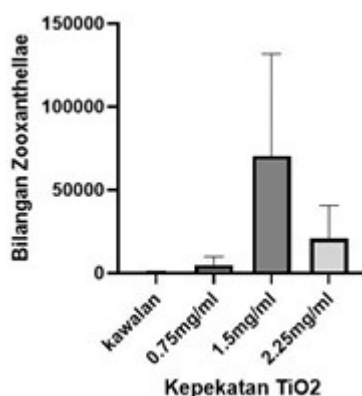


Figure 3. Zooxanthellae expelled (cells/mL) from *Anemonia majano* after 96 h exposure to TiO_2 concentrations (0, 0.75, 1.5, and 2.25 mg/mL). Bars represent mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Interestingly, the 1.5 mg/ml TiO_2 treatment resulted in higher levels of zooxanthellae expulsion compared to the 2.25 mg/ml treatment. This non-linear response suggests that symbiont loss does not necessarily increase in proportion to pollutant concentration. Instead, biological stress often follows a threshold or hormetic pattern. At moderate stress levels, such as 1.5 mg/ml, the host anemones may activate physiological processes that actively expel symbionts, including cytoskeletal rearrangements and apoptosis pathways. These stress-induced cellular responses can increase measurable symbiont release into the surrounding water. However, at higher stress levels (2.25 mg/ml), damage may surpass the host's ability to mount an active response, resulting in symbiont death within tissues rather than expulsion (Iavicoli et al. 2018). This non-linear stress biology provides a plausible explanation for the peak expulsion observed at 1.5 mg/ml.

Behavioral differences also likely contributed to the reduced expulsion at higher concentrations. At 2.25 mg/ml, anemones exhibited stronger mucus production and polyp contraction in response to elevated particle loads. These behaviors can trap both particles and symbionts within mucus layers or prevent release by closing tissue surfaces, thereby reducing the number of symbionts detected in the water column (Wild et al. 2004). Thus, while higher concentration imposed greater stress, the associated behavioral defenses may have masked its effect in terms of measurable expulsion.

Together, these findings highlight that pollutant effects are not always linearly dose-dependent, and that both physiological stress thresholds and organismal behaviors shape the ecological outcomes of nanoparticle exposure. However, it is important to acknowledge the limitations of

using *A. majano* as a coral model. While it shares the fundamental cnidarian–algal symbiosis with reef-building corals, it lacks the calcified skeleton and colony-level interactions that define true corals. As such, bleaching dynamics in *A. majano* may not fully replicate the ecological complexity or structural consequences observed in coral reef ecosystems. Therefore, results from this study should be interpreted as a simplified but informative proxy for understanding TiO₂-induced stress in coral–algal symbiosis, rather than a complete substitute for coral-based studies.

4. Conclusion

This study demonstrates that *Anemonia majano* is a reliable model for investigating coral bleaching and symbiont responses under titanium dioxide (TiO₂) exposure. Molecular identification confirmed the presence of *Cladocopium* sp. C1 as the dominant symbiont, aligning with common coral–algae associations. TiO₂ exposure caused measurable bleaching, reflected by increased RGB values and reduced symbiont density, with the 1.5 mg/ml treatment producing the highest zooxanthellae expulsion. Interestingly, higher concentrations (2.25 mg/ml) did not proportionally increase expulsion, suggesting a non-linear stress response influenced by both physiological thresholds and behavioral defenses such as mucus trapping. Overall, these findings highlight that TiO₂ pollution effects on cnidarian symbiosis are dose-dependent but not linear, underscoring the importance of considering sublethal stress levels in ecotoxicological assessments. Importantly, the results reinforce concerns that TiO₂ from sunscreen products poses an ecotoxic threat to coral reef ecosystems by disrupting symbiosis and accelerating bleaching processes.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the Malaysia Ministry of Higher Education for providing financial support, as well as to Universiti Kebangsaan Malaysia for providing the necessary facilities throughout the research process. This work was funded by the Ministry of Higher Education, Malaysia's Fundamental Research Grant Scheme (Grant number: FRGS/1/2019/WAB09/UKM/02/3).

References

- Corinaldesi, C., Marcellini, F., Nepote, E., Damiani, E., & Danovaro, R. 2021. Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals. *Science of The Total Environment* 755:142590.
- Hughes, T. P., et al. 2017. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* 543(7645): 373–377.
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., & Calabrese, E. J. 2018. Nanoparticle exposure and hormetic dose–responses: an update. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Pinto, S. M., Fernandes-Matioli, F. M. C., & Schlenz, E. 2000. DNA extraction from sea anemone (Cnidaria: Actiniaria) tissues for molecular analyses. *Genetics and Molecular Biology* 23(3)
- Sánchez-Quiles, D., & Tovar-Sánchez, A. 2015. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? *Environment International* 83:158–170.
- Siebeck, U. E., Marshall, N. J., & Klüter, A. 2006. Monitoring coral bleaching using a colour reference card. *Coral Reefs* 25: 249–254.
- Wild, C., Huettel, M., Klüeter, A., Kremb, S. G., Rasheed, M. Y., & Jørgensen, B. B. 2004. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature* 428: 66–70.

Intervensi Fitoterapeutik *Moringa oleifera* dan *Nigella sativa* Terhadap Parameter Kesuburan Tikus Jantan Aruhan Obesiti

(Phytotherapeutic Intervention of *Moringa oleifera* and *Nigella sativa* on Fertility Parameters of
Obesity-Induced Male Rats)

Nur Amilyn Batrisyia Raffi, Farah Najihah Ismail & Mahanem Mat Noor*

Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor, Malaysia

* e-mail of corresponding author: mahanem@ukm.edu.my

Abstrak: Obesiti ditakrifkan sebagai pengumpulan lemak tidak normal dan berlebihan, yang boleh mendatangkan risiko kepada kesihatan. Obesiti mempunyai kesan negatif pada sistem tubuh, termasuk kesihatan reproduktif. Kajian ini memfokuskan sifat antioksidan *Moringa oleifera* dan *Nigella sativa* dalam mengurangkan tekanan oksidatif dan meningkatkan parameter kesuburan tikus jantan yang diaruh obesiti. Kajian ini menggunakan 36 ekor tikus jantan Sprague Dawley (250g-350g) yang diaruh obesiti melalui pemberian makanan diet tinggi lemak selama 45 hari bagi mengkaji potensi terapeutik *M. oleifera* (MO) dan *N. sativa* (NS) dalam merawat masalah ketidaksuburan yang berlaku disebabkan oleh obesiti. Kesemua kumpulan kawalan dan rawatan, kecuali kumpulan kawalan normal menerima diet tinggi lemak sehingga mencapai Indeks Lee melebihi 310. Kajian diteruskan dengan pemberian ekstrak akues *M. oleifera* pada dos 400mg/kg/hari (MO400) dan minyak *N. sativa* pada dos 200 mg/kg/hari (NS200) bagi tikus kumpulan rawatan selama 35 hari untuk melihat keberkesanan herba ini dalam meningkatkan aktiviti enzim antioksidan testis (glutathione tereduksi/GSH) yang penting dalam melindungi sel sperma daripada tekanan oksidatif. Analisis tekanan oksidatif mencatatkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) terhadap peningkatan aktiviti enzim glutathione tereduksi dalam kumpulan rawatan individu *M. oleifera* dan *N. sativa* apabila dibandingkan dengan kesemua kumpulan kawalan. Bagi analisis parameter kesuburan, bilangan sperma dan pembengkakan hipoosmotik yang tinggi dicatatkan dalam kumpulan rawatan *N. sativa*. Secara keseluruhan, berbanding kumpulan lain, rawatan minyak *N. sativa* didapati mampu memberikan kesan positif terhadap parameter kesuburan melalui peningkatan aktiviti antioksidan pada tikus aruhan obesiti.

Kata kunci: *Moringa oleifera*; *Nigella sativa*; tekanan oksidatif; pembengkakan hipo-osmotik

Abstract: Obesity is defined as the abnormal and excessive accumulation of fat, which poses significant health risks. It has negative effects on various physiological systems, including reproductive health. This study explores the antioxidant properties of *Moringa oleifera* and *Nigella sativa* in reducing oxidative stress and improving fertility parameters in obesity-induced male rats. A total of 36 male Sprague Dawley rats (250g–350g) were induced with obesity through a high-fat diet for 45 days to evaluate the therapeutic potential of *M. oleifera* (MO) and *N. sativa* (NS) in addressing obesity-related infertility. All control and treatment groups, except the normal control group, received a high-fat diet until they reached a Lee Index exceeding 310. The study then proceeded with the administration of aqueous extract of *M. oleifera* at a dose of 400 mg/kg/day (MO400) and *N. sativa* oil at a dose of 200 mg/kg/day (NS200) to the treatment groups for 35 days. The primary objective was to assess the effectiveness of these herbs in enhancing testicular antioxidant enzyme activity, specifically reduced glutathione (GSH), which plays a crucial role in protecting sperm cells from oxidative stress. Oxidative stress analysis revealed a significant increase ($p < 0.05$) in reduced glutathione enzyme activity in the *M. oleifera* and *N. sativa* treatment groups compared to all control groups. Additionally, sperm count and hypo-osmotic swelling were notably higher in the *N. sativa* treatment group. Overall, *N. sativa* oil treatment demonstrated superior effectiveness in improving fertility parameters, primarily by enhancing antioxidant activity in obesity-induced male rats.

Keywords: *Moringa oleifera*; *Nigella sativa*; oxidative stress; hypo-osmotic swelling

1. Pengenalan

Menurut Pertubuhan Kesihatan Dunia (WHO), ketidaksuburan ditakrifkan sebagai ketiadaan konsepsi selepas satu tahun persetubuhan tanpa perlindungan (Wahab 2023). Ketidaksuburan menjejaskan 186 juta orang di seluruh dunia, dan pasangan lelaki adalah punca dalam kira-kira 50% daripada kes ketidaksuburan (Inhorn & Patrizio 2015). Pada zaman pra-industri, rata-rata wanita dijangkakan untuk mempunyai antara lima sehingga sepuluh anak sepanjang hayat mereka, bagaimanapun, permulaan peralihan demografi kemudian menyaksikan kadar kesuburan menurun dengan ketara (O'Neil 2024). Kadar kelahiran di Malaysia juga telah menunjukkan trend menurun sejak 40 tahun lalu. Data analisis kualiti sperma oleh Lembaga Penduduk dan Pembangunan Keluarga Negara (LPPKN) mendapati berlaku 60% kes sperma yang dihasilkan adalah tidak normal (Yaacob 2023). Ketidaksuburan lelaki boleh disebabkan oleh bilangan sperma yang rendah, fungsi sperma yang tidak normal atau penyumbatan salur pembiakan yang menghalang pelepasan sperma semasa ejakulasi (Ismail 2014).

Obesiti merupakan salah satu faktor yang menyumbang kepada ketidaksuburan lelaki. Obesiti boleh menjejaskan kesuburan dalam beberapa cara, termasuk memberi kesan langsung kepada sperma itu sendiri melalui penghasilan tekanan oksidatif yang mengakibatkan kerosakan DNA sperma, serta melalui pengurangan hormon pembiakan (Pruthi 2022). Kajian terdahulu membuktikan tekanan oksidatif yang dicirikan oleh ketidakseimbangan antara pengeluaran Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dan sistem pertahanan antioksidan merupakan salah satu faktor yang menyumbang kepada ketidaksuburan lelaki (Mannucci et al. 2022). Tekanan oksidatif membawa kepada gangguan isyarat dan kawalan redoks dan kerosakan molekul (Li et al. 2023). Tekanan oksidatif juga menyebabkan kerosakan kepada DNA mitokondria nuklear, serta mempengaruhi epigenom sperma, yang mengakibatkan ketidaksuburan, keguguran berulang, hasil kehamilan yang kurang baik, dan peningkatan beban penyakit pada keturunan (Bisht et al. 2017). Ketidaksuburan dalam kalangan lelaki obes juga boleh disebabkan oleh masalah kestabilan dan integriti membran plasma sperma. Obesiti menyebabkan peningkatan tekanan oksidatif yang memberi kesan buruk kepada struktur membran plasma dan fungsi keseluruhan sperma. Sistem pembiakan lelaki sangat rentan terhadap tekanan oksidatif disebabkan oleh komposisinya yang unik dan proses fisiologi, maka spermatozoa sangat mudah terjejas dengan tekanan oksidatif, kerana ia memiliki mekanisme ketahanan antioksidan yang terhad (Walke et al. 2023).

Untuk mengatasi masalah obesiti yang mendorong kepada ketidaksuburan dalam kalangan lelaki, ini sudah semestinya akan menelan kos yang tinggi. Ini membawa kepada peningkatan usaha dan penerokaan dalam mencari pendekatan alternatif selain daripada mendapatkan rawatan konvensional, antaranya adalah dengan penggunaan herba tradisional. *Moringa oleifera* adalah tumbuhan yang menawarkan pelbagai manfaat terhadap kesihatan. Terdapat beberapa manfaat *M. oleifera* yang telah dibuktikan secara saintifik (Arnarson 2018). Antaranya, *M. oleifera* adalah kaya dengan antioksidan yang boleh bertindak ke atas radikal bebas di dalam badan. Radikal bebas yang tinggi di dalam badan boleh mengakibatkan tekanan oksidatif, oleh itu, antioksidan telah terbukti dapat meningkatkan kualiti sperma dan telur dengan melindungi sel, mitokondria dan DNA daripada tekanan oksidatif. *M.oleifera* juga terbukti sebagai agen anti-obesiti dimana boleh menghalang pengumpulan lemak badan dan mempercepatkan pemecahan lemak badan. Selain *M. oleifera*, *N. sativa* juga sangat kaya dengan antioksidan daripada keluarga polifenol, tokoferol, terpenoid dan terpene serta berpotensi merendahkan tahap kolesterol dan tekanan darah. Kajian ke atas wanita dengan obesiti dan orang dewasa dengan diabetes jenis 2 mencadangkan bahawa mengambil 2-3 gram *N. sativa* setiap hari selama 8-12 minggu dapat mengurangkan tahap kolesterol total dan LDL dengan ketara (Petre 2022). Konstituen utamanya, thymoquinone juga terbukti boleh meningkatkan parameter sperma, air mani, sel Leydig, organ pembiakan dan hormon seksual (Mahdavi et al. 2015).

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Model Haiwan Digunakan

Sebanyak 36 ekor sampel haiwan iaitu tikus jantan Sprague Dawley diperoleh daripada Rumah Haiwan Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Tikus jantan yang dibekalkan berusia 12 minggu, dan mempunyai purata berat 250g sehingga 350g. Semua prosedur

dan pengendalian haiwan dalam kajian ini dijalankan mengikut garis panduan yang ditetapkan oleh Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC FST/2022/MAHANEM/28 SEPT./1272-OCT.-2022-JAN.- 2023).

2.2 Sampel Herba

2.2.1 *Nigella sativa* (*Habbatus sauda*)

Minyak biji *Nigella sativa* dibekalkan oleh syarikat Herbliss (M) Sdn. Bhd. melalui lawan sesawang rasminya (Sihaté). Pihak pembekal, Sihate, telah menjalankan ujian makmal sebanyak dua kali bagi memastikan minyak Habbatus Sauda ini hanya mengandungi sebatian antioksidan tulen iaitu thymoquinone. Minyak Habbatus Sauda ini diperolehi daripada perahan sejuk bijian jintan hitam dari pergunungan Turki. Pemberian minyak Habbatus Sauda kepada haiwan kajian dijalankan secara suap paksa mengikut dos yang ditetapkan iaitu 200 mg/kg.

2.2.2 *Moringa oleifera* (*Pokok Kelor*)

Sebanyak 500g daun *Moringa oleifera* yang telah dikeringkan dibeli daripada syarikat Herbagus Sdn Bhd. Daun *M. oleifera* ini kemudiannya dikisar menjadi serbuk, dan ditimbang bagi mendapatkan ekstrak akues *M. oleifera* pada dos 400 mg/kg ekstrak

2.3 Penyediaan Makanan Diet Tinggi Lemak (HFD)

Penghasilan makanan diet tinggi lemak dilakukan dengan mencampurkan makanan pelet tikus yang telah dikisar menjadi serbuk bersama minyak sapi yang berjenama Alzara mengikut nisbah 5:2. Campuran adunan tersebut kemudiannya dibentuk menjadi bebola yang mempunyai purata berat 35g setiap satu. Bebola tersebut kemudiannya disimpan semalaman di dalam bekas kedap udara pada suhu 4°C sebelum diberikan kepada tikus kajian bagi mencegah pengoksidaan lemak (ketengikan) dan pertumbuhan mikrob. Penghasilan HFD ini dilakukan pada setiap hari dan diberikan kepada semua kumpulan tikus kajian kecuali kepada kumpulan kawalan normal, dan pemberian HFD ini dijalankan selama 45 hari. Tikus diklasifikasikan sebagai obes apabila Indeks Lee ≥ 310 . Sekiranya masih terdapat tikus yang tidak mencapai Indeks Lee ≥ 310 , tempoh pemberian makanan diet tinggi lemak akan dilanjutkan.

2.4 Penyediaan Ekstrak Akueus *Moringa oleifera*

Daun kering *M. oleifera* yang berwarna kekuningan dipisahkan, dan daun *M. oleifera* yang berwarna kehijauan dikisar sehingga menjadi serbuk halus kering. Serbuk *M. oleifera* (g) tersebut direbus di dalam rendaman air suling (mL) (nisbah 1:4) selama 15 sehingga 20 minit pada suhu 100°C dengan menggunakan *heating mantle*. Kemudian, cecair tersebut ditapis menggunakan '*cheesecloth*' dan disimpan di dalam tiub empar falcon sebelum diletakkan ke dalam peti sejuk pada suhu 4°C. Pemberian ekstrak *M. oleifera* kepada tikus kajian kumpulan rawatan MO400 dilakukan secara suap paksa (*oral gavage*) pada dos 400mg/kg/hari semasa tempoh rawatan selama 35 hari

2.5 Reka Bentuk Kajian

Sebanyak 36 ekor tikus jantan Sprague Dawley dibahagikan kepada dua kumpulan besar iaitu kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan. Kumpulan rawatan seterusnya dibahagikan kepada tiga kumpulan kecil, iaitu MO400, NS200 serta campuran MO400+NS200. Kumpulan kawalan juga dibahagikan kepada tiga kumpulan kecil, iaitu kumpulan kawalan normal, positif, dan negatif. Setiap kumpulan kecil ini mempunyai enam ekor tikus (n=6).

Pemberian HFD adalah sebanyak 70g setiap hari. Bagi kumpulan kawalan, kedua-dua kumpulan kawalan positif dan negatif menerima HFD kecuali kawalan normal. Kumpulan kawalan positif menerima HFD, diikuti dengan pemberian 10 mg/kg/hari orlistat setelah tikus mencecah obesiti, manakala kumpulan negatif hanya diberikan HFD tanpa menerima orlistat. Kumpulan kawalan normal pula hanya diberikan pelet makanan normal. Bagi kumpulan rawatan pula, kesemua

kumpulan menerima HFD sehingga mencecah obesiti. Setelah mencecah obesiti, pemberian HFD dihentikan dan diberikan rawatan mengikut kumpulan masing-masing. Kumpulan MO diberikan ekstrak *M. oleifera* sebanyak 400 mg/kg/hari. Kumpulan NS pula diberikan minyak *N. sativa* sebanyak 200 mg/kg/hari, manakala kumpulan MO+NS diberikan campuran 400 mg/kg/hari *M. oleifera* berserta 200 mg/kg/hari *N. sativa* secara berasingan tetapi berturutan. Pemberian ekstrak *M. oleifera* dan minyak *N. sativa* dilakukan secara suap paksa.

2.6 Analisis Kiraan Sperma & Pembengkakan Hipoosmotik

Setelah tamat tempoh rawatan selama 35 hari, semua tikus kajian telah dikorbankan menggunakan kebuk karbon dioksida (CO₂). Testis kiri diambil dan dibersihkan menggunakan air suling sebelum digunakan untuk analisis tekanan oksidatif, manakala epididimis diasingkan untuk analisis kualiti sperma. Kiraan sperma dianalisis melalui pengekstrakan sperma tikus jantan dari cauda epididimis. Epididimis dipotong didalam piring petri berisi 1mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Media/larutan bersama serpihan epididimis dipindahkan ke dalam tiub pengempar 1.5 mL dan dibiarkan dalam *water-bath* selama 10 minit. Selepas 10 minit, 10uL larutan sperma diletakkan diatas hemositometer Neubauer dan dianalisis dibawah mikroskop cahaya bermagnifikasi 200x. Kiraan sperma diambil dari lima kotak utama. Bagi analisis pembengkakan hipoosmotik kaedah yang digunapakai adalah berdasarkan kajian terdahulu oleh Agarwal et al. 2022. Larutan sperma yang sama diambil sebanyak 10uL dan dimasukkan ke dalam 1mL larutan hipoosmotik. Larutan campuran ini dibiarkan dalam *water-bath* selama 10 minit. Selepas 10 minit, satu titis larutan campuran diletakkan di atas slaid kaca dan dianalisis dibawah mikroskop cahaya bermagnifikasi 200x. Peratusan pembengkakan hipoosmotik adalah dianggap normal pada 58% per 200 ekor sperma yang dikira (Agarwal et al. 2022).

2.7 Analisis Tekanan Oksidatif

Analisis aktiviti enzim glutathione tereduksi (GSH) dijalankan dengan menggunakan sampel tisu testis. Proses penyediaan sampel tisu testis bagi analisis tekanan oksidatif adalah berdasarkan protokol yang disediakan oleh pembekal kit SOLARBIO (nombor jenama: BC1170).

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Analisis tekanan oksidatif melalui aktiviti enzim glutathione tereduksi (gsh) pada tisu testis

Jadual 1 menunjukkan purata nilai serapan (abs) aktiviti enzim glutathione tereduksi (GSH) bagi setiap kumpulan tikus, yang diperolehi daripada 0.1 g sampel tisu testis tikus. Berdasarkan jadual 1 tersebut, dapat dilihat bahawa tikus dari kumpulan rawatan NS200 merekodkan purata aktiviti enzim glutathione tereduksi yang tertinggi iaitu 0.172 ± 0.189 (abs). Sementara itu, tikus dari kumpulan rawatan MO400 turut mencatatkan purata aktiviti enzim glutathione tereduksi yang signifikan, iaitu 0.149 ± 0.156 (abs). Sementara itu, tikus dari kumpulan rawatan MO400+NS200 menunjukkan aktiviti yang lebih rendah berbanding kumpulan kawalan normal dan positif. Ini menunjukkan bahawa gabungan herba ini adalah kurang efektif dalam meningkatkan aktiviti enzim glutathione tereduksi berbanding rawatan secara tunggal (MO400 dan NS200). Kumpulan kawalan positif pula merekodkan purata serapan yang hampir sama dengan kumpulan kawalan normal (0.07 ± 0.076 (abs)), iaitu 0.078 ± 0.06 (abs) dengan perbezaan yang tidak signifikan ($P > 0.05$), dan ini menunjukkan bahawa aktiviti enzim glutathione tereduksi dalam kumpulan positif hampir menyamai kumpulan normal. Purata aktiviti enzim glutathione tereduksi bagi kumpulan negatif pula adalah 0.033 ± 0.03 , terendah antara semua kumpulan. Kumpulan rawatan tunggal MO400 dan NS200 masing-masing berjaya mengurangkan tekanan oksidatif secara signifikan ($p < 0.05$) apabila dibandingkan dengan kumpulan kawalan.

Jadual 1 Purata Nilai Serapan (abs) Aktiviti Enzim Glutation Tereuksi Bagi Setiap Kumpulan Tikus Jantan Aruhan Obesiti.

Kumpulan	Purata Nilai Serapan (abs) Aktiviti Enzim Glutation Tereuksi
Normal	0.07 ± 0.042
Positif	0.078 ± 0.032
Negatif	0.033 ± 0.017
MO400	0.149 ± 0.079
NS200	0.172 ± 0.095
MO400 + NS200	0.068 ± 0.005

Hasil analisis juga membuktikan kumpulan rawatan tunggal NS200 menunjukkan purata aktiviti enzim glutathione tereduksi tertinggi antara semua kumpulan. Apabila dibandingkan dengan kumpulan kawalan normal (0.07 ± 0.076) dan positif (0.078 ± 0.06), rawatan NS200 mencatatkan purata aktiviti enzim glutathione tereduksi yang lebih tinggi, dan ini mencadangkan keberkesannya berbanding rawatan orlistat. Selain itu, keberkesanan aktiviti antioksidan tisu testis kumpulan NS200 (0.172 ± 0.095) juga dilihat melebihi kumpulan MO400 (0.149 ± 0.156), dan ini membuktikan kekuatan mekanisme antioksidannya dalam mengurangkan kerosakan selular yang disebabkan radikal bebas akibat aruhan obesiti. Peningkatan ini juga mencadangkan bahawa rawatan NS200 sangat berkesan dalam meningkatkan aktiviti enzim glutathione tereduksi (GSH) dalam tikus jantan aruhan obesiti. Kesan minyak *N. sativa* dikaitkan dengan kandungan thymoquinone, yang boleh berbeza dari 0.05 hingga 6.19 mg/mL mengikut kawasan pengeluaran dan kaedah pengekstrakan (Mohammed et al. 2016). Thymoquinone berfungsi dalam membantu mengurangkan tekanan oksidatif serta mencegah kerosakan sel. Tambahan pula, aktiviti biologinya juga sering dikaitkan dengan kawalan sistem redoks melalui aktiviti penghapusan radikal bebas dan modulasi sistem antioksidan endogen (Bordoni et al. 2019). Rawatan NS200 dilihat lebih berkesan apabila diberikan secara tunggal berbanding apabila digabungkan dengan MO400. Oleh itu, berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada Jadual 1, pemberian minyak *N. sativa* pada dos 200 mg/kg terbukti berkesan dalam meningkatkan aktiviti enzim glutathione tereduksi, menjadikannya agen terapeutik yang berpotensi untuk mengurangkan tekanan oksidatif yang disebabkan obesiti.

Selain daripada kumpulan rawatan NS200, kumpulan rawatan MO400 juga menunjukkan keberkesanan yang signifikan dalam meningkatkan aktiviti enzim glutathione tereduksi. Ini dapat dilihat apabila kumpulan rawatan MO400 (0.149 ± 0.156) mencatatkan purata nilai aktiviti enzim glutathione tereduksi yang lebih tinggi berbanding kumpulan kawalan normal (0.07 ± 0.076) dan positif (0.078 ± 0.06). Dalam beberapa tahun kebelakangan ini, produk semulajadi yang diperolehi daripada *Moringa oleifera* telah menjadi subjek banyak kajian yang terdiri daripada model eksperimen berbeza yang bertujuan untuk menilai sifat antioksidannya (Duranti et al. 2021). Ekstrak daripada *M. oleifera* menunjukkan aktiviti kerana kehadiran molekul bioaktif seperti isothiocyanates, tanin, saponin, flavonoid, dan terpenoid, terutamanya dalam daun (Ceci et al. 2024). Rawatan MO400 juga dilihat lebih berkesan apabila diberikan secara tunggal berbanding apabila digabungkan dengan NS200. Ini berkemungkinan kerana gabungan bahan aktif *M. oleifera* dan *N. sativa* menyebabkan interaksi kimia yang mengurangkan keberkesanan herba MO dan NS. Selain itu, penggunaan dua herba tradisional yang mengandungi kandungan antioksidan yang tinggi ini boleh mengganggu keseimbangan antara sistem antioksidan dan penghasilan oksidan, dan keadaan ini membawa kepada berlakunya tekanan oksidatif di dalam sel. Penggunaan pelarut, kaedah pengekstrakan serta bahagian daripada pokok MO juga mempengaruhi keberkesanan ekstrak MO. Bahagian MO seperti akar, bunga, biji atau daun mengandungi profil fitokimia yang berbeza, justeru boleh memberikan kesan biologi berlainan (Paikra et al. 2017). Dalam kajian ini, air telah digunakan sebagai pelarut kerana air merupakan pelarut semula jadi dan tidak mengandungi bahan kimia berbahaya. Proses pengekstrakan dijalankan menggunakan kaedah pemanasan dan bahagian pokok yang digunakan adalah daun MO kerana daun MO

mengandungi kandungan fitokimia dan antioksidan yang lebih tinggi berbanding bahagian yang lain (Paikra, Dhongade & Gidwani 2017).

Kumpulan kawalan positif (0.078 ± 0.06) pula menunjukkan hasil purata nilai serapan aktiviti enzim glutathione tereduksi yang hampir sama dengan kumpulan normal (0.07 ± 0.076). Akan tetapi, kumpulan positif masih menunjukkan sedikit peningkatan, dan ini membuktikan rawatan dengan orlistat masih memberi manfaat dalam melindungi sel daripada kerosakan oksidatif. Kumpulan kawalan negatif pula menunjukkan purata nilai aktiviti enzim glutathione tereduksi yang terendah berbanding kumpulan kawalan dan rawatan yang lain. Kumpulan negatif merupakan kumpulan tikus jantan yang diaruh obesiti tanpa diberikan sebarang rawatan. Purata nilai aktiviti enzim glutathione tereduksi yang rendah ini jelas menunjukkan tekanan oksidatif yang tinggi berlaku di dalam tikus obes ini. Tekanan oksidatif yang tinggi ini berkemungkinan disebabkan oleh pengumpulan radikal bebas dan peroksidasi lipid yang tinggi berlaku disebabkan obesiti. Berbanding kumpulan kawalan yang lain, kumpulan kawalan negatif jelas menunjukkan ketidakupayaan tubuh untuk menangani tekanan oksidatif tanpa rawatan. Oleh itu, hasil yang ditunjukkan di dalam jadual 1 mengesahkan bahawa obesiti boleh menyebabkan tekanan oksidatif yang serius, dan ini boleh diatasi dengan pemberian ekstrak akues *M. oleifera* dan minyak *N. sativa* secara tunggal bagi meningkatkan purata aktiviti enzim glutathione tereduksi.

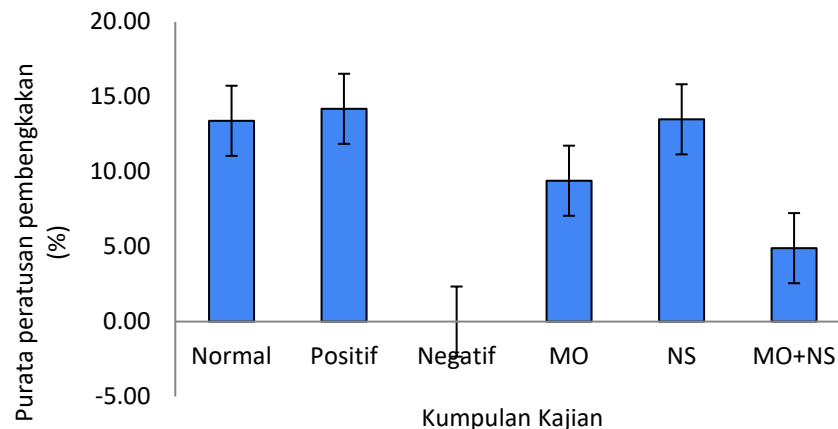
3.2 Analisis Bilangan Sperma dan Pembengkakan Hipoosmotik

Berdasarkan Jadual 2, kumpulan rawatan NS200 dan MO400+NS200 menunjukkan purata bilangan sperma tertinggi berbanding kesemua kumpulan kajian. Umumnya, purata bilangan sperma yang ideal adalah sebanyak >15 juta (Cooper et al. 2009). Kumpulan rawatan NS200 menunjukkan purata bilangan sperm sebanyak 20.00×10^6 iaitu setanding dengan bilangan ideal. Ini dipercayai terjadi kerana aktiviti antioksidan yang terdapat dalam minyak *Nigella sativa* mampu melindungi sel sperma dari tekanan oksidatif dan seterusnya meningkatkan bilangan sperma. Struktur, fungsi, pergerakan dan ketahanan hidup sperma adalah sangat terkesan dengan tekanan oksidatif yang disebabkan oleh obesiti. Maka, dengan kehadiran aktiviti antioksidan dalam komponen bioaktif minyak *Nigella sativa*, ia berpotensi mengurangkan kesan buruk akibat tekanan oksidatif dengan meneutralkan radikal bebas seperti spesies oksigen reaktif secara berkesan, sekali gus melindungi sel daripada kerosakan akibat tekanan oksidatif (Yimer et al. 2019). Thymoquinone juga mampu untuk menghalang penghapusan mitokondria dan meningkatkan aktiviti spermatogenesis dalam tikus disebabkan oleh ciri antioksidannya (Darand et al. 2019). Kumpulan MO400+NS200 mempunyai purata bilangan sperma ke dua tertinggi (19.70×10^6) namun, bilangan sperma yang tinggi ini dipercayai disumbangkan oleh sebatian bioaktif yang terdapat dalam minyak *Nigella sativa*, kerana purata bilangan sperma kumpulan MO adalah rendah. Ini menunjukkan bahawa rawatan dengan ekstrak akueus *Moringa oleifera* kurang menunjukkan keberkesanannya dalam meningkatkan jumlah bilangan sperma.

Jadual 2. Kesan MO400, NS200, MO400+NS200 ke atas bilangan sperma.

Kumpulan Kajian	Bilangan Sperma
Kawalan Normal	12.30×10^6
Kawalan Positif	15.80×10^6
Kawalan Negatif	5.30×10^6
MO400	9.40×10^6
NS200	20.00×10^6
MO400+NS200	19.70×10^6

Bagi pembengkakan hipoosmotik pula, berdasarkan Rajah 1 dan Jadual 3, purata peratusan pembengkakan sperma dalam kumpulan rawatan NS adalah yang tertinggi iaitu, sebanyak 13.5%. Bahan bioaktif seperti thymoquinone yang terdapat dalam minyak *N. sativa* dipercayai dapat mengurangkan tekanan oksidatif dan seterusnya menghalang dari terjadinya kerosakan pada struktur membran dan integriti kefungsiian sperma. Berdasarkan kajian oleh Darand et al. 2019, aktiviti antioksidan yang terdapat dalam minyak NS mampu meningkatkan parameter kualiti sperma seperti struktur normal dan pergerakan sperma.



Rajah 1. Purata peratusan pembengkakan (% HOS) sperma.

Jadual 3. Kesan MO400, NS200, MO400+NS200 ke atas pembengkakan hipoosmotik

Kumpulan Kajian	Purata Peratusan Pembengkakan (%)
Kawalan Normal	13.40
Kawalan Positif	14.20
Kawalan Negatif	0.00
MO400	9.40
NS200	13.50
MO400+NS200	4.90

4. Kesimpulan

Kajian ini berjaya membuktikan keberkesanan rawatan tunggal *Moringa oleifera* dan *Nigella sativa* masing-masing sebagai antioksidan dalam membantu mengatasi masalah ketidaksuburan tikus jantan yang diaruh obesiti. Keberkesanan ini dapat dilihat melalui peningkatan aktiviti enzim glutathion tereduksi (GSH) pada tisu testis tikus secara signifikan ($p < 0.05$) dalam kumpulan rawatan individu MO400 dan NS200. Peningkatan ini dibuktikan dengan purata nilai serapan (abs) aktiviti enzim GSH yang lebih tinggi dalam kumpulan rawatan individu MO400 dan NS200 berbanding semua kumpulan kawalan yang lain. Bagi analisis parameter kesuburan, minyak NS terbukti dapat meningkatkan kesuburan dengan menghasilkan kiraan sperma dan pembengkakan hipoosmotik tertinggi berbanding kumpulan rawatan yang lain.

Penghargaan

Ribuan terima kasih diucapkan kepada kakitangan Rumah Haiwan Fakulti Sains dan Teknologi, yang telah memberi tunjuk ajar tentang penjagaan dan pengurusan haiwan dengan betul. Terima kasih juga diucapkan kepada Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi di atas peluang dan kemudahan infrastruktur yang disediakan.

Rujukan

- Arnarson, A. 2018. 6 Science-Based Health Benefits of *Moringa oleifera*. https://www.healthline.com/nutrition/6-benefits-of-moringa-oleifera#TOC_TITLE_HDR_2 [21 Mac 2024].
- Agarwal, A., Sharma, R.K., Gupta, S., Boitrelle, F., Finelli, R., Parekh, N., Durairajanayagam, D., Saleh, R., Arafa, M., Cho, C.L., Farkouh, A., Rambhatla, A., Henkel, R., Vogiatzi, P., Tadros, N., Kavoussi, P., Ko, E., Leisegang, K., Kandil, H. & Palani, A. 2022. Sperm Vitality and Necrozoospermia: Diagnosis, Management, and Results of a Global Survey of Clinical Practice. *The World Journal of Men's Health* 40(2): 228.
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M. & Dada, R. 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology* 14(8): 470–485.
- Bordoni, L., Fedeli, D., Nasuti, C., Maggi, F., Papa, F., Wabitsch, M., De Caterina, R. & Gabbianelli, R. 2019. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Nigella sativa* Oil in Human Pre-Adipocytes. *Antioxidants* 8(2): 51.
- Ceci, R., Mariateresa Maldini, Rosa, P.L., Sireno, L., Antinozzi, C., Olson, M.E., Dimauro, I. & Guglielmo Duranti. 2024. The Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract on C2C12 Myoblast Proliferation and Redox Status Under Oxidative Insult. *Antioxidants* 13(12): 1460–1460.
- Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W.G., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T. & Vogelsong, K.M. 2009. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* 16(3): 231–245.
- Darand, M., Hajizadeh, M., Mirmiran, P. & Mokrai-Yamchi, A. 2019. The effect of *Nigella sativa* on infertility in men and women: a systematic review
- Duranti, G., Maldini, M., Crognale, D., Horner, K., Dimauro, I., Sabatini, S. & Ceci, R. 2021. *Moringa oleifera* Leaf Extract Upregulates Nrf2/HO-1 Expression and Ameliorates Redox Status in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Molecules* 26(16): 5041.
- Inhorn, M.C. & Patrizio, P. 2015. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update* 21(4): 411–426.
- Ismail, W.S. 2014. Ketidaksuburan Lelaki. <http://www.myhealth.gov.my/ketidaksururan-lelaki/> [21 Mac 2024].
- Li, H., Ren, J., Li, Y., Wu, Q. & Wei, J. 2023. Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes. *Frontiers in Endocrinology* 14.
- Mannucci, A., Argento, F.R., Fini, E., Coccia, M.E., Taddei, N., Becatti, M. & Fiorillo, C. 2022. The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
- Mahdavi, R., Heshmati, J. & Namazi, N. 2015. Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on male infertility: A systematic review. *Journal of Herbal Medicine* 5(3): 133–139.
- Mohammed, N.K., Abd Manap, M.Y., Tan, C.P., Muhialdin, B.J., Alhelli, A.M. & Meor Hussin, A.S. 2016. The Effects of Different Extraction Methods on Antioxidant Properties, Chemical Composition, and Thermal Behavior of Black Seed (*Nigella sativa* L.) Oil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2016.
- O'Neill, A. 2024. World - fertility rate 2008-2018. <https://www.statista.com/statistics/805064/fertility-rate-worldwide/> [21 Mac 2024].
- Paikra, B.K., Dhongade, H. kumar J. & Gidwani, B. 2017. Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Pharmacopuncture* 20(3): 194–200.
- Petre, A. 2022. What Is *Nigella Sativa*? Forms, Nutrients, and Health Effects. <https://www.healthline.com/nutrition/what-is-nigella-sativa#:~:text=May%20lower%20your%20cholesterol%20and%20blood%20pressure&text=Studies%20in%20women%20with%20obesity> [21 Mac 2024].
- Pruthi, S. 2022. Male infertility - Symptoms and causes. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/male-infertility/symptoms-causes/syc-20374773#:~:text=Men%20who%20smoke%20may%20have> [21 Mac 2024].
- Wahab, A.W.A.M.A. 2023. Kualiti Sperma Dan Masalah Ketidaksuburan. <https://hellodoktor.com/kesihatan-lelaki/kualiti-sperma-ketidaksururan/> [4 Mei 2024].
- Walke, G., Sagar Gaurkar, Prasad, R., Tejaswee Lohakare & Mayur Wanjari. 2023. The Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function: Exploring the Role of Antioxidant Supplementation. *Cureus* 15(7).

- Yaacob, F.H. 2023. Masalah kesuburan lelaki di Malaysia membimbangkan, kadar kelahiran menurun. <https://selangorkini.my/2023/04/masalah-kesuburan-lelaki-di-malaysia-membimbangkan-kadar-kelahiran-menurun/> [21 Mac 2024].
- Yimer, E.M., Tuem, K.B., Karim, A., Ur-Rehman, N. & Anwar, F. 2019. *Nigella sativa* L. (Black Cumin): A Promising Natural Remedy for Wide Range of Illnesses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019: 1–16.

Kesan Penambahan Protein Lengai Terhadap Pemegunan Glukosa Oksidase (GOx) pada Nanobunga Hibrid Organik-Tak Organik (HNF)
(Effect of Inert Protein Addition Towards Glucose Oxidase (GOx) Immobilisation on Hybrid Organic-Inorganic Nanoflowers (HNF))

Naga Darsshini Manickavasakam & Muhammad Ashraf Shahidan *

*Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

** e-mail of corresponding author: mashraf@ukm.edu.my*

Abstrak: Kajian ini bertujuan untuk melihat kesan penambahan protein lengai iaitu albumin serum lembu (BSA) terhadap pemegunan glukosa oksidase (GOx) pada nanobunga hibrid organik-tak organik (HNF) yang disediakan menggunakan dua jenis ion logam berbeza iaitu CaCl_2 (nanobunga hibrid BSA-GOx-Ca, BGCaHN) dan CuSO_4 (nanobunga hibrid BSA-GOx-Cu, BGCuHN). Menggunakan asai 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), aktiviti enzim GOx dikesan pada BGCaHN sahaja di mana kepekatan BSA yang terendah iaitu 25 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan aktiviti enzim yang tertinggi. Namun, tiada aktiviti GOx yang signifikan dikesan pada BGCuHN yang mungkin disebabkan perencatan oleh ion Cu^{2+} . Ujian kestabilan yang dilakukan untuk BGCaHN menunjukkan kestabilan aktiviti GOx selama lima hari berturut-turut pada penyimpanan pada suhu 4°C. Bagi ujian kebolehgunaan semula pula, hasil tidak dapat ditentukan kerana kaedah kolorimetrik yang digunakan iaitu TMB menyebabkan pewarnaan pada pelet yang mengganggu pengukuran aktiviti enzim secara berulang, menjadikannya tidak sesuai untuk kajian regenerasi.

Kata kunci: *Glukosa oksidase; nanobunga hibrid; pemegunan; pengasaan enzim; kestabilan enzim*

Abstract: This study was performed to study the effect of adding inert protein such as bovine serum albumin (BSA) towards the immobilisation of glucose oxidase (GOx) on hybrid organic-inorganic nanoflowers (HNF) that were prepared using two different metal ions, CaCl_2 (BSA-GOx-Ca hybrid nanoflower, BGCaHN) and CuSO_4 (BSA-GOx-Cu hybrid nanoflower, BGCuHN). Using TMB assay, GOx activities were detected only for BGCaHN and the highest activity was recorded when the lowest BSA concentration (25 $\mu\text{g/mL}$) was used. However, no significant enzyme activity was detected for BGCuHN, suggesting that the activity might be inhibited by Cu^{2+} ion. The stability test that was performed for BGCaHN showed stable GOx activity over the five days storage period at 4°C. However, in the reusability tests, the results were inconclusive due to the use of colorimetric method, TMB that caused pellet staining that interfered with repeated enzyme activity measurements, making it unsuitable for regeneration studies.

Keywords: *Glucose oxidase; hybrid nanoflowers; immobilisation; enzyme assay; enzyme stability*

1. Pendahuluan

Glukosa oksidase (GOx) adalah enzim oksidoreduktase yang dapat disesuaikan untuk pelbagai kegunaan, sangat stabil dan sering dirujuk sebagai *Ferrari of oxidase* disebabkan oleh aktiviti pemangkinan yang cekap dan kekhususannya (Bauer et al. 2022). GOx yang dihasilkan daripada kulat seperti *Aspergillus niger* memungkinkan pengoksidaan β -D-glukosa kepada D-glukono- δ -laktone yang dihidrolisis kepada asid glukonik, dengan kehadiran molekul oksigen sebagai penerima elektron dan menghasilkan hidrogen peroksida sebagai hasil sampingan. Ia merupakan flavoprotein dimerik yang terdiri daripada dua subunit serupa, masing-masing seberat kira-kira 80 kDa, dan setiap subunit membentuk kompleks dengan flavin adenin dinukleotida (FAD) serta glikan yang penting untuk aktiviti pemangkinan enzim (Wong et al. 2008).

GOx mempunyai pelbagai aplikasi merentasi bidang industri makanan, klinikal dan farmaseutikal. GOx ialah enzim penting dalam pembangunan biosensor dan aplikasi diagnostik, terutamanya untuk pemantauan aras glukosa dalam pesakit diabetes, di mana ia mengoksidakan glukosa kepada asid glukonik dan hidrogen peroksida, seterusnya dapat dikesan secara elektrokimia. Selain itu, GOx juga memainkan peranan dalam kawalan kualiti makanan dengan menentukan kandungan glukosa dalam minuman, memastikan konsistensi produk. Dalam industri makanan pula, ia bertindak sebagai pengawet, memanjangkan jangka hayat dengan mengurangkan tahap oksigen dalam barangan yang dibungkus, yang menghalang pengoksidaan dan mengekalkan persekitaran anaerobik (Wong et al. 2008). GOx juga digunakan sebagai agen antimikrob dalam industri makanan kerana kemampuannya untuk menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang boleh merosakkan sel membran, protein, dan DNA mikroorganisma, sekali gus mengurangkan atau menghalang pertumbuhan bakteria patogen seperti *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Listeria monocytogenes*, yang sering menyebabkan keracunan makanan (Cichello 2015). Dari sudut farmaseutikal, GOx mempunyai potensi tinggi dalam terapi kanser yang disasarkan dengan mengurangkan glukosa dalam tumor, mewujudkan hipoksia dan menjana spesies oksigen reaktif (ROS) untuk memusnahkan sel-sel kanser (Bauer et al. 2022).

Namun begitu, penggunaan GOx dalam aplikasi yang dinyatakan dibatasi oleh beberapa masalah seperti kestabilan yang rendah terhadap pelbagai proses dan keadaan seterusnya mengurangkan aktiviti enzim. Masalah ini boleh diatasi melalui kaedah pemegunan enzim yang merupakan proses pelekatan enzim pada pembawa. Kaedah konvensional untuk pemegunan enzim seperti penjerapan, pengikatan kovalen dan pemerangkapan pada pembawa boleh menyebabkan kestabilan enzim dipertingkatkan, namun aktivitinya berkurangan akibat daripada perubahan tapak aktif, halangan sterik, fleksibiliti terhadap dan perubahan konformasi (Xu et al. 2023).

Pemegunan enzim pada bahan struktur nano merupakan salah satu pendekatan terkini untuk meningkatkan kestabilan struktur enzim dan meningkatkan kebolegunaan semula enzim yang dipegunkan, serta meningkatkan luas permukaan untuk pemegunan enzim. Antara bahan nano yang banyak digunakan untuk pemegunan enzim ialah nanobunga hibrid organik-tak organik (HNF), kerana prosedurnya yang tidak rumit dan kemampuannya yang dilaporkan dapat meningkatkan aktiviti enzim yang dipegunkan. Kebiasaannya, pemegunan menggunakan kaedah ini memerlukan kepekatan enzim yang tinggi iaitu melebihi 0.1 mg/mL bagi mendapatkan struktur HNF yang konsisten (Topalä et al. 2014), sekaligus menyebabkan kos pemegunan yang tinggi.

Oleh itu, kajian ini dilakukan untuk melihat kesan campuran enzim dengan protein lengai yang berkos rendah seperti BSA terhadap penghasilan HNF, dengan menggunakan GOx sebagai model enzim. Dalam kajian ini, kepekatan GOx ditetapkan pada 0.05 μ g/mL (8 U), iaitu kepekatan yang biasa digunakan dalam prosedur pengasaian, manakala kepekatan BSA yang berbeza iaitu pada julat 25- 100 μ g/mL digunakan untuk campuran. Penyediaan HNF turut dilakukan menggunakan dua ion dwivalen berbeza iaitu Cu^{2+} dan Ca^{2+} untuk melihat kesan ion ini terhadap aktiviti GOx yang dipegunkan. Selain itu, kestabilan GOx yang dipegunkan pada HNF menggunakan kepekatan BSA dan ion berbeza dikaji melalui penyimpanan pada suhu 4°C selama lima hari, manakala ujian kebolehulangan turut dilakukan melalui langkah regenerasi sebanyak tiga kitaran.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Penyediaan BGCaHN & BGCuHN

Bagi penyediaan nanobunga hibrid BSA-GOx-CaCl₂ (BGCaHN), larutan stok BSA kepekatan 1 mg/mL disediakan terlebih dahulu. Kemudian, tiga nanobunga dengan kepekatan BSA yang berbeza iaitu 25 µg/mL, 75 µg/mL, dan 100 µg/mL disediakan dengan menambahkan larutan BSA kepada PBS yang mengandungi 8 unit GOx (0.05 µg/mL) dan ion logam CaCl₂ pada kepekatan 120 mM. Campuran tersebut dieram pada suhu 25°C selama tiga hari. Mendakan yang terbentuk dikumpulkan melalui pengemparan pada kelajuan 10,920 x g selama 5 minit dan dibasuh dengan air ternyahion sebanyak tiga kali. Untuk menyediakan nanobunga hibrid BSA-GOx-CuSO₄ (BGCuHN), langkah serupa diikuti dengan menggantikan larutan ion logam CaCl₂ kepada larutan CuSO₄ pada kepekatan 120 mM. Nanobunga yang disediakan tanpa penambahan GOx (tanpa enzim) merupakan kawalan untuk penentuan aktiviti nanobunga.

2.2 Penentuan aktiviti GOx terpegun

Dalam kajian ini, aktiviti nanobunga hibrid telah ditentukan menggunakan TMB sebagai substrat kromogenik dalam pengasaian. Kajian terdahulu oleh Ahmad et al. (2024) telah menggunakan TMB sebagai substrat dalam asai peroksidase dari *horseradish* (HRP) disebabkan oleh kelebihan yang lebih stabil, sensitif, spesifik terhadap HRP serta menghasilkan isyarat warna yang jelas dan mudah diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm setelah tindak balas dihentikan dengan asid (Li et al. 2019). Secara umumnya, GOx bertindak ke atas glukosa dengan kehadiran molekul oksigen, di mana tindak balas ini menukarkan glukosa kepada asid glukonik dan menghasilkan H₂O₂ sebagai hasil sampingan. Seterusnya, HRP yang digandingkan bersama glikoenzim GOx, menggunakan H₂O₂ yang terhasil untuk mengoksidakan substrat TMB. TMB mengalami proses pengoksidaan dan menghasilkan TMB- oksida yang mempunyai warna biru pekat, lalu tindak balas dihentikan dengan asid sulfurik (H₂SO₄), untuk menghasilkan warna kuning yang boleh diukur pada 450 nm (Busa et al. 2016). TMB dipercayai lebih stabil dan memerlukan H₂O₂ dan HRP untuk pengoksidaan, justeru menjadikannya kurang cenderung untuk autopingoksidaan (Hosoda et al. 1986).

Untuk pengesanan aktiviti GOx terpegun, pelet yang diperoleh selepas langkah pembasuhan akan digunakan. Nanobunga BGCaHN atau BGCuHN, 10% larutan glukosa, HRP dan PBS ditambahkan ke dalam setiap tiub Eppendorf. Asai dijalankan dengan membiarkan campuran semua komponen bertindak balas selama 30 minit pada suhu 37°C. Selepas 30 minit, substrat TMB ditambahkan ke dalam campuran, diikuti dengan penggeraman selama 30 minit. Tindak balas dihentikan dengan menambahkan 100 µL 2 M asid sulfurik (H₂SO₄) ke dalam setiap telaga. Keamatan warna hasil tindak balas diukur pada panjang gelombang 450 nm menggunakan pembaca plat Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

2.3 Ujian kestabilan dan kebolehulangan GOx terpegun

Ujian kestabilan nanobunga yang dihasilkan ditentukan menggunakan prosedur pengasaian kolorimetrik yang sama seperti yang dinyatakan di atas. Sebanyak lima kelompok nanobunga disediakan pada waktu yang sama dan disimpan pada suhu 4°C untuk tempoh lima hari. Bacaan aktiviti nanobunga diambil setiap hari untuk tempoh lima hari berturut. Keamatan warna hasil tindak balas diukur pada panjang gelombang 450 nm menggunakan pembaca plat Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Bagi menilai kebolehgunaan semula nanobunga BSA, langkah regenerasi dilakukan di mana prosedurnya adalah sama seperti penentuan aktiviti dengan beberapa pengubahsuaian iaitu langkah pembasuhan sebanyak tiga kali dilakukan di antara setiap pengasaian. Eksperimen ini diulang sebanyak tiga langkah regenerasi untuk memerhatikan perubahan aktiviti GOx yang terpegun pada nanobunga.

2.4 Analisis data

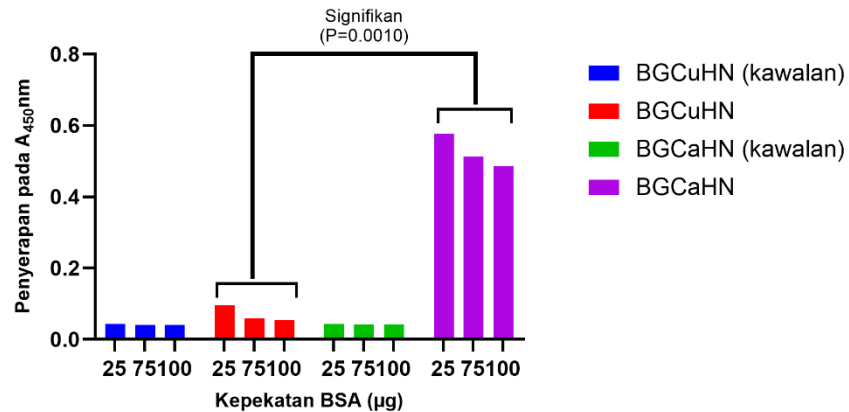
Microsoft Excel digunakan untuk menjadualkan data yang terkumpul. GraphPad Prism Versi 10.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) digunakan untuk menjalankan analisis statistik. Semua data ditunjukkan sebagai $\text{min} \pm \text{SD}$. Graf bar digunakan untuk membandingkan min. Ujian signifikan iaitu *Student T-test* turut dilakukan di mana ($P < 0.05$) menunjukkan bahawa perbezaan di antara kumpulan adalah signifikan secara statistik dan hipotesis nol boleh ditolak. Berdasarkan konteks kajian ini, hipotesis null adalah andaian bahawa tiada perbezaan signifikan antara kedua-dua kumpulan yang diuji.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Kesan kepekatan BSA terhadap pemegunan GOx

Untuk pemegunan enzim secara pemerangkapan pada nanobunga hibrid, kepekatan enzim yang melebihi 0.1mg/mL biasanya digunakan untuk mendapatkan struktur nanobunga yang konsisten (Topalã et al. 2014). Namun, kepekatan GOx yang digunakan dalam kajian ini adalah kurang daripada 0.1 mg/mL, justeru penambahan protein yang lengai seperti BSA dilakukan untuk menyokong pembentukan nanobunga. Rajah 1 menunjukkan terdapat perbezaan yang signifikan ($P < 0.05$) pada aktiviti GOx yang terpegun pada nanobunga BGCaHN dan BGCuHN, di mana GOx yang terpegun pada BGCaHN memberikan bacaan penyerapan A450 yang jauh lebih tinggi berbanding dengan BGCuHN untuk ketiga-tiga kepekatan BSA yang digunakan. Ini menunjukkan bahawa pemegunan GOx pada nanobunga yang mengandungi Ca^{2+} adalah lebih berkesan berbanding Cu^{2+} . GOx terpegun pada BGCuHN menunjukkan aktiviti enzim yang sangat rendah mungkin disebabkan kesan perencatan ion Cu^{2+} terhadap aktiviti GOx, seperti yang pernah dilaporkan oleh Mahmoudi et al. (2003). Selain itu, penambahan Ca^{2+} sebagai komponen inorganik dalam nanobunga boleh meningkatkan kestabilan dan keberkesanan enzim, kerana ion kalsium diketahui berfungsi sebagai kofaktor yang membantu menstabilkan struktur tiga dimensi enzim. Oleh itu, peranan Ca^{2+} dalam pembangunan nanobunga yang meningkatkan aktiviti enzim terpegun dalam eksperimen ini adalah sejajar dengan penemuan yang dilaporkan oleh Zhou et al. (2024) dalam kajiannya.

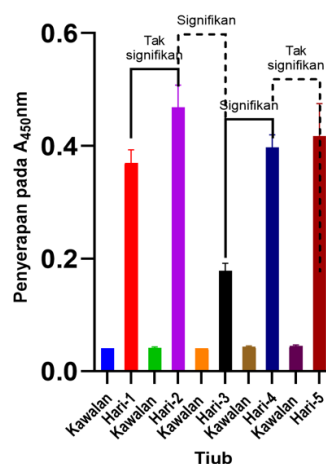
Strategi pemegunan ini juga memanfaatkan sifat BSA sebagai protein tambah bersifat lengai yang boleh membentuk struktur nanobunga yang stabil melalui interaksi bukan kovalen seperti elektrostatik dan ikatan hidrogen dengan ion logam dan enzim. Walau bagaimanapun, pada kepekatan tinggi, BSA boleh mengalami halangan sterik, di mana ia mampu menutup molekul enzim secara berlebihan, menghalang tapak aktif daripada berinteraksi dengan substrat dan menjejaskan aktiviti enzim untuk memungkinkan penukaran substrat kepada produk (Bobrowska et al. 2023). Jadi, untuk mengkaji kesan ini, kepekatan BSA diselaraskan pada kepekatan yang rendah, iaitu 25 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, dan 100 $\mu\text{g/mL}$, berbanding kepekatan lazim (100 $\mu\text{g/mL}$ hingga 2 mg/mL) yang sering digunakan dalam pembentukan nanobunga. Menariknya, dapatan daripada kajian ini menunjukkan pengurangan aktiviti GOx dengan peningkatan kepekatan BSA sebagai bahan tambah. Ini menyokong pernyataan oleh Bobrowska et al. (2023) yang memerihalkan kesan bahan tambah, lalu mempengaruhi pengoptimuman untuk penghasilan HNF berdasarkan strategi ini.



Rajah 1. Perbandingan aktiviti GOx terpegun pada BGCuHN (merah) dan BGCaHN (ungu) yang dihasilkan pada kepekatan BSA berbeza (25,75,100 µg) serta kawalan masing-masing (biru dan hijau), ion berbeza (Cu^{2+} - biru, merah dan Ca^{2+} - hijau, ungu).

3.2 Ujian kestabilan GOx terpegun

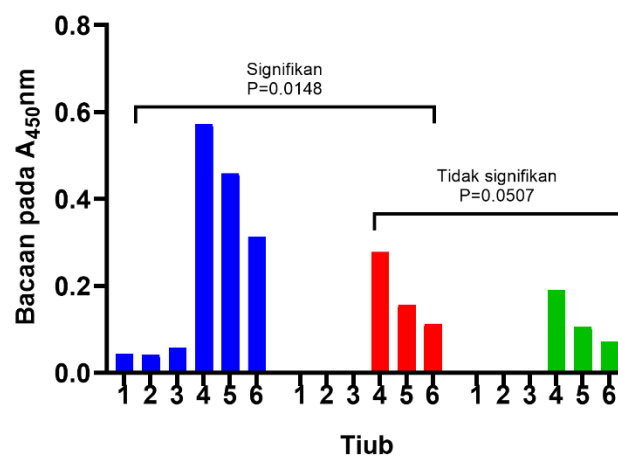
Ujian kestabilan diteruskan menggunakan GOx terpegun yang mempunyai aktiviti tertinggi iaitu pada nanobunga BGCaHN yang dihasilkan menggunakan 25 µg/mL BSA. Rajah 2 menunjukkan strategi pemegunan ini berjaya mengekalkan aktiviti GOx yang stabil selama lima hari pada suhu 4°C di mana terdapat perbezaan aktiviti HRP yang signifikan ($P < 0.05$) antara nanobunga BGCaHN dan kawalan untuk lima hari berturut. Pengukuran pada panjang gelombang 450 nm menunjukkan bahawa terdapat perbezaan signifikan ($P < 0.05$) dalam keamatan warna pada hari kedua dan hari ketiga. Peningkatan aktiviti enzim selepas hari ketiga mungkin disebabkan oleh perubahan konformasi enzim yang mengurangkan perencatan awal dan meningkatkan akses terhadap tapak aktif kepada substrat serta peningkatan kestabilan nanobunga akibat interaksi lebih baik antara protein dan pembawa. Keamatan warna yang hampir konsisten sepanjang tempoh lima hari menunjukkan bahawa nanobunga berasaskan BSA yang dihasilkan mampu mengekalkan kestabilan enzim. Dapatan ini disokong oleh kajian Samturk et al. (2015) yang menunjukkan enzim yang dipegunkan pada nanobunga mampu mengekalkan 96% aktivitinya untuk tempoh penyimpanan selama 30 hari pada suhu 4°C. Namun begitu, penurunan aktiviti pada hari ketiga berkemungkinan disebabkan masalah kebocoran enzim yang disebabkan kerosakan pada struktur nanobunga yang disebabkan oleh daya mekanikal yang kuat seperti daya emparan yang dikenakan pada sampel semasa langkah pembasuhan.



Rajah 2. Kestabilan GOx yang dipegunkan pada BGCaHN untuk penyimpanan selama lima hari berturut-turut pada suhu 4°C.

3.3 Ujian kebolehgunaan semula GOx terpegun

Hasil kajian menunjukkan bahawa aktiviti GOx yang dipegunkan pada nanobunga BGCaHN kekal dapat dikesan walaupun selepas tiga kali kitar regenerasi (Rajah 3). Semakin banyak kitaran regenerasi, semakin kurang aktiviti yang diperhatikan, di mana terdapat perbezaan yang signifikan ($P < 0.05$) antara aktiviti nanobunga pada kitaran 1 dan kitaran 2. Namun begitu, tiada perbezaan signifikan ($P > 0.05$) diperhatikan untuk aktiviti GOx pada kitaran 2 dan kitaran 3 diperhatikan. Lanjutan regenerasi tidak berjaya diteruskan ke kitaran seterusnya kerana nanobunga telah mengalami pewarnaan oleh substrat TMB yang digunakan dalam tindak balas sebelumnya yang boleh menyebabkan pemendakan produk TMB akibat tindakbalas berlebihan (Kramtsov et al. 2025). Mendakan ini kekal melekat pada permukaan nanobunga BGCaHN disebabkan, walaupun selepas langkah pembasuhan dan berkemungkinan menyebabkan penurunan aktiviti enzim seperti yang diperhatikan.



Rajah 3. Kebolehgunaan GOx yang dipegunkan pada BGCaHN untuk 3 kitaran yang berbeza (biru=kitaran 1, merah=kitaran 2 dan hijau=kitaran 3). Tiub 4-6 menunjukkan BGCaHN yang disediakan menggunakan kepekatan BSA yang berbeza iaitu 25 µg/mL, 75 µg/mL dan 100 µg/mL, masing-masing. Tiub 1-3 merupakan kawalan iaitu tiub tanpa penambahan HRP.

Oleh itu, kebolehgunaan semula GOx yang dipegunkan pada nanobunga BGCaHN tidak dapat ditentukan dengan tepat menggunakan asai kolorimetrik TMB dan memerlukan teknik lain yang dapat mengesan produk GOx secara terus seperti spektroskopi jisim dan pengukuran pH.

4. Kesimpulan

Hasil kajian ini telah menunjukkan bahawa strategi menggunakan protein lengai seperti BSA untuk meningkatkan kepekatan protein boleh digunakan untuk memegunkan enzim pada nanobunga hibrid organik-tak organik (HNF), namun kepekatan masing-masing perlu dioptimumkan. Kajian ini berjaya mengenal pasti 25 µg/mL BSA sebagai kepekatan yang paling optimum serta ion kalsium sebagai bahan tak organik yang sesuai untuk memegunkan enzim GOx. Penurunan aktiviti GOx terpegun diperhatikan apabila kepekatan BSA yang digunakan meningkat mencadangkan kesan halangan sterik oleh BSA yang menyukarkan capaian substrat pada tapak aktif GOx terpegun. Secarakeseluruhannya, tiada penurunan signifikan aktiviti GOx diperhatikan untuk penyimpanan selama lima hari pada suhu 4°C. Kajian lanjutan terhadap morfologi dan taburan saiz HNF yang dihasilkan melalui strategi ini perlu dijalankan pada masa akan datang menggunakan teknik seperti mikroskop pengimbas elektron (SEM).

Penghargaan

Pengarang ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Fakulti Sains dan Teknologi (FST), Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) untuk pembiayaan projek.

Rujukan

- Ahmad, W. N. M. W., Saad, N. N., Shahidan, N. N., & Shahidan, M. A. 2024. Lectin hybrid nanoflowers as novel carrier for glycoenzyme immobilisation. *Sains Malaysiana* 53(12):3219–3227.
- Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J., & Baueroová-Hlinková, V. 2022. Glucose oxidase, an enzyme “ferrari”: its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications. *In Biomolecules* 12(3).
- Bobrowska K, Sadowska K & Przeźniak-Welenc M. 2023. Bovine serum albumin – hydroxyapatite nanoflowers as potential local drug delivery system of ciprofloxacin. *International Journal of Nanomedicine* 18(2):6449-6467.
- Busa, L. S. A., Komatsu, T., Mohammadi, S., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., & Tokeshi, M. 2016. 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine oxidation on paper devices for horseradish peroxidase-based assays. *Analytical Sciences* 32(8):815–818.
- Cichello, S. A. 2015. Oxygen absorbers in food preservation: a review. *In Journal of Food Science and Technology* 52(4):1889–1895.
- Hosoda, H., Takasaki, W., Oe, T., Tsukamoto, R., & Nambara, T. 1986. A comparison of chromogenic substrates for horseradish peroxidase as a label in steroid enzyme immunoassay. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 34(10):4177–4182.
- Khrantsov P., Novokshonova A., Galaeva Z., Morozova M., Bezukladnikova T., & Rayev M. 2025. A systematic investigation of tmb substrate composition for signal enhancement in ELISA. *Analytical biochemistry* 704:115908.
- Mahmoudi A., Nazari K., Mohammadian N., & Moosavi-Movahedi A. A. 2003. Effect of Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cu^{2+} on horseradish peroxidase: activation, inhibition, and denaturation studies. *Applied biochemistry and biotechnology* 104(1):81–94.
- Li, M., Su, H., Tu, Y., Shang, Y., Liu, Y., Peng, C., & Liu, H. 2019. Development and application of an efficient medium for chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase. *ACS Omega* 4(3):5459–5470.
- Somturk B., Hancer M., Ocsoy I., & Özdemir N. 2015. Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. *Dalton Transactions* 44(31): 13845-13852.
- Topalá T, Bodoki A and Oprean R. 2014. Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Chujul Medical* 87(4):5.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *In Applied Microbiology and Biotechnology* 78(6):927–938.
- Xu K, Appiah B, Zhang B, Yang Z & Quan C. 2023. Recent advances in enzyme immobilization based on nanoflowers. *Journal of Biocatalysis* 418:31-39.
- Zhou, H., Hu, Y. Y., Tang, Z. X., Jiang, Z. B., Huang, J., Zhang, T., Shen, H. Y., Ye, X. P., Huang, X. Y., Wang, X., Zhou, T., Bai, X. L., Zhu, Q., & Shi, L. E. 2024. calcium transport and enrichment in microorganisms: A Review. *In Foods* 13(22).

INSTRUCTION TO AUTHORS

Manuscripts

- Refer to the journal website for the manuscript template. The page layout has been set in this template. Submitting your manuscript in this format ensures it will be handled in the most efficient manner.
- The Journal publishes manuscripts written in Bahasa Malaysia and English.
- The length of the manuscript must not exceed 8 pages when the template is used. The manuscript should not contain more than a combined total of 8 figures and tables.
- The title of a manuscript should be concise and descriptive, preferably not exceeding 20 words. The title must be provided in both Bahasa Malaysia and English.
 - The main title (Bahasa Malaysia or English, depending on the language of the article) must be written in "Title Case," Times New Roman, bold, centred, 14-point font.
 - The translated title (English or Bahasa Malaysia, depending on the language of the article) must be provided beneath the main title, in "Title Case," in brackets, centred, 12-point font.
- The authors' names must be written in "Title Case," Times New Roman, 12-point font, centred and bold. Add an asterisk after the name of the corresponding author.
- The addresses of all authors and the email address of the corresponding author must be written in Times New Roman, 10-point font, italics.
- The manuscript must include an abstract describing its main points, not more than 200 words, in both Malay and English. If the article is written in Bahasa Malaysia, the Bahasa Malaysia abstract must precede the English abstract. If the article is written in English, the English abstract must precede the Malay abstract. Assistance will be provided by the editorial board for non-Malaysians to prepare the Bahasa Malaysia abstract.
- The abstract should be clear and informative when read in isolation. It should contain the problem statement, research objectives, methodology, results, and conclusion.
- Both abstracts must be single-spaced and in 10-point font.
- Provide 3–5 keywords after the abstract, separated by semicolons.
- Every page of the manuscript, including the references page, should be numbered at the lower right-hand corner.
- The manuscript should be divided into the following sections: 1. Introduction, 2. Materials and Methods, 3. Results and Discussion, Conclusion, Acknowledgements (if any), and References.
- If required, the Results and Discussion sections may be separated.
- The text of the manuscript should be single-spaced, in 11-point Times New Roman.
- Headings of sections should be in Title Case, numbered, bold, and flush left (e.g., 1. Introduction; 2. Materials and Methods).
- Subheadings should be in sentence case, numbered, italics, and flush left.
- The text should begin one line below the section heading/subheading.
- The first paragraph after a heading or subheading should be flush left. The second paragraph should begin with a tab.
- If symbols (e.g., $\times$, μ , η , v , $^{\circ}$) are used, they must be inserted using Word's "Insert Symbol" menu. Use the multiplication symbol ($\times$), not the letter "x" from the keyboard.
- Insert a space between numbers and units (e.g., 3 kg) as well as between numbers and mathematical symbols (+, $-$, $\times$, $=$, $<$, $>$). However, percentages and degrees Celsius should be written as 15% and 30°C, respectively.
- All abbreviations must be spelled out in full when first introduced in the manuscript.
- The conclusion must be written as a single paragraph.

Tables

- Authors should take note of the limitations imposed by the journal's size and layout. Large tables should be avoided.
- Insert each table in the manuscript at the location where the authors wish it to appear.
- Each table should have a brief, self-explanatory title.
- Table titles must be placed above the table, 10-point font, single-spaced, sentence case, bold, and centred. Table contents should be in 10-point font.
- If necessary, footnotes may be provided beneath the table in 10-point font.
- Do not use vertical lines to separate columns.
- Wherever possible, large data sets should be presented as two or more tables for clarity.

- Number tables as Table 1, Table 2, Table 3, ...

Illustrations

- Figures and photographs are to be labelled as Figures. Insert each figure in the manuscript at the location where the authors wish it to appear.
- The title of the illustration must be placed below the illustration, 10-point font, single-spaced, sentence case, bold, and centred.
- The figure legend must be placed beneath the title, 10-point font, single-spaced, sentence case, and centred.
- Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. Each figure should be cited in the text before it appears.
- Line drawings and lettering should be bold enough to allow a reduction of up to 50% (if necessary) without becoming illegible.
- Fonts within illustrations should be standardised.
- Number figures as Figure 1, Figure 2, Figure 3, ...

Scientific Names, Units, Symbols, and Abbreviations

- Provide the complete Latin name (genus, species, and authority) in full for every organism when first mentioned in the text.
- Italicise Latin names of genera and species.
- Units, symbols, and abbreviations: only SI units should be used, e.g., gm (gram), mL (microlitre), kg (kilogram), cm (centimetre), ha (hectare), g (gravity), hr (hour), min (minute), sec (second), °C (centigrade). Centrifugation conditions must be specified in terms of relative centrifugal force (RCF) expressed in units of gravity (times gravity or $\times g$).
- Isotopes should be indicated as ^{14}C , ^{32}P (not C14 or P32), except in phrasing such as “carbon-14”.

References

- All references must follow the latest UKM reference style.
- The font size for the References section is 10-point.
- When multiple references are cited together in the text, arrange them alphabetically, not chronologically.
- References to unpublished work and personal communications should be kept to a minimum.
- All references cited in the text must appear in the References section, and all references listed must be cited in the text.
- The number of references must not exceed 25, and the majority should be recent publications (within the last ten years).
- In-text citations should be given in parentheses, e.g., (Child 2016; Smith & Cohen 2007; Yoshi et al. 2003), except when the author is mentioned in the sentence, e.g., “the study of Marion and Rooney (2015) and Muhammad et al. (2014)”.
- The reference list should be arranged alphabetically by authors’ surnames, and chronologically for each author.
- Papers with single authorship should be listed before joint authorship for the same author.
- Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2009a, 2009b, etc.
- Journal names should be written in full.
- Use the following system to arrange your references:

Periodicals

Amore, M.S. & Ariff, A.B. 2013. The treatment of oil palm empty fruit bunch fiber for subsequent use as substrate for cellulase production by *Chaetomium globosum* Kunze. *Bioresource Technology* 62: 1–9.

Matthew, N.M.E., Visser, J. & de Graaff, L.H. 2008. Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology* 27(1): 131–142.

Kuyau, A., Brown, B., Longbottom, A.B., Potter, I. & Gringer, M.N. 2003. Pelaksanaan sistem pengurusan keselamatan dan kesihatan pekerjaan (OHSAS 18001:1999) di Malaysia: isu dan cabaran. *Prosiding Pengurusan Persekitaran 2003*, pp. 107–115.

Yeo, S.L., Shazilah, K., Suhaila, S., Abu Bakar, F.D. & Murad, A.M.A. 2014. In-silico analysis of *Aspergillus niger* beta-glucosidases. *AIP Conference Proceedings — The 2014 UKM FST Postgraduate Colloquium* 1614: 537–543.

Books and Book Chapters

Corcoran, K. & Fischer, J. 2007. *Measures for Clinical Practice: Source Book*. New York: The Free Press.

Fleishman, I.A. 2011. Twenty years of consideration and structure. In Fleishman, I.A. & Hunt, J.G. (eds.). *Current Development in the Study of Leadership: Selected Readings*, pp. 1–37. Carbondale: Southern Illinois University Press.

Thesis and Online Article

Azitra Salam. 1999. Kerjasama dan potensi konflik dalam hubungan Indonesia–Malaysia 1966–1991. Thesis Dr. Phil, History Department, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Medical Information Group. 2008. Arsenic contamination of drinking water. <http://www.angelfire.com/ak/medinet/arsenic.html> [accessed 4 July 2000].

Language and Editing

- Manuscripts containing many English typographical errors will not be published. Authors from non-English-speaking countries who have poor written English are advised to contact a professional language-editing company prior to submitting their manuscript to the journal. Manuscripts accepted for publication on condition that the English be corrected must provide proof from a professional language-editing company to ensure the manuscript is free from English typographical errors.

Publication Fee

- The publication fee is sponsored by the Department of Biological Sciences and Biotechnology for manuscripts submitted by authors under the Department
- For non-department authors, upon acceptance of the manuscript for publication, the corresponding author is required to remit RM200.00 to the Chief Editor. Payment should be made in favour of **BENDAHARI UKM**.

Galley Proofs

- When proofs are received, they should be corrected and returned to the Editor within 7 days. No changes other than editorial corrections will be permitted at this stage.

Submission of Articles

- Two potential reviewers should be suggested upon submission of the article. Manuscripts together with a cover letter should be emailed to: **urjbsbt@ukm.edu.my**

Dr. Mohammad Saiful Mansor

Department of Biological Sciences and Biotechnology
Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi
Selangor, MALAYSIA
Tel: +603 89215954
Email: **urjbsbt@ukm.edu.my**