

Volume 1
August 2026

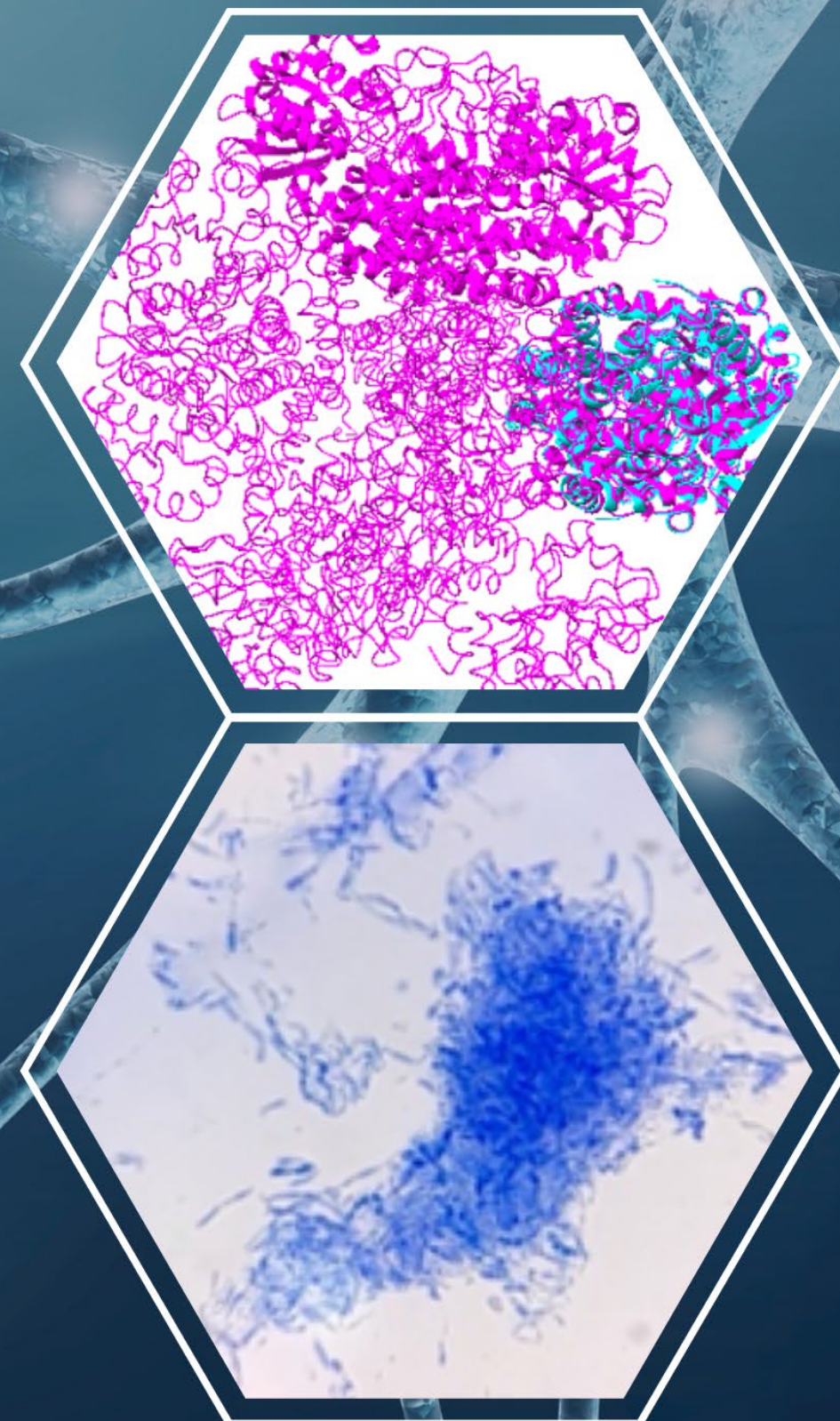
Undergraduate Research Journal for
**Biological Sciences and
Biotechnology**

Jurnal Penyelidikan Prasiswazah
Sains Biologi dan Bioteknologi



Undergraduate Research Journal for Biological Sciences and Biotechnology Jurnal Penyelidikan Prasiswazah Sains Biologi dan Bioteknologi Volume 1 August 2026

eISSN 3120-306X
Published by
Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia



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 All submissions undergo peer review by referees appointed by the Editorial Board, and only original, previously unpublished work will be accepted.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: Sylvia Chieng and Nazlina Ibrahim

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	Penentuan Aktiviti Antifungi bagi Ekstrak Gaharu <i>Aquilaria malaccensis</i> daripada Aruhan Berbeza <i>Abdul Hakimie Abdul Rahman, Yashirdisai Sampasivam & Roohaida Othman</i>	1-9
2	Analisis in silico IlvC sebagai Sasaran Terapeutik Baru dalam <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Fathin Ardini Amran, Sofea Mohd Nizam, How Shu Sian & Sylvia Chieng</i>	10-16
3	Keberkesanan Mikrob daripada Bahan Buangan Kuda dalam Meningkatkan Pertumbuhan Pokok Bayam (<i>Amaranthus viridis</i>) <i>Muhammad Afif Luqman Shamshudin & Nazlina Ibrahim</i>	17-29
4	Pengenalpastian Spesies Kulat Penyebab Biodeteriorasi Bangunan Sains Kimia, Universiti Kebangsaan Malaysia <i>Nurul Wahidah Md Nadzari & Izwan Bharudin</i>	30-38
5	Analisis Kajian Sistemik Gen UCP1, PRDM16 dan MT-ND1 terhadap Penyakit Distrofi Otot <i>Shahrul Hisham Z.A., 'Alya Natasya M.R., Puteri Qurratul Aini A.M, Rohaya Megat A.W. & Intan Zarina Z.A.</i>	39-47
6	Kesan Tekanan Osmotik Terhadap Perubahan Ciri Morfo-Fisiologi dalam Transgenik Arabidopsis yang membawa Pengekspresan Terlampau Gen <i>OsSAP4</i> yang mengalami Mutasi Domain A20/AN1 <i>Diana Atira Rohaimi & Nurulhikma Md Isa</i>	48-54
7	Pengekspresan <i>OsABP57</i> yang Berlebihan Meningkatkan Ketahanan Arabidopsis terhadap Tekanan Rendaman <i>Muhammad Fahmi Razuki, Farah Afiqah Baharuddin & Noor Liyana Sukiran</i>	55-62
8	Cellulase from <i>Bacillus subtilis</i> SUNGB2: Characterisation of a Potential Industrial Biocatalyst <i>Yasheega Chemis, Nadiah Mohd Najmi Nagen, Vironica Winson & Izyanti Ibrahim</i>	63-71
9	Effect of Processing Methods (Fresh, Roasted, and Fermented) on the Phytochemical Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxic Potential of <i>Allium sativum</i> <i>Shasvena Kaur & Fariza Juliana Nordin</i>	72-79
10	Pengenalpastian Molekul dan Keupayaan Antioksidan Ekstrak Rumpai Laut Merah <i>Gracilaria</i> spp. <i>Sharmin Balqis Zahid, Suriyanti Su & Herryawan Ryadi Eziwar Dyari</i>	80-87
11	Instructions for Authors	88

Penentuan Aktiviti Antifungi Bagi Ekstrak Gaharu *Aquilaria malaccensis* Daripada Aruhan Berbeza

(Determination of the Antifungal Activity for Extracts of *Aquilaria malaccensis* Agarwood from Different Inductions)

Abdul Hakimie Abdul Rahman¹, Yashirdisai Sampasivam² & Roohaida Othman^{1,2*}

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

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

*E-mel pengarang koresponden: roohaida@ukm.edu.my

Abstrak: Gaharu *Aquilaria malaccensis* telah digunakan dengan meluas dalam perubatan tradisional, upacara keagamaan, industri kosmetik dan industri minyak wangi. Gaharu yang dihasilkan oleh *A. malaccensis* mengandungi pelbagai metabolit sekunder yang menyumbang kepada aktiviti biologi spesies ini dalam perubatan tradisional. Justeru, kajian ini dijalankan bertujuan untuk menentukan aktiviti antifungi bagi ekstrak gaharu *A. malaccensis* daripada aruhan semula jadi dan buatan terhadap *Candida albicans* dan *Aspergillus* sp. Hasil kajian menunjukkan bahawa ekstrak etanol gaharu aruhan semula jadi dan ekstrak kloroform gaharu aruhan buatan menghasilkan peratus kembalikan pengekstrakan tertinggi. Ekstrak etanol gaharu aruhan semula jadi dan buatan menunjukkan zon perencatan tertinggi terhadap *C. albicans*, manakala ekstrak etil asetat gaharu aruhan semula jadi dan ekstrak kloroform gaharu aruhan buatan menunjukkan zon perencatan yang tertinggi terhadap *Aspergillus* sp. Penentuan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) menunjukkan ekstrak kloroform gaharu bagi kedua-dua aruhan menghasilkan nilai IC₅₀ terendah terhadap kedua-dua kulat yang diuji. Nilai MIC dan kepekatan fungisidal minimum (MFC) menunjukkan ekstrak *A. malaccensis* aruhan semula jadi dan buatan cenderung bersifat fungistatik terhadap *C. albicans*, manakala ekstrak etil asetat gaharu aruhan semula jadi pada kepekatan 2 mg/mL menunjukkan kesan fungisidal terhadap *Aspergillus* sp. Hasil kajian ini berpotensi menyumbang kepada peningkatan inovasi rawatan antifungi terutamanya yang berasaskan ekstrak tumbuhan.

Keywords: Antifungi; *Aquilaria malaccensis*; ekstrak gaharu; aruhan semula jadi; aruhan buatan

Abstract: Agarwood from *Aquilaria malaccensis* has been used extensively in traditional medicine, religious ceremonies, and cosmetic and perfume industries. Agarwood produced by *A. malaccensis* contains various secondary metabolites that contribute to the biological activities of this species in traditional medicine. Therefore, this study was conducted with the aim to determine the antifungal activity of agarwood extracts of *A. malaccensis* from natural and artificial inductions against *Candida albicans* and *Aspergillus* sp.. The results showed that the ethanol extract of naturally induced agarwood and the chloroform extract of artificially induced agarwood produced the highest extraction percentages. Ethanol extracts of both naturally and artificially induced agarwoods showed the highest inhibition zones against *C. albicans*, while the ethyl acetate extract of naturally induced agarwood and the chloroform extract of artificially induced agarwood showed the highest inhibition zones against *Aspergillus* sp.. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) value showed that chloroform extracts of both inductions produced the lowest IC₅₀ values against both tested fungi. The MIC and minimum fungicidal concentration (MFC) values showed that *A. malaccensis* extracts from both natural and artificial inductions tended to be fungistatic against *C. albicans*, while ethyl acetate extract of naturally induced agarwood at concentration of 2 mg/mL showed fungicidal effect against *Aspergillus* sp. The results of this study have the potential to contribute towards the improvement of antifungal treatment innovations, especially those based on plant extracts.

Kata kunci: Antifungal; *Aquilaria malaccensis*; agarwood extract; naturally induced; artificially induced

1. Pendahuluan

Aquilaria malaccensis atau lebih diketahui umum sebagai pokok karas ialah sejenis spesies dari famili Thymelaeaceae yang mampu tumbuh melebihi 15 hingga 30 meter tinggi. Pokok *A. malaccensis* memerlukan keadaan ekologi tertentu untuk bertumbuh iaitu di kawasan tanah beralun pada altitud di antara 200 hingga 700 meter daripada aras laut dengan suhu di antara 14°C hingga 28°C dan taburan hujan tahunan daripada 1,500 hingga 6,500 mm (Roohaida & Afiq Adham 2022). Populasi *A. malaccensis* semakin terancam disebabkan oleh permintaan yang tinggi dan harga jualan gaharu semakin meningkat iaitu sebanyak USD6 hingga USD8 bilion setiap tahun di pasaran global (Baig, Akram & Lin 2025). Akibatnya, pokok ini telah disenaraikan sebagai spesies terancam dalam Senarai Merah di bawah Kesatuan Antarabangsa untuk Pemuliharaan Alam Sekitar (IUCN) dan dilindungi dari segi perdagangan di bawah Konvensyen Perdagangan Antarabangsa Spesies Fauna dan Flora Liar yang Terancam (CITES) (Ramli et al. 2022).

Gaharu boleh terbentuk dalam batang pokok *A. malaccensis* apabila berlaku kecederaan yang disebabkan oleh proses semula jadi atau diaruh secara buatan (Ramli et al. 2022). Kecederaan secara semula jadi boleh berlaku akibat serangan mikrob, gigitan serangga, sambaran petir dan angin kencang yang menyebabkan batang pokok patah atau kulit pokok merekah. Keadaan ini merangsang tindak balas pertahanan pokok yang turut menyebabkan penghasilan gaharu sebagai mekanisme perlindungan (Chhipa & Kaushik 2017). Aruhan secara buatan dihasilkan melalui kecederaan fizikal dengan menggali lubang pada pokok dengan cara memaku, mengapak, pembakaran, penebukan menggunakan alat tajam, mematahkan batang dan penyingkiran kulit kayu yang teruk, atau secara kimia melalui perlakuan menggunakan bahan kimia tertentu.

Kesan buruk rintangan antimikrob (AMR) kini semakin meningkat di seluruh dunia dan telah menjadi cabaran kesihatan global yang menyebabkan mikroorganisma seperti virus, bakteria, kulat, protozoa dan parasit dapat hidup serta memandiri di dalam sel hos walaupun selepas didedahkan kepada bahan antimikrob. Rintangan antimikrob menyebabkan sekitar 1.2 juta kematian pada tahun 2019 dan jumlah kematian dijangka meningkat kepada 10 juta menjelang tahun 2050 (Ahmed et al. 2024). Pelbagai ekstrak daripada produk semula jadi telah dikaji dan digunakan untuk merawat pelbagai jenis penyakit mikrob seperti penyakit berjangkit yang disebabkan oleh mikroorganisma (Vaou et al. 2021).

Ekstrak daripada gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi mahupun buatan mampu mendatangkan banyak kebaikan dan telah digunakan dalam industri kosmetik, upacara keagamaan dan industri minyak wangi. Sementara itu, minyak pati gaharu sering digunakan oleh masyarakat dalam perubatan tradisional seperti merawat reumatisma, asma, masalah kolik dan cirit birit serta barah dalam kalenjar tiroid (Roohaida & Afiq Adham 2022). Kajian yang telah dijalankan menunjukkan beberapa aktiviti biologi *A. malaccensis* antaranya sebagai bahan antioksidan, antimikrob, antidiabetik dan antikanser. Ekstrak daun *A. malaccensis* mengandungi pelbagai sebatian bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan resin aromatik yang telah terbukti memiliki aktiviti antimikrob (Batubara, Hanum & Surjanto 2018; Batubara et al. 2021). Namun begitu, kajian yang melibatkan kayu gaharu itu sendiri masih amat terhad. Justeru, kajian ini adalah bertujuan mengkaji aktiviti antifungi bagi ekstrak dari gaharu *A. malaccensis* aruhan semula jadi dan buatan terhadap *Candida albicans* dan *Aspergillus* sp.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Serbuk Batang *A. malaccensis*

Gaharu daripada batang pokok *A. malaccensis* aruhan semula jadi dan buatan diperoleh daripada syarikat Wafiqah Plantation & Services yang terletak di Hulu Langat, Selangor (3° 7' 0" Selatan, 101° 51' 0" Timur). Bahagian batang pokok yang mengandungi gaharu diasingkan dengan menggunakan pahat, penukul dan pisau kecil. Seterusnya, sampel ini dihantar untuk diproses dengan pengeringan sejuk beku untuk memastikan bahan bioaktif di dalam kayu tidak rosak. Sampel dikisar menjadi serbuk bersaiz lebih kurang 0.5 mm dengan menggunakan mesin pengisar (Fritsch Pulverisette 19, FST UKM). Setelah itu, sampel yang telah dikisar dilabel mengikut jenis aruhan iaitu semula jadi dan buatan, seterusnya disimpan dalam bekas tertutup pada suhu bilik.

2.2 Mikroorganisma *C. albicans* dan *Aspergillus* sp.

Dua jenis mikroorganisma yang digunakan di dalam kajian ini ialah *C. albicans* UKMCC3001 dan *Aspergillus* sp. UKMCC2032 diperoleh dari Universiti Kebangsaan Malaysia Culture Collection Center (UKMCC). Semua strain mikroorganisma ditumbuhkan pada piring agar *potato dextrose* (PDA) lalu dieram pada suhu 30°C selama 24 hingga 72 jam. Koloni *C. albicans* diinokulasi ke dalam 10 mL media kaldu *potato dextrose* (PDB) dan dieram selama 24 jam pada suhu 30°C. Suspensi spora *Aspergillus* sp. disediakan dengan penambahan 5 mL air suling steril dan 0.1% Tween-80 ke atas piring agar yang mengandungi *Aspergillus* sp. yang telah disubkultur. Kultur pengasingan mikroorganisma dicairkan menggunakan media kaldu *potato dextrose* untuk *C. albicans* dan air suling steril untuk *Aspergillus* sp. untuk memperoleh inokulum 10^4 CFU/mL (Bhattacharya et al. 2019; Jihadi et al. 2020; Reddy & Nancharaiah 2020).

2.3 Pengekstrakan Gaharu Menggunakan Pelarut Berbeza

Pengekstrakan serbuk gaharu dilakukan daripada batang pokok *A. malaccensis* berdasarkan kaedah daripada Gao et al. (2014) yang telah diubahsuai mengikut kesesuaian kajian. Sebanyak 10 g serbuk batang diekstrak secara berasingan menggunakan 200 mL pelarut etanol, heksana, kloroform dan etil asetat pada nisbah pepejal kepada cecair 1 g serbuk kepada 20 mL pelarut dalam kelalang dasar bulat 2 L. Kemudian, campuran pelarut dan serbuk gaharu dicampur dan direndam dalam gelap selama 24 jam pada suhu bilik. Seterusnya, ekstrak dikeringkan menjadi pekat dengan menggunakan penyejat vakum berputar pada suhu 50°C dan dipindahkan ke dalam tiub 1.5 mL. Kemudian, ekstrak dikeringkan hingga menjadi serbuk menggunakan alat penyejat vakum pada suhu 50°C. Akhir sekali, ekstrak disimpan pada -80°C sehingga analisis seterusnya. Untuk kajian seterusnya, ekstrak kering telah dilarutkan semula dalam metanol.

2.4 Kaedah Resapan Cakera

Kaedah resapan cakera dijalankan menurut Jawatankuasa Eropah mengenai Ujian Kerentanan Antimikrob (EUCAST) serta menurut kaedah lepas (Qiao et al. 2013; Batubara et al. 2021; Jihadi et al. 2020) dengan sedikit pengubahsuaian, kultur mikroorganisma dengan kepekatan 10^4 CFU/mL dipindahkan dan disebar secara aseptik pada permukaan piring agar dengan menggunakan swab kapas. Cakera kertas dengan diameter 6 mm (Whatman No. 1, 102 Qualitative Middle Rate) diletakkan pada permukaan agar. Sebanyak 10 μ L ekstrak gaharu pada kepekatan 2 mg/mL dipindahkan dan dibiarkan meresap pada cakera hingga kering. Nistatin (100 μ g per cakera) digunakan sebagai kawalan positif, manakala metanol 100% (Chemiz, Malaysia) digunakan sebagai kawalan negatif. Langkah ini perlu diulang sebanyak 3 kali dan dieram pada suhu 30°C selama 2 hingga 7 hari.

2.5 Penentuan Diameter Zon Perencatan

Zon perencatan ialah kawasan jernih di sekitar cakera yang tidak mengandungi sebarang pertumbuhan mikroorganisma. Kawasan ini dapat diperhatikan dan diukur dari satu bahagian hujung zon ke hujung bertentangan menggunakan pembaris dalam unit mm.

2.6 Pengukuran Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)

Nilai MIC ditentukan melalui kaedah teknik *broth microdilution* yang menggunakan plat mikro 96-telaga (Wiegand, Hilpert & Hancock 2008). Sebanyak 100 μ L larutan ekstrak gaharu *A. malaccensis* pada kepekatan 2 mg/mL dimasukkan ke dalam telaga kolom 2 plat mikro 96-telaga. Telaga kolom 3 hingga kolom 11 adalah telaga yang digunakan untuk pencairan bersiri ekstrak uji sebanyak 50% menggunakan media kaldu *potato dextrose* (PDB). Sebanyak 100 μ L inokulum mikroorganisma awal dengan kepekatan 10^4 CFU/mL ditambah ke dalam setiap telaga dan larutan media tanpa ekstrak digunakan sebagai kawalan negatif. Telaga pada kolom 12 yang mengandungi inokulum mikroorganisma dan media PDB digunakan sebagai kawalan positif. Kemudian, plat dieram pada

suhu 30°C selama 24 hingga 48 jam. Peratus perencatan dikira berdasarkan bacaan spektrofotometer setiap telaga pada panjang gelombang 600 nm dengan menggunakan spektrofotometer plat mikro TECAN Infinite F50 (Kadeřábková, Mahmood & Mavridou 2024). Peratus perencatan dikira bagi setiap kepekatan menggunakan persamaan:

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

2.7 Pengukuran Kepekatan Fungisidal Minimum (MFC)

Nilai MFC dapat diukur menggunakan kaedah yang telah dilaporkan sebelum ini daripada Panda, Brahma dan Dutta (2010) dengan modifikasi mengikut kesesuaian kajian dengan meletakkan 10 µL mikroorganisma daripada setiap telaga yang diperoleh daripada ujian MIC ke atas piring PDA yang berusia 1 hari. Seterusnya, piring agar yang mengandungi mikroorganisma dieram pada suhu 30°C selama 24 hingga 48 jam. Ukuran MFC diukur pada kepekatan ekstrak yang paling rendah yang menyebabkan tiada pertumbuhan koloni mikroorganisma pada piring agar nutrien.

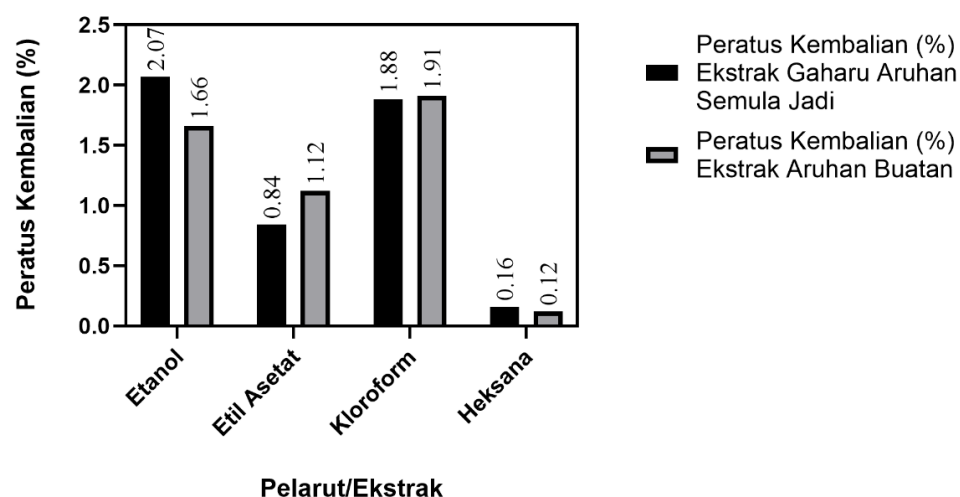
2.8 Analisis Statistik

Analisis statistik dan pembinaan graf dilakukan dengan menggunakan perisian GraphPad Prism versi 10.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Pengekstrakan Gaharu Menggunakan Pelarut Berbeza

Hasil pengekstrakan gaharu *A. malaccensis* menggunakan empat jenis pelarut yang mempunyai tahap polariti yang berbeza yang diperoleh ditunjukkan dalam bentuk peratus kembalian (Rajah 1). Peratus kembalian yang tertinggi bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi ialah ekstrak etanol iaitu sebanyak 2.07% berbanding ekstrak kloroform (1.88%), etil asetat (0.84%) dan heksana (0.16%). Di sudut lain, peratus kembalian yang tertinggi bagi ekstrak gaharu aruhan buatan ialah ekstrak kloroform iaitu sebanyak 1.91% berbanding ekstrak etanol (1.66%), etil asetat (1.12%) dan heksana (0.12%).



Rajah 1. Hasil peratus kembalian ekstrak gaharu aruhan semula jadi dan buatan.

Kajian lepas daripada Hendra, Moeljopawiro dan Nuringtyas (2016) mendapati pelarut polar merupakan pelarut yang berkesan untuk pengekstrakan *A. malaccensis* kerana hasil ekstrak yang diperoleh adalah lebih tinggi berbanding pelarut tidak polar lain seperti kloroform. Hasil ini disokong dengan kajian Ramli et al. (2018) yang menggunakan kaedah pengekstrakan Soxhlet dan mendapati ekstrak etanol daripada daun *A. malaccensis* menghasilkan peratus kembalian minyak tertinggi iaitu

sebanyak 45.66% berbanding air (25.12%) dan n-heksana (14.06%).

Namun begitu, peratus kembalian ekstrak gaharu aruhan buatan menghasilkan keputusan yang berbeza iaitu ekstrak kloroform gaharu menghasilkan peratus kembalian tertinggi. Keadaan ini dipengaruhi oleh perbezaan polariti pelarut dan komposisi kimia dalam gaharu aruhan buatan. Kloroform merupakan pelarut yang bersifat sedikit polar berupaya untuk melarutkan metabolit sekunder bersifat sedikit polar yang berpotensi hadir dalam kayu gaharu aruhan buatan (Millaty et al. 2020).

3.2 Penentuan Diameter Zon Perencatan

Hasil min diameter zon perencatan bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi dapat diperhatikan dalam Jadual 1. Min diameter zon perencatan yang tertinggi bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi terhadap *C. albicans* ialah bagi ekstrak etanol manakala terhadap *Aspergillus* sp. ialah bagi ekstrak etil asetat.

Jadual 1. Min diameter zon perencatan bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi.

Ekstrak / Kawalan	Min Diameter Zon Perencatan (mm) $\pm$ Sisihan piawai (SD)	
	<i>C. albicans</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Etanol	7.30 $\pm$ 0.52	7.27 $\pm$ 0.32
Etil Asetat	7.13 $\pm$ 0.21	7.80 $\pm$ 0.53
Kloroform	6.90 $\pm$ 0.30	7.77 $\pm$ 0.35
Heksana	6.37 $\pm$ 0.15	7.10 $\pm$ 0.40
Nistatin 100 μ g (Kawalan Positif)	26.33 $\pm$ 1.20	21.67 $\pm$ 3.06
Metanol 100% (Kawalan Negatif)	6.47 $\pm$ 0.64	6.3 $\pm$ 0.10

Hasil min diameter zon perencatan bagi ekstrak gaharu aruhan buatan dapat diperhatikan dalam Jadual 2. Min diameter zon perencatan yang tertinggi bagi ekstrak gaharu aruhan buatan terhadap *C. albicans* ialah bagi ekstrak etanol manakala terhadap *Aspergillus* sp. ialah bagi ekstrak kloroform.

Jadual 2. Min diameter zon perencatan bagi ekstrak gaharu aruhan buatan.

Ekstrak / Kawalan	Min Diameter Zon Perencatan (mm) $\pm$ Sisihan piawai (SD)	
	<i>C. albicans</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Etanol	8.07 $\pm$ 0.40	7.33 $\pm$ 0.15
Etil Asetat	7.87 $\pm$ 0.15	7.17 $\pm$ 0.74
Kloroform	7.20 $\pm$ 0.30	7.37 $\pm$ 0.51
Heksana	7.37 $\pm$ 0.3	7.23 $\pm$ 0.62
Nistatin 100 μ g (Kawalan Positif)	25.33 $\pm$ 0.58	24.67 $\pm$ 2.08
Metanol 100% (Kawalan Negatif)	7.20 $\pm$ 0.35	6.77 $\pm$ 0.59

Namun begitu, perbandingan dengan kajian lepas sukar dilakukan disebabkan tiada kajian yang dilaporkan berkenaan penentuan zon perencatan ke atas fungi yang menggunakan ekstrak gaharu *A. malaccensis*. Terdapat dua faktor yang mempengaruhi keputusan ujian ini iaitu struktur dinding sel kedua-dua kulat dan komponen sebatian bioaktif yang boleh merencat pertumbuhan fungi yang dihasilkan oleh ekstrak. Kajian Batubara et al. (2021) menunjukkan zon perencatan pertumbuhan *C. albicans* yang mempunyai dinding sel nipis adalah lebih tinggi berbanding *Tricophyton* sp. Dalam kajian ini, dinding sel *Acinetobacter baumannii* yang lebih nipis akan lebih mudah ditembusi oleh sebatian bioaktif dalam ekstrak gaharu berbanding *Aspergillus* sp. yang mempunyai dinding sel yang lebih tebal dan kompleks.

Selain itu, pelarut yang mempunyai tahap polariti yang hampir sama dengan bahan terlarut akan melarutkan lebih banyak bahan aktif berbanding pelarut dengan polariti yang berbeza (Zhang, Lin & Ye 2018). Etanol merupakan pelarut bersifat polar yang berupaya melarutkan metabolit

sekunder bersifat polar seperti sebatian flavonoid dan tanin yang berpotensi hadir (Batubara et al. 2021). Etil asetat yang bersifat separa polar juga berupaya melarutkan metabolit sekunder seperti sebatian flavonoid (Kasmiyati et al. 2021). Manakala, kloroform yang bersifat sedikit polar dapat melarutkan metabolit sekunder seperti alkaloid dan terpenoid yang berpotensi hadir (Hendra, Moeljopawiro & Nuringtyas 2016). Metabolit sekunder ini berpotensi untuk bertindak sebagai sebatian bioaktif yang berperanan dalam merencat pertumbuhan kulat.

3.3 Pengukuran Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)

Hasil nilai IC_{50} dan nilai kepekatan yang mampu merencat 50% pertumbuhan kulat bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi dan buatan dapat diperhatikan dalam Jadual 3. Nilai IC_{50} terendah bagi kedua-dua aruhan diperoleh daripada ekstrak kloroform. Secara keseluruhan, kepekatan yang diperlukan untuk merencat 50% pertumbuhan *Aspergillus* sp. adalah lebih tinggi berbanding *C. albicans*.

Jadual 3. Nilai IC_{50} (mg/mL) dan Nilai Kepekatan Minimum (mg/mL) bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi dan buatan terhadap *C. albicans* dan *Aspergillus* sp.

Ekstrak	Aruhan	Nilai IC_{50} (mg/mL)		Nilai Kepekatan Minimum (mg/mL)	
		<i>C. albicans</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Etanol	Semula Jadi	0.78	0.77	1.00	2.00
Etil Asetat	Semula Jadi	0.65	0.69	1.00	2.00
Kloroform	Semula Jadi	0.56	0.60	1.00	2.00
Heksana	Semula Jadi	0.63	0.82	1.00	2.00
Etanol	Buatan	0.86	0.76	1.00	2.00
Etil Asetat	Buatan	0.76	0.61	1.00	2.00
Kloroform	Buatan	0.61	0.46	1.00	2.00
Heksana	Buatan	0.83	0.79	1.00	2.00

Perbezaan struktur dan komponen dinding sel bagi kedua-dua mikroorganisma menjadi faktor utama yang menyumbang kepada perbezaan nilai MIC yang diperhatikan. Memandangkan tiada kajian lepas berkenaan pengukuran kepekatan perencatan minimum (MIC) menggunakan ekstrak gaharu *A. malaccensis*, hasil kajian ini dibandingkan dengan kajian lepas berkenaan ekstrak minyak pati daripada daun *A. malaccensis* yang nilai MIC ke atas *C. albicans* ialah 62.50 μ L/mL (Unver, Özalp Erenler & Kiran 2025). Kajian yang menggunakan ekstrak daun *A. malaccensis* yang dikeringkan secara semburan mendapati nilai MIC ekstrak ke atas *Aspergillus niger* ialah melebihi 128 mg/mL (Hui & Talip 2022). Walaupun menggunakan kaedah ekstrak yang berbeza, perbezaan dapat diperhatikan iaitu *C. albicans* mempunyai tahap ketahanan yang lebih rendah terhadap ekstrak daun *A. malaccensis* berbanding *Aspergillus* sp. yang memerlukan kepekatan ekstrak yang lebih tinggi untuk merencat pertumbuhannya.

Dalam kajian ini, dinding sel yang berbeza antara kedua-dua kulat yang dikaji boleh mempengaruhi ketahanan kulat terhadap ekstrak gaharu *A. malaccensis* serta mempengaruhi nilai kepekatan perencatan minimum. Komponen dan struktur yang membentuk dinding sel *Aspergillus* sp. akan membuatkan dinding selnya menjadi lebih tebal dan sukar ditembusi berbanding dinding sel *C. albicans*. Perbezaan ini menjadi faktor utama yang menyumbang kepada perbezaan nilai MIC yang diperhatikan.

3.4 Pengukuran Kepekatan Fungisidal Minimum (MFC)

Hasil MFC bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi dan buatan dapat diperhatikan dalam Jadual 4. Bagi gaharu aruhan semula jadi, ekstrak etanol, etil asetat dan kloroform menunjukkan nilai MFC terhadap *C. albicans* pada kepekatan 1 mg/mL, manakala ekstrak etil asetat menunjukkan aktiviti fungisidal terhadap *Aspergillus* sp. pada kepekatan 2 mg/mL. Bagi gaharu aruhan buatan, ekstrak etanol dan etil asetat menunjukkan aktiviti fungisidal terhadap *C. albicans* dan *Aspergillus* sp. pada

kepekatan 2 mg/mL.

Dalam kajian ini, hasil yang diperoleh bagi ekstrak etil asetat gaharu aruhan semula jadi terhadap *Aspergillus* sp. menunjukkan nilai MIC yang sama dengan MFC. Hal ini menunjukkan ekstrak etil asetat aruhan semula jadi pada kepekatan 2 mg/mL bersifat fungisidal terhadap *Aspergillus* sp. kerana mampu untuk membunuh kulat secara keseluruhan. Kajian Jihadi et. al (2020) menunjukkan nilai MFC bagi ekstrak etanol daun *A. malaccensis* ialah 64 mg/mL terhadap *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Sebaliknya, nilai MFC untuk *Acinetobacter baumannii baumannii* dan *K. pneumoniae* ATCC 10031 ialah lebih rendah iaitu 32 mg/mL yang menunjukkan kedua-dua strain ini lebih mudah terkesan terhadap ekstrak etanol daun *A. malaccensis*.

Jadual 4. Nilai MFC (mg/mL) bagi ekstrak gaharu aruhan semula jadi dan buatan terhadap *C. albicans* dan *Aspergillus* sp.

Ekstrak	Aruhan	Kepekatan Fungisidal Minimum (mg/mL)	
		<i>C. albicans</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Etanol	Semula Jadi	1.00	Tiada
Etil Asetat	Semula Jadi	1.00	2.00
Kloroform	Semula Jadi	1.00	Tiada
Heksana	Semula Jadi	Tiada	Tiada
Etanol	Buatan	2.00	2.00
Etil Asetat	Buatan	2.00	2.00
Kloroform	Buatan	Tiada	Tiada
Heksana	Buatan	Tiada	Tiada

Berdasarkan kesemua ujian antifungi, ekstrak gaharu aruhan semula jadi berjaya menunjukkan keputusan yang lebih konsisten dan berkesan dalam merencat pertumbuhan *C. albicans* dan *Aspergillus* sp. berbanding ekstrak gaharu aruhan buatan. Namun begitu, gaharu aruhan buatan masih menunjukkan aktiviti antifungi yang lebih baik berbanding ekstrak daun dari kajian lepas. Secara keseluruhan, hasil yang diperoleh menunjukkan bahawa gaharu aruhan semula jadi mempunyai potensi yang lebih tinggi sebagai agen antifungi berbanding gaharu aruhan buatan namun ia mempunyai kelebihan dari segi tempoh masa pembentukan gaharu yang lebih singkat dan kos pengeluaran yang lebih rendah berbanding gaharu aruhan semula jadi.

4. Kesimpulan

Dalam kajian ini, ekstrak *A. malaccensis* aruhan semula jadi dan buatan menunjukkan aktiviti antifungi yang berbeza bergantung kepada jenis pelarut dan spesies kulat yang diuji. Kesemua ujian antifungi iaitu ujian resapan cakera, ujian MIC dan MFC mendapati bahawa ekstrak gaharu *A. malaccensis* yang diekstrak menggunakan pelarut berbeza mampu untuk menunjukkan aktiviti antifungi terhadap *Aspergillus* sp. Namun begitu bagi *C. albicans*, kesemua ekstrak gaharu *A. malaccensis* menunjukkan aktiviti antifungi kecuali ekstrak heksana gaharu aruhan semula jadi dan ekstrak kloroform gaharu aruhan buatan. Secara umum, faktor yang mempengaruhi keputusan ujian ini ialah struktur dinding sel kedua-dua kulat dan kemungkinan komponen sebatian bioaktif yang berpotensi merencat pertumbuhan mikrob yang dihasilkan oleh ekstrak.

Penghargaan

Penyelidikan ini telah dibiaya oleh geran FGRS/1/2021/WAB04/UKM/02/2 dari Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia. Penghargaan juga ditujukan kepada pegawai sains di Fakulti Sains dan Teknologi dan staf Makmal Genomik INBIOSIS yang telah memberikan banyak bimbingan, tunjuk ajar dan kesabaran sepanjang tempoh pelaksanaan kajian ini.

Rujukan

- Ahmed, S.K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R.H., Fareeq, A., Mahmood, K.A. & Mohamed, M.G. 2024. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health* 2(1): 1-9.
- Baig, A., Akram, A. & Lin, M.K. 2025. Agarwood in the modern era: Integrating biotechnology and pharmacology for sustainable use. *International Journal of Molecular Sciences* 26(17): 1-21.
- Batubara, R., Hanum, T.I. & Surjanto. 2018. Phytochemical and tannin content in two species of agarwood leaves from Mandailing Natal Regency North Sumatera Province. *AIP Conference Proceedings* 2049(1): 1-5.
- Batubara, R., Wirjosentono, B., Siregar, A., Harahap, U. & Tamrin, T. 2021. Bioactive compounds of ethanol extract from agarwood leaves (*Aquilaria malaccensis*) and antimicrobial activity against bacteria and fungi growing on the skin. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 22(5): 2284-2290.
- Bhattacharya, A., Mathur, M., Kumar, P. & Malik, A. 2019. Potential role of N-acetyl glucosamine in *Aspergillus fumigatus*-assisted *Chlorella pyrenoidosa* harvesting. *Biotechnology for Biofuels* 12(178): 1-17.
- Chhipa, H. & Kaushik, N. 2017. Fungal and bacterial diversity isolated from *Aquilaria malaccensis* tree and soil, induces agarospirol formation within 3 months after artificial infection. *Front Microbiol* 8(1286): 1-12.
- 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.
- Hendra, H., Moeljepawiro, S. & Nuringtyas, T.R. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) leaves. *AIP Conference Proceedings* 1775(1): 1-9.
- Hui, H.X. & Talip, B.A. 2022. Antimicrobial properties and microbiological shelf-life of *Aquilaria malaccensis* spray dried leaf extract powder. *Enhanced Knowledge in Sciences and Technology* 2(2): 78-88.
- Jihadi, N.I.M., Hashim, Y.Z.H.Y., Rahim, N.A., Kamal, K.M., Noor, N.M., Sani, M.S.A. & 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.
- Kadeřábková, N., Mahmood, A.J.S. & Mavridou, D.A.I. 2024. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *npj Antimicrobials and Resistance* 2(1): 37-45.
- Kasmiyati, S., Kristiani, E.B.E., Herawati, M.M. & Sukmana, A.B.A. 2021. Antibacterial activity and flavonoids content of *Artemisia cina* Berg. ex Poljakov ethyl acetate extracts. *Biosaintifika* 13(1): 106-112.
- Millaty, I.N.K., Wijayanti, N., Hidayati, L. & Nuringtyas, T.R. 2020. Identification of anticancer compounds in leaves extracts of agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 457(1): 1-8.
- Panda, S.K., Brahma, S. & Dutta, S.K. 2010. Selective antifungal action of crude extracts of *Cassia fistula* L.: A preliminary study on *Candida* and *Aspergillus* species. *Malaysian Journal of Microbiology* 6(1): 62-68.
- Qiao, J., Gao, P., Jiang, X. & Fang, H. 2013. In vitro antifungal activity of farnesyltransferase inhibitors against clinical isolates of *Aspergillus* and *Candida*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 37(12): 1-4.
- Ramli, W.N.D., Yunus, M.A.C., Yian, L.N., Idham, Z., Aziz, A.H.A., Aris, N.A., Putra, N.R. & Sham, S.K. 2018. Extraction of squalene from *Aquilaria malaccensis* leaves using different extraction methods. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 22(6): 973-983.
- Ramli, A.N.M., Yusof, S., Bhuyar, P., Aminan, A. & Tajuddin, S.N. 2022. Fungi mediated agarwood (*A. malaccensis*) production and their pharmaceutical applications: A systematic review. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals* 2(2): 261-270.
- Reddy, G.K.K. & Nanchaiah, Y. V. 2020. Alkylimidazolium ionic liquids as antifungal alternatives: antibiofilm activity against *Candida albicans* and underlying mechanism of action. *Frontiers in Microbiology* 11(730): 1-15.
- Roohaida, O. & Afiq Adham, A.R. 2022. Kayu gaharu dan genetik penghasilan wangian. 1st edition. Bangi: Penerbit Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Unver, T., Özalp Erenler, A.Ş. & Kıran, T.R. 2025. Anti-infective effect of *Aquilaria malaccensis* L. essential oil against *Candida* strains, the leading cause of yeast infectious. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences* 9(2): 325-330.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C. & Bezirtoglou, E. 2021. Towards advances in

- medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms* 9(2041): 1-28.
- 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, Q.W., Lin, L.G. & Ye, W.C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine* 13(20): 1-26.

**Undergraduate Research Journal for
Biological Sciences and Biotechnology
ISSN 3120-306X**

**Analisis *in silico* IlvC sebagai Sasaran Terapeutik Baru dalam
*Burkholderia pseudomallei***

(In silico Analysis of IlvC as New Therapeutic Target in Burkholderia pseudomallei)

**Fathin Ardini Amran, Sofea Mohd Nizam, How Shu Sian & Sylvia
Chieng***

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

**E-mel pengarang koresponden: sylvia@ukm.edu.my*

Abstrak: *Burkholderia pseudomallei* merupakan agen penyebab melioidosis, jangkitan endemik berbahaya yang sering dikaitkan dengan kerintangan antibiotik dan kadar mortaliti yang tinggi. Kelangsungan hidup patogen ini di dalam perumah amat bergantung pada penyesuaian metabolik, terutamanya laluan biosintesis asid amino bercabang (BCAA) yang dimangkinakan oleh enzim ketol-asid reduktoisomerase (IlvC). Kajian ini menggunakan pendekatan *in silico* untuk menilai gen *ilvC* sebagai sasaran ubat serta mengenal pasti calon ubat sedia ada yang boleh digunakan semula. Analisis bioinformatik mengesahkan *ilvC* sebagai gen penting dan tanpa homologi terhadap protein manusia, sekali gus menunjukkan ia selamat digunakan sebagai sasaran ubat. Pemodelan struktur tiga dimensi menunjukkan tahap keyakinan yang tinggi dan kesepadanan kukuh dengan struktur homolog bereksperimen. Analisis poket pengikatan mengesahkan kewujudan tapak aktif dengan skor kebolehubatan (*druggability*) yang kuat. Pendokkan molekul menggunakan AutoDock Vina mengenal pasti lima ubat dengan afiniti pengikatan tertinggi, iaitu *saquinavir*, *simeprevir*, *fidaxomicin*, *indinavir* dan *nelfinavir*, yang menunjukkan tenaga pengikatan lebih rendah berbanding kofaktor semula jadi NAD dan ADP. Secara keseluruhan, dapatan ini menyokong potensi IlvC sebagai sasaran terapeutik baharu serta mencadangkan strategi penilaian semula ubat sebagai pendekatan alternatif dalam rawatan melioidosis.
(177 patah perkataan)

Kata kunci: *Burkholderia pseudomallei*; IlvC; melioidosis; pendokkan molekul; penilaian semula ubat

Abstract: *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a severe endemic infection frequently associated with antibiotic resistance and high mortality rates. The survival of this pathogen within the host depends heavily on metabolic adaptation, particularly the branched-chain amino acid (BCAA) biosynthesis pathway catalyzed by the enzyme ketol-acid reductoisomerase (IlvC). This study employed an *in silico* approach to evaluate the *ilvC* gene as a potential drug target and to identify existing drugs suitable for repurposing. Bioinformatic analysis confirmed *ilvC* as an essential gene with no homology to human proteins, indicating its potential safety as a therapeutic target. Three-dimensional structural modeling demonstrated high confidence and strong structural alignment with experimentally determined homologous proteins. Binding pocket analysis confirmed the presence of an active site with a strong druggability score. Molecular docking using AutoDock Vina identified five compounds with the highest binding affinities—*saquinavir*, *simeprevir*, *fidaxomicin*, *indinavir*, and *nelfinavir*—exhibiting lower binding energies compared to the natural cofactors NAD and ADP. Overall, these findings support the potential of IlvC as a novel therapeutic target and suggest drug repurposing as an alternative strategy for the treatment of melioidosis.
(183 words)

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; IlvC; melioidosis; molecular docking; drug repurposing

1. Pendahuluan

Burkholderia pseudomallei ialah patogen Gram-negatif yang sangat adaptif dan virulen, serta merupakan agen penyebab melioidosis, penyakit berjangkit yang endemik terutamanya di Asia Tenggara dan utara Australia (Meumann et al. 2024). Rawatan melioidosis kekal mencabar dalam persekitaran klinikal akibat kerintangan intrinsik terhadap pelbagai kelas antibiotik, yang turut diperkukuh oleh keupayaan pembentukan biofilem yang tinggi, membolehkan *B. pseudomallei* bertahan dalam persekitaran hos dan mengelakkan tindakan sistem imun dan antimikrob (Bzdyl et al. 2022).

Bagi memastikan kelangsungan hidup dalam keadaan tekanan persekitaran dan semasa pembentukan biofilem, bakteria ini bergantung kepada laluan metabolik asas seperti biosintesis asid amino bercabang (BCAA) untuk menghasilkan asid amino penting seperti valina, leusina, dan isoleusina. Laluan ini penting untuk menghasilkan tenaga dan molekul isyarat dalam keadaan nutrisi terhad yang biasa berlaku di tapak jangkitan kronik dan dalam matriks biofilem (Bayaraa et al. 2022).

Enzim ketol-asid reduktoisomerase yang dikodkan oleh gen *ilvC*, memangkinkan langkah kritikal dalam laluan ini. Selain berperanan sebagai blok binaan protein, laluan BCAA turut menyumbang kepada keseimbangan tenaga sel dan penghasilan pelopor asid lemak rantai bercabang yang penting untuk integriti membran sel (Frank et al. 2021). Kekurangan *ilvC* menyebabkan auksotrofi terhadap BCAA dan mengurangkan keupayaan kelangsungan hidup intrasel. Selaras dengan itu, mutan *ilvC* menunjukkan penurunan kevirulenan yang signifikan dalam model jangkitan haiwan, menegaskan kepentingan laluan ini dalam kepatogenan (Kim et al. 2017).

Memandangkan laluan biosintesis BCAA tidak wujud dalam manusia, *IlvC* muncul sebagai sasaran terapeutik yang selektif dan berpotensi tinggi. Walau bagaimanapun, maklumat terperinci mengenai ciri struktur tiga dimensi dan potensi interaksi molekul protein *IlvC* dalam *B. pseudomallei* masih terhad. Sehubungan itu, kajian *in silico* ini dijalankan untuk mencirikan struktur molekul *IlvC*, menilai kebolehubatan poket aktif, serta mengenal pasti calon ubat sedia ada yang berpotensi untuk dinilai semula (*drug repurposing*) bagi merencat laluan BCAA dalam *B. pseudomallei*.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Analisis ramalan fungsi, penyetempatan dan homologi *IlvC*

Maklumat gen *ilvC* (lokus BPSL1198) daripada strain *Burkholderia pseudomallei* K96243 diperoleh melalui pangkalan data KEGG (KO: K00053) dan NCBI GenBank. Analisis ramalan fungsi dan ciri asas protein dijalankan secara *in silico* menggunakan beberapa platform bioinformatik terpilih.

Ramalan lokasi subsele protein dilakukan menggunakan PSORTb v3.0.2 yang khusus untuk bakteria Gram-negatif. Kehadiran peptida isyarat dianalisis menggunakan pelayan web SignalP untuk menentukan potensi rembesan atau penyasaran protein.

Profil fungsi protein *IlvC* seterusnya dinilai bagi meneliti peranannya sebagai gen penting (*essential gene*) serta potensi penglibatannya sebagai faktor kevirulenan melalui pelayan web VaxElaan (Rawal et al. 2021). Analisis domain dan pengelasan keluarga enzim dijalankan menggunakan pangkalan data InterPro bagi mengenal pasti domain berfungsi utama yang berkait dengan aktiviti enzimatik.

Bagi menilai potensi interaksi silang dengan perumah, analisis BLASTp dilaksanakan terhadap proteom manusia (*Homo sapiens*) dalam pangkalan data NCBI untuk mengesahkan ketiadaan homologi signifikan yang boleh menimbulkan kesan luar sasaran. Selain itu, analisis BLASTp turut dijalankan merentas pangkalan data spesies bakteria terpilih yang tidak bertindih bagi menilai tahap homologi *IlvC* di dalam kalangan mikroorganisma.

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 kebolehubatan (*druggability*), iaitu kebolehan struktur untuk mengikat dan dimodulasi oleh molekul.

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.

2.4 Pendokkan molekul

Pendokkan dilakukan antara struktur molekul ubat dengan struktur protein menggunakan perisian AutoDock Vina melalui program Chimera dan CB-Dock. Penyediaan struktur protein telah dilakukan terlebih dahulu dengan menyingkirkan ligan asal serta 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. Simulasi pendokkan tersebut menghasilkan pelbagai variasi konformasi dan orientasi ligan yang berpotensi untuk mengikat pada tapak pengikatan protein. Konformasi pendokkan yang terbaik yang mempamerkan nilai RMSD dan skor pendokkan terendah (nilai paling negatif) telah kemudiannya dipilih untuk analisis lanjut. Bagi setiap molekul ubat, pendokkan dilakukan sebanyak tiga kali dan purata skor diambil untuk memastikan kebolehpercayaan hasil.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Sifat Biologi, Penempatan Subselular, dan Peptida Isyarat

Berdasarkan analisis *in silico*, gen *ilvC* dikenal pasti sebagai gen kritikal dengan nilai metrik penuh "1" bagi Nilai Gen Penting (*Essential Gene Value*) dan skor 8 bagi Nilai Faktor Kevirulenan (*Virulence Factor Value*) yang diperoleh melalui pelayan web VaxElan. Skor metrik penuh "1" menunjukkan gen *ilvC* adalah penting untuk kemandirian bakteria, manakala skor kevirulenan yang tinggi menunjukkan tahap homologi yang tinggi dengan jujukan gen faktor kevirulenan yang sedia ada hal ini sekaligus mencadangkan keterlibatan gen *ilvC* dalam mekanisme kepatogenan *B. pseudomallei*. Analisis penentuan lokasi melalui PSORTb menunjukkan skor maksimum 9.97 bagi penempatan di dalam sitoplasma. Bagi mengukuhkan fakta ini, ramalan perisian SignalP melaporkan ketiadaan peptida isyarat dengan skor *D-value* 0.100. *IlvC* merupakan enzim intrasel dominan (sitosol) yang tidak dirembeskan keluar dari sel bakteria. Penemuan ini selari dengan peranan metabolik laluan biosintesis asid amino rantai bercabang (BCAA) yang diproses secara langsung di dalam sel *B. pseudomallei*.

3.2 Sifat Domain Enzimatik dan Ketiadaan Homologi Manusia

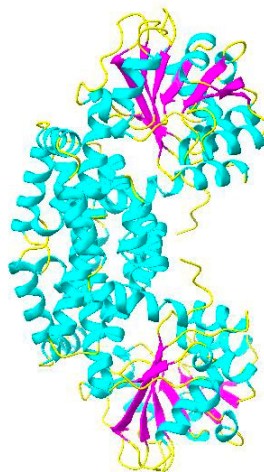
Analisis menggunakan InterPro mengesahkan bahawa gen *ilvC* mengekod enzim dalam keluarga protein ketol-asid reduktoisomerase (KARI) dan *6-phosphogluconate dehydrogenase-like* (Rajah 2). Struktur primernya diperkukuh oleh siri domain terpelihara utama, khususnya domain pengikat NAD(P)H *Rossmann-fold* serta kawasan domain terminal-N dan terminal-C. Lipatan Rossmann ini berfungsi untuk mengikat kofaktor NAD(P)H dengan tepat untuk aktiviti pemangkinan pengurangan alkil dan isomerisasi (Hanukoglu 2015).

Dari sudut reka bentuk sasaran perencat, hasil BLASTp mengesahkan IlvC tidak mempunyai homologi terhadap *Homo sapiens*. Penemuan ini konsisten dengan kajian lepas yang mengenal pasti enzim laluan biosintesis asid amino bercabang sebagai sasaran antibiotik yang berpotensi tinggi kerana kekhususannya terhadap patogen bakteria (Bayaraa et al. 2022). Ketiadaan homolog manusia bagi IlvC mengurangkan kebarangkalian untuk berlakunya tindak balas silang atau kesan toksik terhadap sel perumah, sekaligus menyokong profil keselamatannya sebagai sasaran ubat (Franco & Blanchard 2017).

Clusters producing significant alignments				Download	Select columns	Show	100			
☒ select all 100 clusters selected GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment MSA Viewer										
	Cluster Composition	Cluster Ancestor	Cluster Representative Sequence	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
	Click the  to see the cluster contents									
☒	田29 member(s), 20 organism(s)	b-proteobacteria	MULTISPECIES: ketol-acid reductoisomerase [Cupriavidus]	644	644	100%	0.0	92.31%	381	WP_255674175.1
☒	田93 member(s), 49 organism(s)	bacteria	ketol-acid reductoisomerase [uncultured Ralstonia sp.]	641	641	100%	0.0	92.31%	338	WP_295497337.1
☒	田413 member(s), 205 organism(s)	bacteria	ketol-acid reductoisomerase [Paraburkholderia gardinii]	639	639	100%	0.0	93.79%	367	WP_324251890.1
☒	田132 member(s), 69 organism(s)	proteobacteria	MULTISPECIES: ketol-acid reductoisomerase [unclassified Polynucle...	633	633	100%	0.0	89.64%	338	WP_233923977.1
☒	田35 member(s), 9 organism(s)	proteobacteria	MULTISPECIES: ketol-acid reductoisomerase [Aquicola]	628	628	100%	0.0	90.24%	338	WP_046112205.1
☒	田7 member(s), 5 organism(s)	proteobacteria	MULTISPECIES: ketol-acid reductoisomerase [unclassified Polynucle...	626	626	100%	0.0	89.35%	338	WP_281971092.1
☒	田6 member(s), 5 organism(s)	b-proteobacteria	ketol-acid reductoisomerase [Candidatus Vallotellia hemipterum]	620	620	100%	0.0	86.69%	355	WP_320412902.1
☒	田5 member(s), 4 organism(s)	b-proteobacteria	ketol-acid reductoisomerase [Verticella sediminum]	620	620	100%	0.0	88.76%	338	WP_143950814.1
☒	田9 member(s), 5 organism(s)	b-proteobacteria	ketol-acid reductoisomerase [Oligella ureolytica]	617	617	100%	0.0	87.87%	338	WP_018574114.1
☒	田460 member(s), 260 organism(s)	bacteria	ketol-acid reductoisomerase [Undibacterium sp. FT79W]	616	616	100%	0.0	87.87%	338	WP_186885110.1
☒	田53 member(s), 27 organism(s)	proteobacteria	MULTISPECIES: ketol-acid reductoisomerase [unclassified Herbaspiril...	615	615	100%	0.0	88.17%	338	WP_183377798.1
☒	田217 member(s), 96 organism(s)	proteobacteria	ketol-acid reductoisomerase [Piscinibacter sp.]	612	612	100%	0.0	86.98%	338	WP_293433896.1
☒	田1 member(s), 1 organism(s)	b-proteobacteria	ketol-acid reductoisomerase [Candidatus Vallotellia adelgis]	612	612	100%	0.0	85.80%	338	WP_226806313.1
☒	田2 member(s), 2 organism(s)	b-proteobacteria	ketol-acid reductoisomerase [Paraburkholderia jirisanensis]	611	611	100%	0.0	89.64%	338	GAB2875664.1

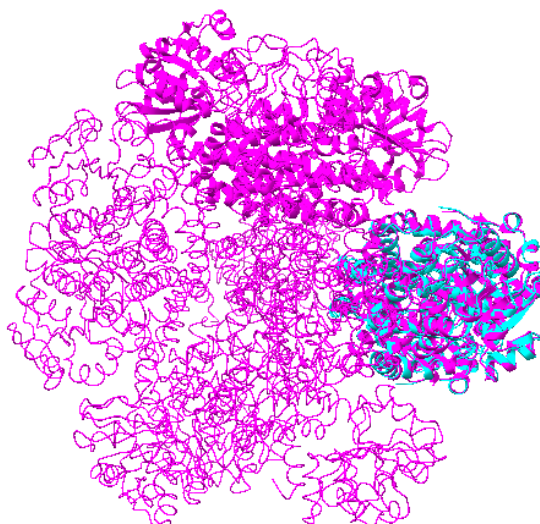
3.3 Analisis Kualiti Pemodelan Struktur Tiga Dimensi (3D)

13



Rajah 4. Ramalan struktur 3-dimensi protein IlvC *B. pseudomallei* strain K96243.

Perbandingan struktur (*superposition*) terhadap kristalografi protein IlvC homolog daripada *P. aeruginosa* (PDB ID: 1NP3, 71% identiti) merekodkan nilai RMSD serendah 0.749 Å (Rajah 5). Selain itu, superposisi terhadap protein homolog BurG bersandar-NAD (PDB ID: 7PCC dan 7PCE) masing-masing menunjukkan sisihan RMSD yang minimum iaitu 1.127 Å dan 1.006 Å. Nilai RMSD yang berada pada skala hampir 1.0 Å ini membuktikan model tersebut mengekalkan struktur lipatan global (KARI dan lipatan Rossmann) secara ketat, menjadikannya sangat stabil untuk digunakan dalam simulasi pendokkan molekul.



Rajah 5. Hasil superposisi penjajaran struktur antara struktur ramalan IlvC dengan struktur kristalografi protein homolog daripada *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 1NP3).

3.4 Peramalan poket pengikatan dan pendokkan molekul

Memandangkan enzim IlvC memainkan peranan penting dalam laluan biosintesis asid amino bercabang (BCAA) dalam *Burkholderia pseudomallei*, analisis poket pengikatan dan pendokkan molekul dijalankan bagi menilai potensi enzim ini sebagai sasaran molekul untuk rawatan terapeutik. Analisis kebolehubatan (*druggability*) telah mengenalpasti satu poket pengikatan utama yang menunjukkan potensi tinggi sebagai sasaran ligan. Poket ini diklasifikasikan sebagai “Strong” dengan nilai *DrugScore* sebanyak 11507 dan berpusat pada koordinat (-0.5, -4.0, -3.25). Ruang aktif yang dikenal pasti mempunyai isipadu besar (7847.5 Å³) dan dikelilingi oleh residu asid amino hidrofobik serta polar. Susunan residu ini menyediakan persekitaran kimia yang sesuai untuk interaksi ligan melalui ikatan hidrogen serta interaksi hidrofobik dalam tapak aktif protein.

Isipadu poket pengikatan protein IlvC yang luas ini menawarkan kelebihan ruang yang ketara untuk penyesuaian konformasi ligan, terutamanya apabila dibandingkan dengan protein pengawalaturan biofilem *B. pseudomallei* seperti protein BpsR (Gamage et al 2011). Sebagai protein pengawalaturan daripada keluarga LuxR, domain pengikatan ligan bagi subfamili protein ini secara

amnya bersifat sangat terhad dan sempit, dengan pengikatan ligan semulajadi yang terbenam sepenuhnya di dalam kaviti hidrofobik yang kecil (Bottomley et al. 2007). Sebaliknya, sifat kimia dan keluasan ruang pada tapak aktif protein IlvC ini membolehkan pengikatan yang lebih stabil bagi molekul ubat komersial yang berstruktur besar dengan kehadiran pelbagai cincin aromatik sisi serta rantai sisi yang panjang (contohnya *Saquinavir* dan *Simeprevir*).

Secara struktur, IlvC tergolong dalam keluarga enzim ketol-asid reduktoisomerase, yang berfungsi dalam langkah penting biosintesis BCAA melalui proses pengisomeraan dan penurunan substrat menggunakan kofaktor NAD(P)H (Dumas et al., 2001). Enzim ini lazimnya mengandungi motif *Rossmann fold*, iaitu struktur lipatan konservatif yang membentuk poket pengikatan nukleotida untuk kofaktor NAD(P)H (Hanukoglu 2015). Oleh itu, ligan yang mampu mengikat dengan afiniti tinggi pada kawasan ini berpotensi mengganggu pengikatan kofaktor dan seterusnya menjejaskan aktiviti katalitik enzim.

Hasil analisis pendokkan molekul telah mengenal pasti beberapa molekul dengan afiniti pengikatan yang lebih kuat berbanding kofaktor semula jadi. Sebagai kawalan, kofaktor semula jadi enzim seperti NAD dan ADP menunjukkan tenaga pengikatan sebanyak -7.8 kcal/mol dan -7.9 kcal/mol masing-masing, iaitu menghampiri purata afiniti poket sasaran (-7.53 kcal/mol). Sebanyak lima ligan dengan nilai afiniti pengikatan yang tertinggi disenaraikan di dalam Jadual 1, di mana *Saquinavir* memberikan nilai afiniti pengikatan yang tertinggi iaitu -9.8 kcal/mol.

Jadual 1. Ligan dengan afiniti pengikatan tertinggi terhadap poket aktif enzim IlvC.

Ligan	Kategori ubat	Afiniti pengikatan (kcal/mol)
<i>Saquinavir</i>	Anti-retrovirus (perencat protease HIV)	-9.8
<i>Simeprevir</i>	Anti-virus (Hepatitis B)	-9.7
<i>Fidaxomicin</i>	Antibiotik makrosiklik	-9.4
<i>Indinavir</i>	Anti-retrovirus (perencat protease HIV)	-9.1
<i>Nelfinavir</i>	Anti-retrovirus (perencat protease HIV)	-8.7

Dalam kajian pendokkan molekul, nilai tenaga pengikatan yang lebih negatif menunjukkan kestabilan kompleks protein–ligan yang lebih tinggi. Secara amnya, nilai tenaga pengikatan sekitar ≤ -7.0 kcal/mol dianggap menunjukkan interaksi yang stabil antara ligan dan protein sasaran, manakala nilai sekitar -9.0 kcal/mol atau lebih rendah mencadangkan afiniti pengikatan yang kuat (Meng et al. 2011). Berdasarkan kriteria ini, semua ligan yang dikenal pasti menunjukkan potensi interaksi yang lebih stabil berbanding kofaktor kawalan. Secara keseluruhannya, pengikatan ligan pada kawasan poket aktif IlvC berpotensi mengganggu pengikatan kofaktor NAD(P)H dan seterusnya menjejaskan aktiviti katalitik enzim dalam laluan biosintesis BCAA (Dumas et al. 2001).

4. Kesimpulan

Kajian *in silico* ini mengenal pasti gen *ilvC* sebagai komponen penting dalam metabolisme intrasel bagi *Burkholderia pseudomallei*. Analisis bioinformatik menunjukkan bahawa gen ini mengekod enzim ketol-asid reduktoisomerase yang stabil secara struktur dan sangat terpelihara merentas spesies bakteria berkaitan. Tambahan pula, ketiadaan homologi signifikan antara IlvC bakteria dan protein dalam proteom manusia menyokong potensi enzim ini sebagai sasaran terapeutik yang selektif. Analisis keboleh-ubatan struktur protein mengenal pasti poket pengikatan dengan potensi *druggability* yang tinggi. Pendokkan molekul seterusnya menunjukkan bahawa beberapa ubat sedia ada, termasuk *Saquinavir*, *Simeprevir*, dan *Fidaxomicin*, mempunyai afiniti pengikatan yang lebih kuat berbanding ligan kawalan. Penemuan ini mencadangkan bahawa IlvC berpotensi menjadi sasaran molekul bagi pendekatan penilaian semula ubat dalam pembangunan strategi terapi baharu terhadap melioidosis. Walau bagaimanapun, pengesahan lanjutan melalui simulasi dinamik molekul (MD) diperlukan untuk menilai kestabilan terma serta perubahan konformasi kompleks IlvC-ligan, dan disusuli dengan kajian biokimia serta eksperimen *in vitro* dan *in vivo* untuk menilai keberkesanan perencatan enzim ini dalam sistem biologi sebenar. Secara keseluruhannya, dapatan kajian ini menyediakan asas awal bagi penerokaan sasaran metabolik baharu dalam *B. pseudomallei* dan menyokong potensi pendekatan berasaskan struktur protein dalam mempercepatkan penemuan agen terapeutik baharu untuk rawatan melioidosis yang lebih berkesan.

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

- Bayaraa, T., Gaete-Loyola, J., Sutiono, S., Kurz, J.L., Lonhienne, T., Harmer, J.R. et al. 2022. Dihydroxy-acid dehydratases from pathogenic bacteria: emerging drug targets to combat antibiotic resistance. *Chemistry-A European Journal* 28:e202200927
- Bottomley, M.J., Muraglia, E., Bazzo, R. & Carfi, A. 2007. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry* 282(18): 13592-13600.
- Brinkmann-Chen, S., Flock, T., Cahn, J.K.B., Snow, C.D., Brustad, E.M., McIntosh, J.A., et al. 2013. General approach to reversing ketol-acid reductoisomerase cofactor dependence from NADPH to NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27): 10946–10951.
- Bzdyl, N.M., Moran, C.L., Bendo, J. & Sarkar-Tyson, M. 2022. Pathogenicity and virulence of *Burkholderia pseudomallei*. *Virulence* 13(1):1945-1965.
- Dumas, R., Biou, V., Halgand, F., Douce, R. & Duggleby, R.G. 2001. Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase. *Account of Chemical Research* 34(5):399-408.
- Franco, T.M.A. & Blanchard, J.S. 2017. Bacterial branched-chain amino acid biosynthesis: structures, mechanisms, and drugability. *Biochemistry* 56(44):5849-5865.
- Frank, M.W., Whaley, S.G. & Rock, C.O. 2021. Branched-chain amino acid metabolism controls membrane phospholipid structure in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 297(5):101255.
- Gamage, A.M., Shui, G., Wenk, M.R. & Chua, K.L. 2011. N-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI–BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 157(4): 1176-1186.
- Hanukoglu, I. 2015. Proteopedia: Rossmann fold: a beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 43(3):206-209.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583-589.
- Kim, G.L., Lee, S., Luong, T.T., Nguyen, C.T., Park, S.S., Pyo, S. & Rhee, D.K. 2017. Effect of decreased BCAA synthesis through disruption of *ilvC* gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Archives of Pharmacal Research* 40:921-932.
- Lemaire, O.N., Müller, M.C., Kahnt, J. & Wagner, T. 2021. Structural rearrangements of a dodecameric ketol-acid reductoisomerase isolated from a marine thermophilic methanogen. *Biomolecules* 11(11):1679.
- Meng X.Y., Zhang, H.X., Mezei M. & Cui, M. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design* 7(2):146-157.
- Meumann, E.M., Limmathurotsakul, D., Dunachie, S.J., Wiersinga, W.J. & Currie, B.J. 2024. *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis. *Nature Reviews Microbiology* 22(3):155-159.
- Rawal, K., Sinha, R., Abbasi, B.A., Chaudhary, A., Nath, S.K. Kumari, P. et al. 2021. Identification of vaccine targets in pathogens and design of a vaccine using computational approaches. *Scientific Reports* 11: 17626.

**Undergraduate Research Journal for
Biological Sciences and Biotechnology
ISSN 3120-306X**

**Keberkesanan Mikrob daripada Bahan Buangan Kuda dalam
Meningkatkan Pertumbuhan Pokok Bayam (*Amaranthus viridis*)**
(*Effectiveness of Microbes from Horse Waste in Enhancing the Growth of Spinach*
(*Amaranthus viridis*))

Muhammad Afif Luqman Shamshudin & Nazlina Ibrahim*

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

*E-mel pengarang koresponden: nazlina@ukm.edu.my

Abstrak: Penggunaan baja kimia secara berlebihan dalam pertanian moden telah menimbulkan isu kemerosotan kesuburan tanah dan pencemaran alam sekitar. Kajian ini dijalankan untuk mengenal pasti mikrob efektif daripada bahan buangan kuda serta menilai keberkesanannya terhadap pertumbuhan pokok bayam (*Amaranthus viridis*) berbanding baja kimia dan air paip sebagai kawalan. Sampel bahan buangan kuda diperoleh dari Malaysia Agro Exposition Park Serdang (MAEPS), Selangor. Mikroorganisma dipencilkan menggunakan kaedah pencairan bersiri dan piring sebaran, diikuti pencirian morfologi serta ujian biokimia seperti ujian katalase, oksidase, penurunan nitrat dan pengikatan nitrogen bagi mengenal pasti mikrob yang berpotensi. Berdasarkan ciri morfologi dan ujian biokimia, pencilan bakteria yang berjaya dipencilkan berkemungkinan tergolong dalam genus *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, dan *Pseudomonas*. Pencilan kulat yang dikenal pasti berkemungkinan daripada genus *Cladosporium*, *Penicillium* dan *Rhodotorula*. Keberkesanan larutan mikrob efektif terhadap pertumbuhan pokok bayam dinilai melalui eksperimen selama 30 hari dengan parameter seperti ketinggian pokok, bilangan daun dan panjang akar. Analisis ANOVA menunjukkan terdapat perbezaan signifikan antara rawatan ($P < 0.0001$), dengan baja kimia menghasilkan pertumbuhan tertinggi. Walau bagaimanapun, larutan mikrob menunjukkan peningkatan signifikan berbanding kawalan. Kesimpulannya, mikrob daripada bahan buangan kuda berpotensi sebagai agen biobaja yang menyokong pertanian mampan dan mengurangkan kebergantungan kepada baja kimia.

Kata kunci: Biobaja; bahan buangan kuda; pertumbuhan pokok; pertanian lestari; *Amaranthus viridis*

Abstract: Excessive use of chemical fertilizers in modern agriculture has raised issues in the decline of soil fertility and environmental pollution. This study was conducted to identify effective microbes from horse waste and evaluate their effect on the growth of spinach (*Amaranthus viridis*) compared to chemical fertilisers and tap water as controls. Horse waste samples were obtained from Malaysia Agro Exposition Park Serdang (MAEPS), Selangor. Microorganisms were isolated using serial dilution and spread plate methods, followed by morphological characterisation and biochemical tests including catalase, oxidase, nitrate reduction and nitrogen fixation tests to identify potential microbes. Based on morphological characteristics and biochemical tests, the successfully isolated bacterial isolates likely belong to the genera *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas*. The identified fungal isolates were likely from the genus *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Rhodotorula*. The effectiveness of the effective microbial solution on spinach growth was evaluated in a 30-day experiment, using plant height, leaf number, and root length as parameters. ANOVA showed a significant difference among treatments ($P < 0.0001$), with chemical fertilizer producing the highest growth. However, the microbial solution showed a significant increase compared to the control. In conclusion, microbes from horse waste have the potential to serve as biofertilisers, supporting sustainable agriculture and reducing dependence on chemical fertilisers.

Keywords: Biofertiliser; horse waste; plant growth; sustainable agriculture; *Amaranthus viridis*

1. Pendahuluan

Baja digunakan untuk membekalkan nutrien penting bagi meningkatkan kesuburan tanah dan pertumbuhan tumbuhan. Namun, penggunaan baja kimia secara berlebihan dalam pertanian moden boleh menyebabkan pelbagai kesan negatif seperti penurunan pH tanah, kemerosotan kesihatan tanah serta gangguan terhadap komuniti mikroorganisma yang bermanfaat dalam tanah (Zhang et al. 2022). Perubahan ini seterusnya boleh menjejaskan ketersediaan nutrien kepada tumbuhan dan mengurangkan produktiviti pertanian dalam jangka panjang (Zhang et al. 2025).

Sehubungan itu, pendekatan pertanian lestari yang menggunakan sumber organik semakin mendapat perhatian sebagai alternatif kepada baja kimia. Salah satu sumber yang berpotensi ialah bahan buangan kuda yang terdiri daripada campuran najis, air kencing dan sisa organik yang kaya dengan komuniti mikroorganisma semula jadi (Urrea et al. 2019). Mikroorganisma ini berpotensi meningkatkan kesuburan tanah serta merangsang pertumbuhan tumbuhan melalui pelbagai mekanisme seperti penghasilan sebatian bioaktif dan interaksi positif dalam rizosfera (Mutungwazi et al. 2022).

Beberapa genus bakteria seperti *Bacillus* dan *Pseudomonas* telah dilaporkan mempunyai potensi sebagai rizobakteria penggalak pertumbuhan tumbuhan (PGPR) yang mampu meningkatkan hasil tanaman serta melindungi tumbuhan daripada patogen melalui penghasilan sebatian antimikrob (Caulier et al. 2019; Mehmood et al. 2023; Nanjundappa et al. 2021).

Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk memencil dan mengenal pasti mikroorganisma daripada bahan buangan kuda serta menilai keberkesanannya terhadap pertumbuhan pokok bayam (*Amaranthus viridis*) berbanding baja kimia dan air paip sebagai kawalan.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Lokasi persampelan bahan buangan kuda

Sampel bahan buangan kuda diambil dari kandang kuda di Malaysia Agro Exposition Park Serdang (MAEPS), Serdang, Selangor pada koordinat 2.97733° N, 101.68936° E (Rajah 1).



Rajah 1. Lokasi sampel bahan buangan kuda di MAEPS Rubinga Equine Centre.

2.2 Persampelan bahan buangan Kuda

Sampel bahan buangan kuda yang masih segar dikumpulkan bagi memastikan mikroorganisma yang terkandung tidak tercemar dengan patogen yang boleh menjejaskan mikrob bermanfaat. Kawasan seperti tompok basah akibat kebocoran air dan tepi cerucuk yang telah membentuk kerak dielakkan semasa pengambilan sampel. Pensampelan dijalankan menggunakan cangkuk kecil yang steril dan sampel dimasukkan ke dalam botol Schott 1 L yang steril. Sampel kemudian disimpan dalam kotak pendingin bersama pek ais dan dibawa ke makmal untuk penyimpanan pada suhu 4°C bagi memperlakan pertumbuhan mikroorganisma yang tidak diinginkan.

2.3 *Pengkulturan mikroorganisma*

Sampel bahan buangan kuda menjalani proses pencairan bersiri daripada kepekatan 10^{-1} hingga 10^{-6} bagi mengurangkan kepadatan mikroorganisma dalam larutan, berdasarkan kaedah Sotaka (2023). Sebanyak 1 mL sampel dicampurkan dengan 9 mL air suling steril dan proses ini diulang sehingga mencapai kepekatan 10^{-6} . Seterusnya, kaedah piring sebaran dijalankan dengan memipet 200 μ L daripada setiap pencairan ke atas piring agar. Medium Agar Zat Makanan (NA) digunakan untuk pertumbuhan bakteria manakala Agar Dektrosa Kentang (PDA) digunakan untuk pertumbuhan kulat. Setiap piring disediakan dengan replikat dan dieram pada suhu 30–37°C bagi bakteria dan 28–30°C bagi kulat selama 10–24 jam. Selepas pengeraman, bilangan koloni dikira dalam unit pembentukan koloni (CFU/g) bagi menentukan kepekatan mikroorganisma dalam sampel asal. Pengiraan dilakukan menggunakan formula CFU/g berikut:

$$\frac{cfu}{g} = \frac{bilangan\ koloni \times Faktor\ pencairan}{Isipadu\ sampel\ (mL)} \times Berat\ sampel\ (g)$$

Julat koloni yang sesuai untuk pengiraan adalah antara 25 hingga 250 koloni bagi setiap piring seperti yang disyorkan oleh dalam Bacteriological Analytical Manual (BAM) (Zhang et al. 2026).

2.4 *Pemencilan mikroorganisma*

Koloni bakteria dan kulat yang telah dikenal pasti dipindahkan ke medium agar baharu untuk proses penulenan. Kaedah piring coretan digunakan bagi mendapatkan koloni tulen mikroorganisma yang spesifik. Medium agar Rose Bengal Chloramphenicol (RBCA) digunakan dalam proses pengasingan ini. Satu koloni mikrob dipindahkan daripada medium asal ke medium baharu menggunakan gelung inokulasi steril. Sepanjang proses ini, teknik aseptik digunakan bagi mengelak kontaminasi. Piring agar kemudiannya dieram semalaman pada suhu 30–37°C bagi bakteria dan 28–30°C bagi kulat sehingga koloni tulen terbentuk.

2.5 *Ujian pengenalpastian mikrob*

Pengenalpastian mikroorganisma dilakukan melalui pencirian morfologi secara makroskopik dan mikroskopik serta beberapa ujian biokimia. Pemerhatian makroskopik dijalankan pada koloni yang tumbuh di atas medium agar bagi menilai ciri seperti bentuk koloni, bahagian tepi, ketinggian, tekstur, warna, ketelusan dan penghasilan pigmen. Perbezaan ciri morfologi ini membantu dalam mengenal pasti jenis mikroorganisma yang dipencilkan daripada bahan buangan kuda (Hidayati et al. 2023). Pemerhatian mikroskopik dilakukan selepas pewarnaan Gram bagi menentukan bentuk dan susunan sel bakteria serta tindak balas Gram sama ada Gram-positif atau Gram-negatif. Proses pewarnaan Gram melibatkan penggunaan violet kristal, iodin dan safranin (Paray, Singh & Amin Mir 2023). Bagi kulat, struktur miselium, spora dan sporulasi diperhatikan menggunakan pewarnaan Lactophenol Cotton Blue (Leck 1999). Pemerhatian dilakukan pada pembesaran 40 $\times$, 100 $\times$ dan 1000 $\times$ untuk mengenal pasti struktur sel dengan lebih jelas.

Selain itu, ujian biokimia seperti ujian oksidase, ujian penurunan nitrat dan ujian pengikatan nitrogen turut dijalankan. Ujian oksidase dilakukan dengan menggunakan reagen oksidase bagi mengesan aktiviti enzim oksidase melalui perubahan warna kepada ungu gelap. Ujian penurunan nitrat dijalankan bagi menentukan kebolehan mikroorganisma menukarkan nitrat kepada nitrit melalui perubahan warna dalam kaldu nitrat. Seterusnya, ujian pengikatan nitrogen dilakukan menggunakan medium Burk's bagi mengenal pasti mikroorganisma yang berupaya mengikat nitrogen atmosfera melalui pertumbuhan koloni pada medium tersebut.

2.6 *Penyediaan larutan mikrob efektif*

Larutan mikrob efektif disediakan dengan mencampurkan 100 g bahan buangan kuda segar dengan 100 mL air suling steril dan dibiarkan selama 7 hari untuk proses fermentasi. Selepas itu, larutan ditapis menggunakan kain kasa dan dipindahkan ke dalam botol Schott 1 L. Sebanyak 300 mL susu segar kemudian ditambah ke dalam larutan dan dibiarkan menjalani proses fermentasi selama 7 hari. Selepas fermentasi, dua komponen terbentuk iaitu bahagian pepejal (dadih) dan cecair. Larutan tersebut ditapis

untuk mengasingkan bahagian cecair daripada dadih. Seterusnya, sebanyak 50 mL molase atau gula merah ditambah ke dalam larutan dan campuran dibiarkan selama 3 hari pada suhu bilik bagi membolehkan fermentasi semula jadi berlaku. Hasil akhir ialah larutan cecair yang kaya dengan mikroorganisma yang berpotensi menyokong pertumbuhan tanaman (Gashua et al. 2022; Tabbassum et al. 2022). Walau bagaimanapun, parameter seperti pH, bilangan mikroorganisma (CFU/mL) dan komposisi mikrob selepas proses fermentasi tidak ditentukan dalam kajian ini. Oleh itu, identiti dan dominasi mikroorganisma dalam larutan akhir tidak dapat dipastikan.

2.7 Reka bentuk eksperimen

Reka bentuk eksperimen melibatkan tiga kumpulan rawatan pokok bayam (*Amaranthus viridis*). Kumpulan A menerima siraman larutan mikrob efektif daripada bahan buangan kuda, kumpulan B dirawat dengan baja kimia, manakala kumpulan C disiram dengan air paip sebagai kawalan. Setiap rawatan terdiri daripada sepuluh replikasi biologi ($n = 10$) yang ditanam secara individu di dalam pasu bagi mengurangkan variasi antara tumbuhan dan membolehkan analisis statistik dijalankan. Bilangan replikasi ini dipilih berdasarkan kekangan ruang, masa dan sumber yang tersedia, namun masih memadai untuk membandingkan kesan rawatan terhadap parameter pertumbuhan pokok bayam. Larutan mikrob dan baja kimia disiram terus ke bahagian akar setiap lima hari. Parameter pertumbuhan seperti ketinggian pokok dan bilangan daun diukur setiap tiga hari, manakala panjang akar diukur pada hari ke-30. Pemerhatian dijalankan selama empat minggu bagi menilai perbezaan kadar pertumbuhan antara kumpulan rawatan. Data yang diperolehi kemudiannya dianalisis menggunakan ujian ANOVA bagi menentukan perbezaan signifikan antara rawatan

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Corak pertumbuhan dan pembentukan koloni selepas pencairan bersiri

Kaedah pencairan bersiri dijalankan bagi memencilkan mikroorganisma daripada bahan buangan kuda. Kepekatan bakteria dalam unit pembentukan koloni per gram (CFU/g) dikira berdasarkan bilangan koloni yang terbentuk bagi menentukan kepadatan mikroorganisma dalam sampel. Mikroorganisma yang tumbuh pada Agar Zat Makanan (NA) dan Agar Dektrosa Kentang (PDA) selepas pencairan bersiri daripada 10^{-1} hingga 10^{-6} ditunjukkan dalam Jadual 1. Setiap pencairan dilakukan secara duplikasi menggunakan dua piring agar (R1 dan R2) bagi mendapatkan nilai purata CFU/g.

Jadual 1. Kepekatan bakteria dalam unit koloni per unit gram dari sampel bahan buangan kuda.

Pencairan	Faktor Pencairan	Piring	Koloni (24 jam)	CFU/g	Purata CFU/g
10^{-1}	10	R1	TMTC	TMTC	TMTC
		R2	TMTC	TMTC	
10^{-2}	100	R1	TMTC	TMTC	TMTC
		R2	TMTC	TMTC	
10^{-3}	1000	R1	TMTC	TMTC	TMTC
		R2	TMTC	TMTC	
10^{-4}	10000	R1	TMTC	TMTC	TMTC
		R2	TMTC	TMTC	
10^{-5}	100000	R1	75	3.75×10^7	2.55×10^7
		R2	27	1.35×10^7	
10^{-6}	1000000	R1	7	TFTC	TFTC
		R2	3	TFTC	

Berdasarkan pengiraan Unit Pembentukan Koloni (CFU), kepekatan mikroorganisma dalam sampel bahan buangan kuda didapati berbeza mengikut tahap pencairan. Pada pencairan 10^{-5} , nilai CFU yang diperolehi ialah 3.75×10^7 CFU/g dan 1.35×10^7 CFU/g dengan purata 2.55×10^7 CFU/g bagi kedua-dua piring, menggunakan isipadu sapuan sebanyak 0.2 mL pada medium agar. Keputusan ini menunjukkan bahawa pencairan 10^{-5} merupakan tahap yang paling optimum untuk pemencilan bakteria daripada sampel bahan buangan kuda, sekali gus menunjukkan bahawa kepekatan bakteria dalam sampel asal adalah tinggi. Perbezaan nilai CFU antara piring berkemungkinan disebabkan oleh faktor teknikal semasa proses penyebaran, seperti ketidaktepatan isipadu atau pengagihan sampel yang tidak seragam pada permukaan medium agar.

3.2 Pengenalpastian mikroorganisma berpotensi dalam merangsang pertumbuhan pokok

3.2.1 Pengenalpastian pencilan bakteria

Ujian biokimia telah dijalankan untuk mencirikan pencilan bakteria, dan keputusan bagi ujian katalase, oksidase, penurunan nitrat serta penetapan nitrogen diringkaskan dalam Jadual 2. Berdasarkan ciri morfologi dan biokimia, pencilan bakteria daripada bahan buangan kuda dijangka tergolong dalam beberapa genus, iaitu pencilan B1 sebagai *Paenibacillus*, pencilan B2 sebagai *Acinetobacter*, pencilan B3A sebagai *Bacillus* dan pencilan B3B sebagai *Pseudomonas*, pencilan B4 sebagai *Burkholderia*, manakala pencilan AB1 dikenalpasti sebagai *Pseudomonas*, ini menunjukkan kepelbagaian mikroorganisma yang berpotensi menyumbang kepada kitaran nitrogen dan pertumbuhan tumbuhan.

3.2.1 Pengenalpastian pencilan kulat

Berdasarkan Jadual 3, empat pencilan kulat iaitu F1, F2, F3 dan F4 telah berjaya diasingkan dan dicirikan menggunakan RBCA. Pencirian ini melibatkan pemerhatian ciri koloni secara makroskopik serta struktur morfologi mikroskopik, yang seterusnya digunakan sebagai asas untuk cadangan pengenalpastian genus kulat. Perbezaan yang jelas dapat diperhatikan antara pencilan dari segi warna, tekstur koloni, kehadiran hifa dan bentuk konidia, menunjukkan kepelbagaian kulat yang terdapat dalam sampel bahan buangan kuda.

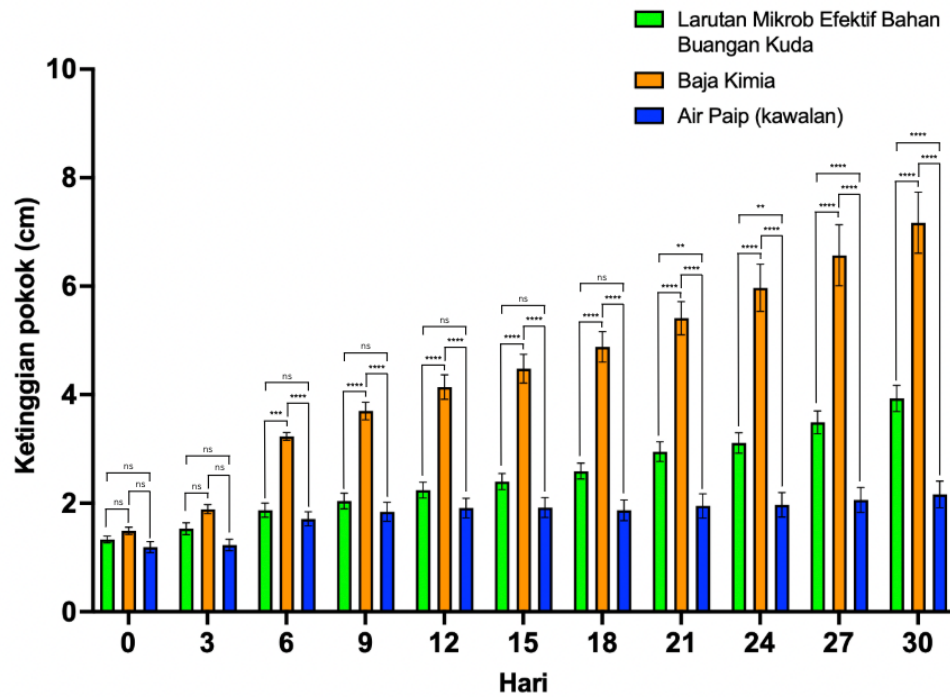
Empat pencilan kulat daripada bahan buangan kuda menunjukkan kepelbagaian morfologi. Pencilan F1 mempunyai koloni hijau keabu-abuan berfilamen dengan hifa bersepta dan konidia bujur dijangka *Cladosporium*. Pencilan F2 berwarna putih dengan pusat merah jambu, hifa bersepta bercabang dan konidia tersusun berantai dijangka *Penicillium*. Pencilan F3 berwarna merah jambu, koloni mukoid tanpa hifa, sel bulat membujur dijangka *Rhodotorula*. Pencilan F4 berwarna merah jambu dengan hifa bersepta dan konidia berantai dijangka *Penicillium*. Secara keseluruhan, sampel mengandungi kulat berfilamen dan yis seperti *Cladosporium*, *Penicillium*, dan *Rhodotorula*, mencerminkan persekitaran kaya mikroorganisma saprofit.

3.3 Analisis keberkesanan mikrob terhadap pertumbuhan pokok

3.3.1 Kesan rawatan terhadap ketinggian pokok

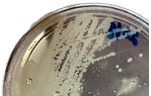
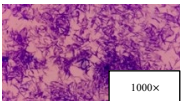
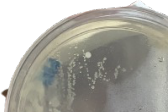
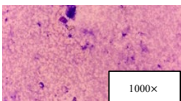
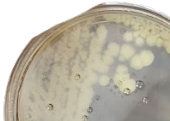
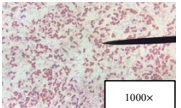
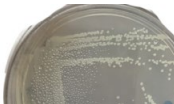
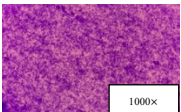
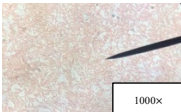
Data dianalisis menggunakan perisian GraphPad Prism versi 11.0.0. Analisis ANOVA dua hala digunakan bagi parameter ketinggian pokok dan bilangan daun, manakala ANOVA sehala ukuran berulang digunakan bagi panjang akar. Perbezaan antara min ditentukan menggunakan ujian perbandingan berbilang Tukey pada aras keertian $p < 0.05$. Data dipersembahkan sebagai min $\pm$ Ralat Piawai Purata (SEM). Rajah 2 menunjukkan perubahan ketinggian pokok bayam (cm) sepanjang tempoh pemerhatian selama 30 hari bagi tiga rawatan berbeza, iaitu larutan mikrob efektif daripada bahan buangan kuda, baja kimia dan air paip sebagai kawalan. Kesemua rawatan meningkatkan ketinggian pokok bayam sepanjang 30 hari, namun kadar pertumbuhan berbeza antara rawatan.

Graf perbandingan ketinggian pokok (cm) VS hari

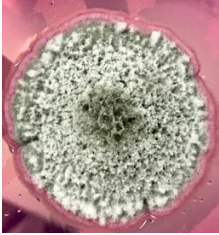
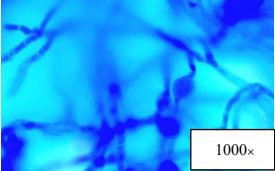
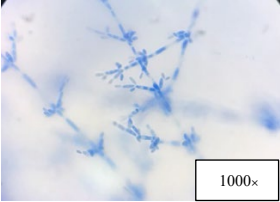
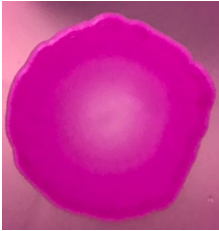
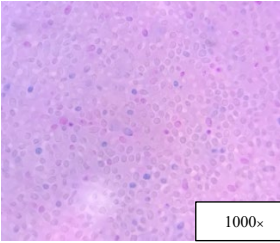
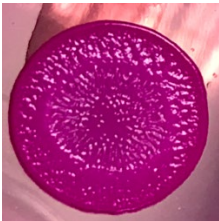
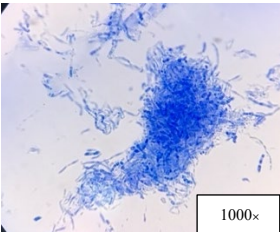


Rajah 2. Graf perbandingan ketinggian pokok bayam bagi tiga rawatan sepanjang 30 hari. Data dipersembahkan sebagai min $\pm$ SEM ($n = 10$). Huruf yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan berdasarkan ujian Tukey ($p < 0.05$).

Jadual 2. Ciri morfologi dan biokimia bagi bakteria pencilan.

Pencilan	Ciri		Ujian Biokimia				Jangkaan genus
	Cerapan Makroskopik	Cerapan Mikroskopik	Ujian Katalase	Ujian Oksidase	Ujian Nitrat	Penurunan Nitrogen	
B1		 Rod, Gram-positif	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>Paenibacillus</i> spp.
B2		 Kokobasilus, Gram-positif	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>Acinetobacter</i> spp.
B3A			(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Bacillus</i> spp.
B3B		Rod, Gram-negatif & Kokobasilus, Gram-positif	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Pseudomonas</i> spp.
B4		 Kokobasilus, Gram-positif	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>Bukholderia</i> spp.
AB1		 Rod, Gram-negatif	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Pseudomonas</i> spp.

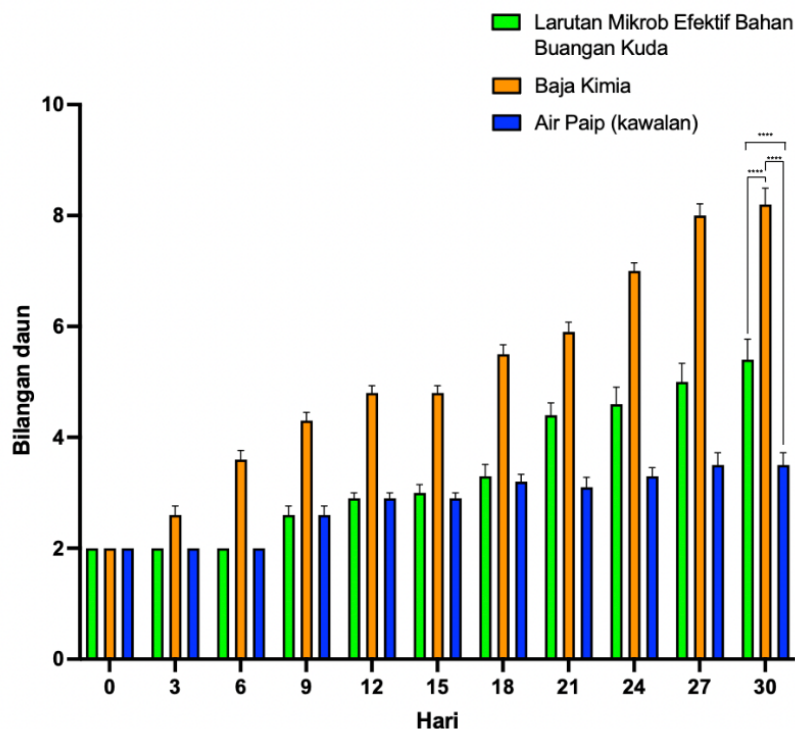
Jadual 3. Pencirian morfologi kulat di bawah medium kultur dan di bawah mikroskop.

Pencilan	Morfologi Koloni	Cerapan Morfologi Koloni	Cerapan Mikropik	Jangkaan Genus
F1		Berwarna hijau kekelabuan dan gelap di bahagian tengah, bulat, beralun, berfilamen dan besar.		Hifa bersepta, konidia kecil dan berbentuk bujur. <i>Cladosporium</i> spp.
F2		Berwarna putih dan merah jambu di bahagian tengah, bulat, licin, sekata, lembut, berkapas halus dan rata.		Hifa bersepta dan bercabang, konidiofor bercabang, konidia berbentuk bujur tersusun dalam rataian. <i>Penicillium</i> spp.
F3		Berwarna merah jambu dan putih di bahagian tengah, bulat, licin, berlendir dan tidak berfilamen.		Berbentuk oval, tidak bersepta dan tiada hifa sebenar. <i>Rhodotorula</i> spp.
F4		Berwarna merah jambu, bulat, padat di bahagian tengah, begranul dengan corak radial dan licin pada bahagian tepi koloni.		Hifa bersepta, konidia berbentuk bujur sehingga silinder pendek dan terbentuk dalam rantaian. <i>Penicillium</i> spp.

Pokok yang dirawat dengan baja kimia menunjukkan pertumbuhan tertinggi kerana nutrien seperti nitrogen tersedia segera untuk fotosintesis dan aktiviti meristem, menyokong pemanjangan batang secara konsisten (Geng et al., 2019). Larutan mikrob efektif meningkatkan pertumbuhan secara sederhana, kemungkinan disebabkan proses mineralisasi nutrien yang perlahan dan penambahbaikan struktur tanah beransur-ansur, manakala kawalan (air paip) menunjukkan pertumbuhan paling rendah, bergantung kepada nutrien sedia ada. Peningkatan pertumbuhan yang diperhatikan dalam rawatan larutan mikrob berkemungkinan dipengaruhi oleh kehadiran bakteria daripada genus *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Paenibacillus* yang dikenal pasti dalam kajian ini. Bacteria daripada genus tersebut sering dilaporkan sebagai Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) yang berupaya merangsang pertumbuhan tumbuhan melalui penghasilan fitohormon seperti *indole-3-acetic acid* (IAA), meningkatkan ketersediaan nutrien serta memperbaiki keadaan rizosfera (Kupe et al. 2023; Wang et al. 2025). Kehadiran mikroorganisma ini mungkin menyumbang kepada peningkatan ketinggian pokok bayam yang diperhatikan berbanding kawalan. Analisis ANOVA dua hala menunjukkan bahawa terdapat interaksi yang signifikan antara masa dan jenis rawatan terhadap ketinggian pokok ($F(20,297) = 18.90, p < 0.0001$). Selain itu, kesan utama jenis rawatan juga adalah signifikan ($F(2,297) = 372.30, p < 0.0001$). Purata ketinggian pokok bagi setiap rawatan dipersembahkan sebagai $\text{min} \pm \text{SEM}$ ($n = 10$). Sepanjang tempoh kajian, rawatan baja kimia menghasilkan peningkatan ketinggian pokok yang paling tinggi, daripada 1.49 ± 0.07 cm pada hari ke-0 kepada 7.17 ± 0.62 cm pada hari ke-30. Rawatan larutan mikrob efektif daripada bahan buangan kuda turut menunjukkan peningkatan ketinggian pokok secara beransur-ansur, iaitu daripada 1.33 ± 0.05 cm kepada 3.93 ± 0.25 cm, manakala rawatan kawalan menggunakan air paip mencatatkan peningkatan yang paling rendah, daripada 1.19 ± 0.11 cm kepada 2.16 ± 0.26 cm sepanjang tempoh kajian. Ujian perbandingan berganda Tukey menunjukkan bahawa rawatan baja kimia menghasilkan ketinggian pokok yang signifikan lebih tinggi berbanding larutan mikrob efektif daripada bahan buangan kuda (95% CI: 2.454–4.026 cm; $p < 0.0001$) dan kawalan menggunakan air paip (95% CI: 4.224–5.796 cm; $p < 0.0001$) pada hari ke-30. Walaupun beberapa pencilan yang diperoleh mempunyai persamaan dengan genus yang sering dilaporkan sebagai Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), kajian ini tidak menjalankan ujian khusus seperti penghasilan IAA, pelarutan fosfat atau penghasilan siderophore. Oleh itu, fungsi PGPR bagi pencilan yang diperoleh masih belum dapat disahkan dan memerlukan kajian lanjut.

3.3.2 Kesan rawatan terhadap bilangan daun

Analisis bilangan daun pokok bayam menunjukkan perbezaan jelas antara rawatan (Rajah 3). Pokok yang menerima baja kimia menghasilkan jumlah daun tertinggi, menunjukkan bahawa nutrien yang mudah diserap, terutamanya nitrogen, mempercepat pembentukan daun baharu dan meningkatkan aktiviti fotosintesis (Mohamed, Musa & Abdelmalik, 2023). Selain membekalkan nutrien secara tidak langsung, bakteria seperti *Pseudomonas* dan *Paenibacillus* juga diketahui mampu meningkatkan pengambilan nitrogen dan fosforus oleh tumbuhan. Peningkatan ketersediaan nutrien ini boleh merangsang pembentukan daun baharu dan meningkatkan kadar fotosintesis, sekali gus menyumbang kepada pertambahan bilangan daun dalam rawatan larutan mikrob (Di Benedetto et al. 2017). Rawatan dengan larutan mikrob efektif turut meningkatkan bilangan daun berbanding kawalan, tetapi pertumbuhannya lebih perlahan kerana nutrien dilepaskan secara beransur-ansur oleh aktiviti mikrob daripada bahan buangan kuda. Kawalan (air paip) mencatatkan bilangan daun terendah sepanjang tempoh kajian, menunjukkan bahawa pertumbuhan daun sangat terhad tanpa input nutrien tambahan.



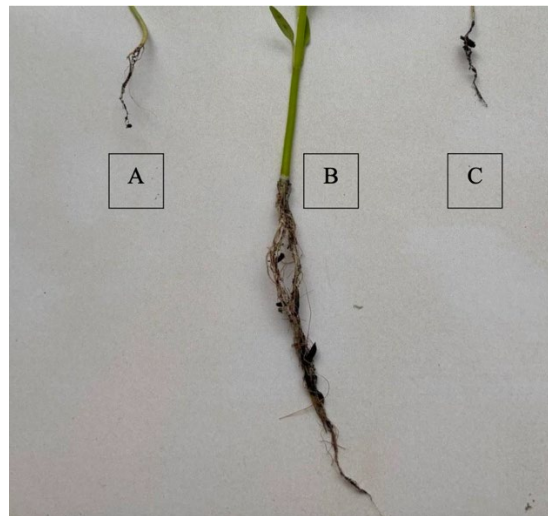
Rajah 3. Graf perbandingan bilangan daun bayam bagi tiga rawatan sepanjang 30 hari. Data dipersembahkan sebagai min $\pm$ SEM ($n = 10$). Huruf yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan berdasarkan ujian Tukey ($p < 0.05$).

Analisis ANOVA dua hala menunjukkan bahawa rawatan baja kimia menghasilkan purata bilangan daun tertinggi sepanjang tempoh kajian (5.16 ± 0.29), diikuti oleh larutan mikrob efektif daripada bahan buangan kuda (3.38 ± 0.37) dan kawalan (2.82 ± 0.22). Semua data dilaporkan sebagai min $\pm$ SEM ($n = 10$). Terdapat kesan signifikan rawatan terhadap bilangan daun pokok bayam [$F(2,297) = 519.4$, $p < 0.0001$]. Ujian perbandingan berganda Tukey menunjukkan bahawa baja kimia menghasilkan bilangan daun yang signifikan lebih tinggi berbanding larutan mikrob efektif (perbezaan min = 1.773; 95% CI: 1.595–1.951; $p < 0.0001$) dan kawalan (perbezaan min = 2.336; 95% CI: 2.158–2.515; $p < 0.0001$). Selain itu, larutan mikrob efektif turut menunjukkan bilangan daun yang signifikan lebih tinggi berbanding kawalan (perbezaan min = 0.5636; 95% CI: 0.3854–0.7418; $p < 0.0001$). Secara keseluruhan, dapatan ini menunjukkan bahawa baja kimia memberikan kesan peningkatan pertumbuhan daun yang lebih cepat, manakala larutan mikrob efektif berpotensi sebagai alternatif baja organik dengan kesan peningkatan pertumbuhan yang sederhana tetapi konsisten.

3.3.3 Kesan rawatan terhadap panjang akar dan struktur akar

Rawatan memberikan kesan yang ketara terhadap panjang dan struktur akar pokok bayam (Rajah 4). Rawatan baja kimia menghasilkan panjang akar purata tertinggi iaitu 6.77 ± 0.73 cm, diikuti oleh larutan mikrob efektif daripada bahan buangan kuda (3.45 ± 0.30 cm) dan kawalan menggunakan air paip (2.62 ± 0.40 cm). Pemerhatian morfologi menunjukkan bahawa akar pokok yang dirawat dengan baja kimia lebih tebal, padat dan mempunyai percabangan lateral yang banyak, mencerminkan keupayaan penyerapan air dan nutrien yang lebih tinggi. Sebaliknya, rawatan larutan mikrob efektif menghasilkan akar serabut yang lebih halus, fleksibel dan mempunyai percabangan lateral yang sederhana, menunjukkan perkembangan sistem akar yang berlaku secara beransur-ansur, yang berkemungkinan dipengaruhi oleh kehadiran bakteria seperti *Bacillus* dan *Burkholderia* yang dilaporkan mampu merangsang perkembangan akar melalui penghasilan bahan penggalak pertumbuhan tumbuhan serta meningkatkan kawasan penyerapan akar (Khalid et al., 2017; Liu et al., 2022). Rawatan kawalan pula menunjukkan panjang akar paling rendah dengan akar primer yang nipis, percabangan lateral yang terhad dan akar serabut yang kurang berkembang, menandakan pertumbuhan yang terbantut akibat ketiadaan input nutrien tambahan. Analisis ANOVA ukuran berulang (Repeated Measures ANOVA) menunjukkan bahawa jenis rawatan memberikan kesan yang signifikan terhadap

panjang akar [$F(1.756, 15.80) = 18.27, p = 0.0001$]. Ujian perbandingan berganda Tukey menunjukkan bahawa rawatan baja kimia menghasilkan panjang akar yang signifikan lebih tinggi berbanding larutan mikrob efektif (perbezaan min = 3.320 cm; 95% CI: 1.169–5.471 cm; $p = 0.0050$) dan kawalan (perbezaan min = 4.150 cm; 95% CI: 1.889–6.411 cm; $p = 0.0016$), manakala tiada perbezaan yang signifikan antara larutan mikrob efektif dan kawalan (perbezaan min = 0.830 cm; 95% CI: -0.785 hingga 2.445 cm; $p = 0.3646$). Keputusan ini menunjukkan bahawa baja kimia memberikan kesan yang lebih dominan terhadap perkembangan sistem akar kerana nutrien yang mudah tersedia dapat diserap dengan segera oleh tumbuhan, manakala larutan mikrob efektif meningkatkan pertumbuhan akar secara lebih beransur-ansur melalui aktiviti mikroorganisma yang memperbaiki keadaan rizosfera. Walaupun kesannya masih lebih rendah berbanding baja kimia dalam tempoh kajian ini, larutan mikrob efektif tetap menunjukkan potensi untuk meningkatkan perkembangan sistem akar berbanding kawalan.



Rajah 4. Panjang akar pokok pada hari ke-30 yang telah diberi siraman larutan mikrob efektif bahan buangan kuda, baja kimia dan air paip. A: Larutan mikrob efektif bahan buangan kuda, B: Baja kimia dan C: Air paip.

4. Kesimpulan

Pencirian morfologi dan ujian biokimia mencadangkan bahawa bakteria yang dipencilkan berkemungkinan tergolong dalam genus *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* dan *Pseudomonas*, manakala kulat yang dikenal pasti termasuk *Cladosporium*, *Penicillium* dan *Rhodotorula*. Kajian ini menunjukkan bahawa bahan buangan kuda mengandungi pelbagai mikroorganisma yang berpotensi memberi manfaat kepada pertumbuhan tumbuhan. Larutan mikrob yang dihasilkan berjaya meningkatkan ketinggian pokok dan bilangan daun bayam berbanding kawalan, walaupun prestasinya masih lebih rendah berbanding baja kimia. Oleh itu, mikrob daripada bahan buangan kuda berpotensi untuk diterokai sebagai sumber biobaja alternatif dalam sistem pertanian lestari. Walau bagaimanapun, pengenalpastian yang dilakukan dalam kajian ini adalah bersifat tentatif kerana hanya berdasarkan ciri morfologi dan ujian biokimia. Pengesahan melalui analisis molekul seperti penjujukan gen 16S rRNA bagi bakteria dan ITS bagi kulat diperlukan untuk menentukan identiti mikroorganisma dengan lebih tepat serta pencirian fungsi mikrob dan penilaian keberkesanan pada skala yang lebih besar diperlukan bagi mengesahkan potensinya sebagai biobaja komersial.

Penghargaan

Penghargaan diberikan kepada Makmal Biologi Molekul, Fakulti Sains dan Teknologi, UKM, Makmal Pengajaran 2, Fakulti Sains dan Teknologi, serta Makmal Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi kerana telah membenarkan penggunaan kemudahan makmal dan peralatan yang diperlukan sepanjang kajian ini dijalankan. Perhargaan juga diberikan kepada pihak pengurusan MAEPS Rubinga Equine Centre atas kebenaran dan kerjasama bagi pengambilan sampel.

Rujukan

- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. & Mahillon, J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology* 10: 302-320.
- Di Benedetto, N.A., Corbo, M.R., Campaniello, D., Cataldi, M.P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M. & Flagella, Z. 2017. The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: A focus on wheat. *AIMS Microbiology* 3(3): 413-434.
- Gashua, A.G., Sulaiman, Z., Yusoff, M.M., Samad, M.Y.A., Ramlan, M.F. & Salisu, M.A. 2022. Assessment of fertilizer quality in horse waste-based bokashi fertilizer formulations. *Agronomy* 12(4): 937-940.
- Geng, Y., Cao, G., Wang, L. & Wang, S. 2019. Effects of equal chemical fertilizer substitutions with organic manure on yield, dry matter, and nitrogen uptake of spring maize and soil nitrogen distribution. *PLoS ONE* 14(7): 210-217.
- Hidayati, Y.A., Yusra, M.R., Puteri, G.C.K., Marlina, E.T., Badruzzaman, D.Z. & Harlia, E. 2023. Macroscopic and microscopic isolation and identification of cellulolytic bacteria from mixtures of coal and beef cattle. *Proceedings of the 3rd International Conference on Environmentally Sustainable Animal Industry 2022 (ICESAI 2022)*. 28: 328-333.
- Khalid, M., Hassani, D., Bilal, M., Asad, F. & Huang, D. 2017. Influence of bio-fertilizer containing beneficial fungi and rhizospheric bacteria on health promoting compounds and antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. *Botanical Studies* 58(1): 576-645.
- Kupe, M., Hacimuftuoglu, F. & Yağanoğlu, E. 2023. Effects of PGPR Bacteria Applications on Soil Properties, Plant Growth and Yield Values in Karaerik and Narince Grape Varieties. *Journal of Agricultural Production* 4(2): 128-137.
- Leck, A. 1999. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health* 12(30): 24.
- Liu, M., Philp, J., Wang, Y., Hu, J., Wei, Y., Li, J., Ryder, M., Toh, R., Zhou, Y., Denton, M.D., Wu, Y. & Yang, H. 2022. Plant growth-promoting rhizobacteria *Burkholderia vietnamiensis* B418 inhibits root-knot nematode on watermelon by modifying the rhizosphere microbial community. *Scientific Reports* 12(1): 8381.
- Lu, E., Li, C., Geng, Y., Liang, T. & Zhang, J. 2024. Effects of long-term fertilization on phosphorus form and availability in black soil. *Applied Sciences* 14(24): 11673.
- Zhang, G., Ferguson, M. & Blodgett, R.J. 2026. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 3: Aerobic plate count conventional plate count method. US Food and Drug Administration. Edisi ke-8. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count> (Tarikh Akses: 2 Januari 2026).
- Mehmood, N., Saeed, M., Zafarullah, S., Hyder, S., Rizvi, Z.F., Gondal, A.S., Jamil, N., Iqbal, R., Ali, B., Ercisli, S. & Kupe, M. 2023. Multifaceted impacts of plant-beneficial *Pseudomonas* spp. in managing various plant diseases and crop yield improvement. *ACS Omega* 8(25): 22296-22315.
- Mohamed, R.E., Musa, L.M. & Abdelmalik, E.M. 2023. Comparative Study on Organic and Inorganic Fertilizers and Their Effects on Growth and Yield of Tomato and Cucumber Under Greenhouse Conditions. *Chemical and Natural Resources Engineering Journal* 7(1): 90-99.
- Mutungwazi, A., Ijoma, G.N., Ogola, H.J.O. & Matambo, T.S. 2022. Physico-chemical and metagenomic profile analyses of animal manures routinely used as inocula in anaerobic digestion for biogas production. *Microorganisms* 10(4): 671.
- Nanjundappa, A., RAM, A.B., Praveen, R., DJ, B. & Revanna, A. 2021. *Pseudomonas* species in soil as a natural resource for plant growth promotion and biocontrol characteristics - an overview. *Madras Agricultural Journal* 108(10-12): 14.
- Paray, A.A., Singh, M. & Amin Mir, M. 2023. Gram staining: a brief review. *International Journal of Research and Review* 10(9): 336-341.
- Tabbassum, R., Naveed, M., Mehboob, I., Babar, M.H., Holatko, J., Akhtar, N., Rafique, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., Kintl, A., Vyhnánek, T. & Mustafa, A. 2022. Comparative response of fermented and non-fermented animal manure combined with split dose of phosphate fertilizer enhances agronomic performance and wheat productivity through enhanced P use efficiency. *Agronomy* 12(10): 2335.
- Urrea, J., Alkorta, I., Lanzén, A., Mijangos, I. & Garbisu, C. 2019. The application of fresh and composted horse and chicken manure affects soil quality, microbial composition and antibiotic resistance. *Applied Soil*

Ecology 135: 73–84.

- Wang, L., Zhang, X., Lu, J. & Huang, L. 2025. Microbial diversity and interactions: Synergistic effects and potential applications of *Pseudomonas* and *Bacillus* consortia. *Microbiological Research* 293: 128054.
- Zhang, Y., Luo, Z., Li, L., Nian, L., Li, L., Niu, Y., He, R. & Liu, J. 2025. Nitrogen Fertilization Shapes Soil Microbial Diversity and Ecosystem Multifunctionality by Modulating Soil Nutrients. *Microorganisms* 13(3): 540.
- Zhang, Y., Ye, C., Su, Y., Peng, W., Lu, R., Liu, Y., Huang, H., He, X., Yang, M. & Zhu, S. 2022. Soil Acidification caused by excessive application of nitrogen fertilizer aggravates soil-borne diseases: Evidence from literature review and field trials. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 340: 108176.

**Undergraduate Research Journal for
Biological Sciences and Biotechnology
ISSN 3120-306X**

**Pengenalpastian Spesies Kulat Penyebab Biodeteriorasi Bangunan Sains
Kimia, Universiti Kebangsaan Malaysia**
(*Identification of Fungal Species Associated with Biodeterioration of the Chemistry
Science Building, Universiti Kebangsaan Malaysia*)

Nurul Wahidah Md Nadzari & Izwan Bharudin

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

**E-mel pengarang koresponden: ibb@ukm.edu.my*

Abstrak: Kulat merupakan mikroorganisma yang tersebar luas dan mampu menyesuaikan diri dengan pelbagai keadaan persekitaran. Pertumbuhan kulat pada dinding bangunan bukan sahaja menjejaskan estetika, malah boleh menjejaskan struktur bangunan. Kajian ini dijalankan untuk memencil dan mengenal pasti spesies kulat daripada dinding luar Bangunan Sains Kimia, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Pencilan kulat dilakukan melalui kaedah *swabbing*, diikuti pencairan bersiri, seterusnya dieramkan pada agar Ros Bengal (*Rose Bengal Agar*, RBA) dan dipindahkan ke agar dekstrosa kentang (*potato dextrose agar*, PDA) untuk mendapatkan kultur tulen. Pemerhatian morfologi makroskopik dan mikroskopik dijalankan dengan menilai ciri koloni seperti warna, bentuk, tekstur dan kadar pertumbuhan, serta struktur kulat menggunakan larutan *methylene blue* di bawah mikroskop cahaya. Pengenalpastian spesies kulat dilakukan melalui amplifikasi jujukan *Internal Transcribed Spacer* (ITS), gen β -tubulin dan gen EF-1 α menggunakan tindak balas berantai polimerase (PCR). Hasil kajian menunjukkan 14 pencilan kulat berbeza secara morfologi, dan analisis molekul mengenal pasti empat spesies iaitu *Pyrrhoderma noxium*, *Nigrospora sphaerica*, *Fusarium brasiliense* dan *Humicola glauca*. Kajian ini berjaya memencil dan mengenal pasti kulat pada dinding luar, yang kehadirannya berkait rapat dengan persekitaran.

Kata kunci: Mikoflora; jujukan penjarak transkripsi dalaman; patogen tumbuhan; morfologi kulat; bangunan warisan

Abstract: Fungi are widely distributed microorganisms with high adaptability to diverse environments. Their growth on building walls not only affects aesthetics but may also compromise structural integrity. This study aimed to isolate and identify fungal species from the exterior walls of the Chemical Sciences Building, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Fungal isolates were obtained using swabbing, followed by serial dilution and incubation on Rose Bengal Agar (RBA), and then transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) to obtain pure cultures. Macroscopic and microscopic observations assessed colony characteristics such as colour, shape, texture, and growth rate, and fungal structures were examined using methylene blue under a light microscope. Molecular identification was performed by amplifying the internal transcribed spacer (ITS) region, β -tubulin, and elongation factor 1-alpha (EF-1 α) genes using polymerase chain reaction (PCR). 14 morphologically distinct fungal isolates were obtained, confirming the presence of mycoflora on building walls. Molecular analysis identified four species: *Pyrrhoderma noxium*, *Nigrospora sphaerica*, *Fusarium brasiliense*, and *Humicola glauca*. This study successfully isolated and identified fungi on the building exterior, with their presence closely linked to surrounding environmental sources such as soil and vegetation.

Keywords: Mycoflora; internal transcribed spacer (ITS); plant pathogen, fungi morphology, heritage building

1. Pendahuluan

Kulat adalah mikroorganisma yang boleh menghuni biosfera secara meluas. Kulat boleh dijumpai di pelbagai lokasi seperti udara, air, dan tanah, menunjukkan bahawa kulat mempunyai pengaruh terhadap kehidupan harian kita secara langsung atau tidak langsung (Tyagi et al. 2021). Walaupun kulat terkenal sebagai pengurai semula jadi dalam ekosistem, pertumbuhan kulat pada bangunan boleh menyebabkan kerosakan fizikal dan estetika, seperti tompokan, perubahan warna, dan kemerosotan struktur (Dias et al. 2020).

Pertumbuhan kulat tidak terhad di permukaan yang semula jadi, ia juga mampu menyesuaikan diri pada permukaan bangunan sehingga boleh menyebabkan kerosakan dalam jangka masa panjang. Menurut Ma (2021), fenomena ini dapat dijelaskan melalui konsep lompatan habitat yang berpunca daripada perubahan iklim dan keadaan persekitaran yang unik menyebabkan perpindahan organisma dari habitat asal ke habitat baharu kerana terdapat sumber nutrien daripada bahan binaan organik pada bangunan. Pertumbuhan kulat juga boleh dipengaruhi oleh keadaan persekitaran seperti suhu, kelembapan, sifat kimia substrat, dan tahap ketersediaan air yang rendah (Straus et al. 2003). Menurut MET Malaysia, Malaysia adalah sebuah negara yang mempunyai iklim tropika dengan suhu yang seragam, kelembapan tinggi, dan hujan lebat, keadaan lembap ini boleh menyokong pembentukan biofilm yang ketara (Allsopp et al. 2004).

Oleh itu, proses pemuliharaan yang hendak dilakukan pada bangunan haruslah dilakukan berhati-hati dengan mengambil kira sifat fizikal dan kimia bahan binaan, jenis mikroorganisma yang terlibat, serta mekanisme degradasi bagi memastikan teknik rawatan berkesan dan tahan lama (Tyagi et al. 2021). Namun, kebanyakan kajian tempatan pada masa ini kurang menumpukan kepada aspek biodeteriorasi bangunan warisan. Kajian sedia ada kebanyakannya hanya mengenal pasti kulat pada bangunan pejabat dan hospital atau meneliti tahap kepekatan kulat antara permukaan dalaman dan luaran bangunan. Walaupun kajian biodiversiti kulat pada bangunan telah dijalankan secara meluas di luar negara, data bagi persekitaran tropika seperti Malaysia masih terhad, khususnya bagi bangunan bukan warisan. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mengumpulkan data kumpulan kulat yang terdapat pada permukaan bangunan yang rosak. Diharapkan data yang dikumpulkan ini dapat digunakan dalam proses pemuliharaan bangunan di kawasan beriklim tropika pada masa hadapan. Selain itu, kajian yang menumpukan kepada pemuliharaan bangunan warisan di Malaysia juga tidak mengkaji punca biologi seperti kulat secara mendalam dan data sedia ada masih terhad. Integrasi hasil kajian bangunan warisan daripada luar negara pula, mungkin tidak dapat diterapkan sepenuhnya disebabkan perbezaan iklim dan bahan binaan.

2. Bahan dan Kaedah Kajian

2.1 Persampelan Kulat

Sampel kulat dipencilkan daripada tiga bahagian dinding luar Bangunan Sains Kimia, UKM (2.923123, 101.781055) pada hari yang sama seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1. Pemencilan dilakukan menggunakan kaedah calitan dari kawasan yang dipilih menggunakan putik kapas steril. Putik kapas tersebut kemudian disimpan dalam tiub Falcon steril pada suhu bilik sebelum dibawa ke makmal untuk analisis lanjut.



Rajah 1. Lokasi persampelan kulat. K merujuk kepada kawasan.

2.2 *Pencairan Bersiri*

Putik kapas yang mengandungi sampel kulat dari tiga lokasi berbeza masing-masing dimasukkan ke dalam 10 mL air suling steril untuk menghasilkan larutan stok (10^0). Pencairan bersiri dilakukan dengan memindahkan 1 mL larutan stok ke dalam 9 mL air suling steril bagi menghasilkan larutan dengan pencairan 10^{-1} . Prosedur ini diulangi secara berperingkat diikuti dengan vortex sehingga pencairan 10^{-6} diperoleh. Semua langkah pencairan dijalankan secara aseptik. Sebanyak 0.2 mL daripada larutan stok dan setiap larutan yang telah dicairkan disebar ke atas piring RBA yang diperolehi daripada Oxoid Ltd, England. Kemudian, piring petri dieramkan pada suhu 30 ± 2 °C selama 7 hari.

2.3 *Pemerhatian makroskopik dan mikroskopik*

Bagi pemerhatian makroskopik, sampel disediakan dengan memotong plak kira-kira 1 cm³ daripada piring RBA kepada piring PDA daripada Sigma Aldrich, Amerika Syarikat. Bagi kulat yang berspora, gelung inokulasi steril digunakan untuk mengambil spora daripada RBA dan meletakkannya di tengah piring PDA. Koloni kulat tersebut dieramkan dan diperhatikan pada hari ke-7 sehingga hari ke-21 untuk membolehkan pertumbuhan penuh koloni pada permukaan PDA, bergantung kepada jenis kulat. Bagi pemerhatian mikroskopik, koloni kulat yang telah bertumbuh sepenuhnya pada PDA diperiksa menggunakan mikroskop cahaya model AmScope MU Series 1.3MP daripada Amerika Syarikat. Bagi kulat berfilamen, sampel disediakan menggunakan kaedah pita selofan, manakala bagi kulat berspora, gelung inokulasi steril digunakan untuk mengambil bahagian berspora dan diletakkan pada 10 µL pewarna *methylene blue* di atas slaid kaca. Pemerhatian mikroskopik dilakukan pada kuasa pembesaran 100×, dengan skala 10 µm.

2.4 *Pengekstrakan DNA Genom*

Proses pengekstrakan DNA genom kulat dilakukan menggunakan kaedah Setiltrimetilamonium bromida atau CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1.4 M NaCl, 25 mM EDTA, 2% CTAB) seperti yang diterangkan oleh Doyle dan Doyle (1987). Walau bagaimanapun, kaedah CTAB ini telah dimodifikasi. Kuantiti DNA genom yang diperoleh ditentukan menggunakan spektrofotometer NanoDrop ND-1000, manakala kualiti DNA genom dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 1% pada voltan 95 V selama 30 min. Penimbal yang digunakan sepanjang eksperimen analisis gel agarosa ialah penimbal dengan kepekatan 10× daripada Vazyme Biotech Co, China, manakala penanda DNA bersaiz 1 kb (kilobes) dibekalkan oleh Vivantis Technologies. Gel kemudiannya diperhatikan di bawah penyinaran ultraungu (UV) menggunakan mesin SmartView Pro 1100 Imager System sebelum proses seterusnya.

2.5 *Tindakbalas Berantai Polimerase*

Tindak balas berantai polimerase dijalankan pada DNA genom yang telah diekstrak dengan menggunakan kit komersial daripada Vazyme Biotech Co, China. Kawasan yang diamplifikasi adalah ITS1-5.8S-ITS2 (500~600bp) menggunakan pencetus universal ITS1&4 (ITS_F: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCG; ITS_R: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC). Kawasan gen EF1- α (500~600bp) diamplifikasi dengan pencetus EF11018F&R (EF_F: 5' GAYTTCATCAAGAACATGAT; ITS_R: 5' GACGTTGAADCCACRATTGTC) manakala kawasan gen β -tubulin (400~600bp) diamplifikasi dengan pencetus Bt2a-F&R: (BT_F: 5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC; BT_R: 5' ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC). Komponen lengkap bagi tindak balas PCR diberikan di dalam Jadual 1. Parameter kitaran PCR ialah pemanasan awal pada 95 °C selama 3 min, diikuti dengan penyahaslian pada 95 °C selama 15 s (saat), penyepuhan pada 50 °C selama 15 s untuk kawasan gen ITS dan EF1- α , serta 52 °C untuk gen β -tubulin, pemanjangan pada 72 °C selama 1 min dan diakhiri dengan pemanjangan terakhir pada 72 °C selama 5 min.

Jadual 1. Komponen campuran tindak balas PCR.

Komponen	Isipadu (μL)
<i>Taq II PCR Master Mix</i> (2X)	6.25
Pencetus Hadapan (10 μM)	0.5
Pencetus Belakang (10 μL)	0.5
DNA genom (100ng)	1.0
ddH ₂ O	4.25
Jumlah	12.5

2.6 Penulenan, penjujukan produk PCR dan analisis filogenetik

Penulenan produk PCR dijalankan menggunakan kit penulenan gel (NucleoSpin Gel and PCR Clean up) yang dibekalkan oleh Macherey Nagel, Jerman mengikut protokol pengeluar dengan beberapa pengubahsuaian kecil dan produk PCR yang telah dituliskan dihantar sebanyak 6 μL kepada Syarikat Apical Scientific, Malaysia untuk proses penjujukan menggunakan kaedah penjujukan Sanger dan jujukan nukleotida yang diperoleh dianalisis kualitinya dengan menggunakan perisian Chromas sebelum jujukan dibandingkan dengan jujukan sedia ada dalam pangkalan data GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) melalui perisian Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) nukleotida

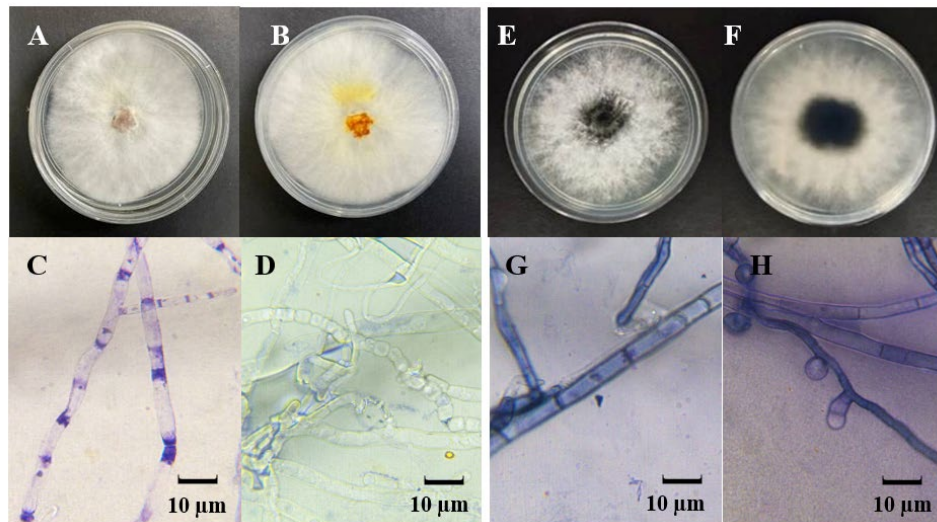
(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LC=blasthome) dan jujukan yang menunjukkan peratusan identiti melebihi 98% dipilih bagi analisis filogenetik, yang dilakukan dengan melakukan analisis penjajaran jujukan DNA melalui perisian Muscle (Jalview) (Edgar 2004), seterusnya pohon filogeni dibentuk dengan menggunakan perisian MEGA 12 (Kumar et al. 2024) bagi mengenalpasti kumpulan kulat yang dipencilkan, di mana pohon filogeni yang dihasilkan menggunakan algoritma kebolehjadian maksimum dinilai keteguhannya dengan menggunakan analisis *Bootstrap* dengan 1000 kali replikasi.

3. Hasil dan Perbincangan

Pemerhatian makroskopik dijalankan selepas kulat tumbuh secara penuh pada permukaan PDA dan sebanyak 14 koloni kulat yang menunjukkan perbezaan morfologi telah direkodkan dan disimpan. Daripada jumlah tersebut, empat koloni kulat telah dipilih untuk pemerhatian dan penentuan spesies.

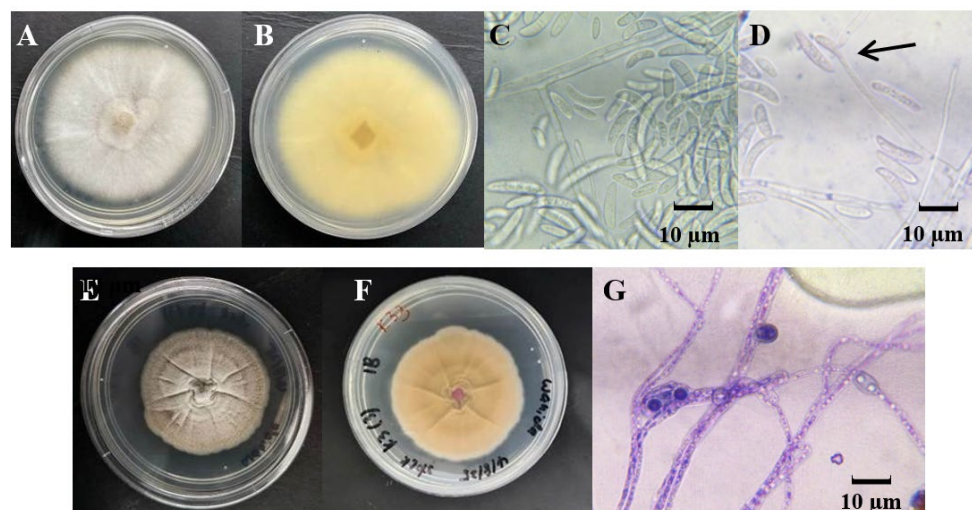
3.1 Pemerhatian makroskopik dan mikroskopik

Bagi koloni K24 (Rajah 2A), menunjukkan bahagian depan koloni yang berwarna putih dan bertekstur flokus jarang, manakala bahagian belakangnya (Rajah 2B) berwarna putih tetapi menghasilkan pigmen kuning yang meresap di tengah koloni. Pinggir koloni terbentuk secara sekata dan lut cahaya. Dari pemerhatian mikroskopik pula, kulat membentuk hifa bersepta dan struktur menyerupai arthrokonidia (Rajah 2C-D). Seterusnya, pencilan K25 (Rajah 2E) mempunyai koloni yang tebal, tumbuh dalam pola bersepusat dan mempunyai tekstur flokus putih yang tebal dari pandangan depan. Pinggir koloni yang lut cahaya tumbuh secara lobat. Di pandangan belakang pula (Rajah 2F), koloni ini menghasilkan pigmen berwarna hitam yang tersebar dalam agar PDA. Pemerhatian mikroskopik pula menunjukkan hifa bersepta (Rajah 2G) dan sel konidiogenus berbentuk globos namun belum menghasilkan struktur konidia yang matang (Rajah 2H).



Rajah 2. Pencilan kulat K24 dan K25. Menunjukkan hasil pemerhatian secara makroskopik dan mikroskopik dibawah mikroskop cahaya.

Koloni K32, koloni tidak tebal dan tumbuh dalam pola bersepusat. Bahagian depan koloni (Rajah 3A) mempunyai tekstur flokus yang jarang dan berwarna putih, manakala bahagian belakang (Rajah 3B) berwarna kuning. Tepi koloni pula adalah berbentuk sekata dan berwarna putih. Struktur hifa bersepta telah diperhatikan (Rajah 3C) manakala struktur lain seperti konidia juga terbentuk. Konidia adalah hialin, berbentuk bujur atau elipsoid, mempunyai sel monofialida yang terletak di bahagian puncak (Rajah 3D). Koloni K33 adalah tebal, berbentuk pola bersepusat dan mempunyai struktur yang berlipat pada pandangan hadapan dan belakang. Warna koloni di pandangan hadapan (Rajah 3E) ialah coklat muda dan di bahagian belakang koloni ini berwarna kuning (Rajah 3F), manakala di pinggirnya pula berwarna putih dan beralun. Sel berbentuk bulat hingga bujur ialah klamidospora (Rajah 3G) yang terbentuk daripada hifa sama ada pada terminal dan interkalari yang berfungsi sebagai strategi adaptasi kulat untuk menghadapi tekanan persekitaran (Burley 2004).



Rajah 3. Pencilan kulat K32 dan K33. Menunjukkan hasil pemerhatian secara makroskopik dan mikroskopik dibawah mikroskop cahaya.

3.2 Hasil pengekstrakan DNA Genom & PCR

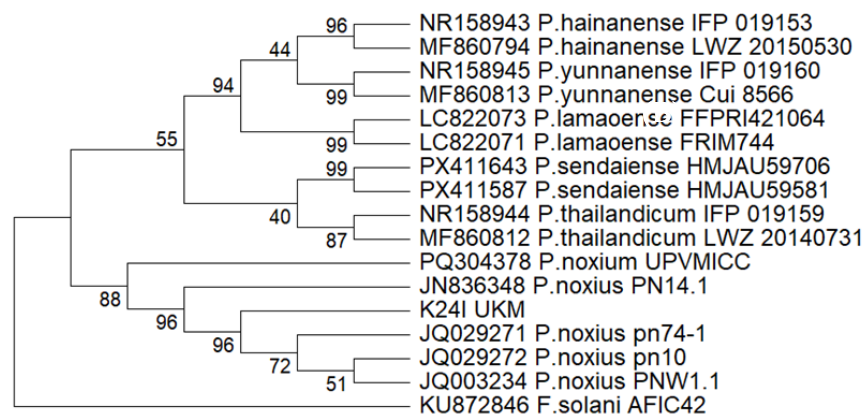
Pengekstrakan DNA genom telah berjaya dilakukan ke atas empat pencilan kulat iaitu K24, K25, K32 dan K33 sahaja. Hal ini kerana pencilan kulat seperti K24 dan K25 menunjukkan pertumbuhan pesat dan stabil, dengan koloni penuh terbentuk dalam masa yang paling singkat iaitu 3 hingga 4 hari pada PDA. Koloni yang cepat membentuk miselium padat ini lebih sesuai untuk pengekstrakan DNA, kerana membekalkan sumber DNA genom yang mencukupi dan tidak memerlukan tempoh

pengeraman terlalu lama. Selain itu, kepekatan dan ketulen DNA turut dianalisis melalui nisbah serapan A260/A280 bagi mengesan kontaminasi protein serta A260/A230 bagi mengenal pasti kehadiran sebatian fenolik atau karbohidrat. Nilai nisbah dan kepekatan yang diperoleh menunjukkan tahap ketulen DNA yang boleh digunakan untuk aplikasi PCR.

Selanjutnya, proses amplifikasi kawasan ITS dan gen EF1- α dalam genom bagi pencilan K24, K25, K32 dan K33 telah berjaya dijalankan menggunakan pasangan pencetus masing masing. Produk PCR bagi kawasan ITS dan gen EF1- α yang diperoleh menunjukkan saiz jalur sekitar 500 sehingga 600 bp, selari dengan saiz jangkaan apabila dibandingkan dengan penanda VC 1 kb. Amplifikasi kawasan gen β -tubulin pada pencilan kulat K25, K32 dan K33 berjaya dilakukan menggunakan pasangan pencetus Bt2a-F dan Bt2a-R. Saiz produk PCR yang terhasil berada dalam julat jangkaan iaitu sekitar 400-600 bp, berdasarkan perbandingan dengan penanda VC 1 kb.

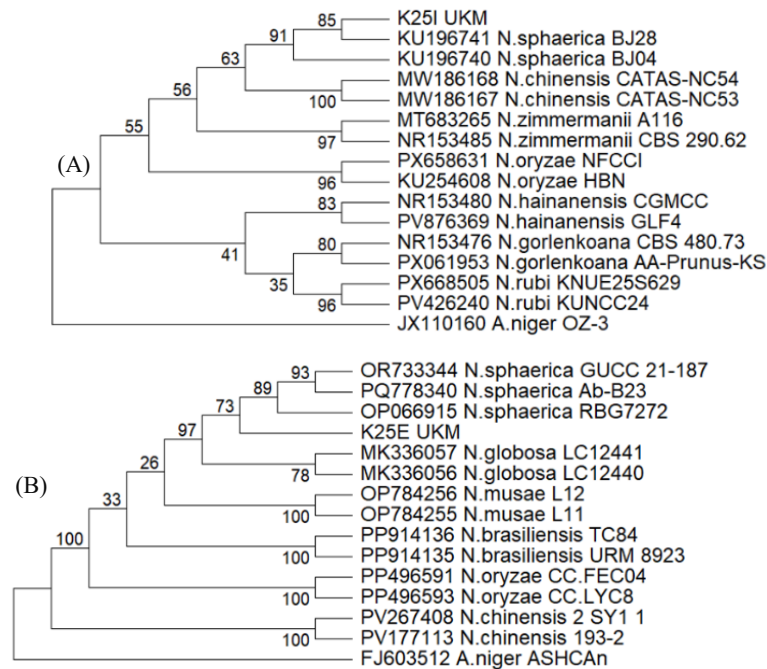
3.3 Analisis filogenetik

Dalam kajian ini, pohon filogeni bagi K24I dibina melalui model Tamura 3-parameter model dengan kadar dan corak gamma distributed with invariant sites (G+I). Berdasarkan analisis filogenetik jujukan kawasan ITS, pencilan K24 dikenal pasti tergolong dalam klad *Pyrrhoderma noxium* dengan nilai *Bootstrap* yang tinggi iaitu 96 (Rajah 4), menunjukkan sokongan filogenetik yang kukuh terhadap pengelompokan tersebut serta membezakannya daripada spesies *Pyrrhoderma* yang lain. Walau bagaimanapun, pengenalan ini adalah berdasarkan satu penanda molekul sahaja, dan penentuan sempadan spesies yang tepat lazimnya sukar dicapai apabila hanya satu penanda molekul digunakan, kerana perbezaan jujukan antara spesies yang rapat selalunya sangat terhad apabila penanda ITS digunakan (Kausar et al. 2023). berdasarkan kedudukannya, pencilan K24 berkemungkinan besar merupakan *P. noxium*, iaitu kulat patogen penting yang menyebabkan penyakit reput akar perang dan telah dilaporkan menyerang lebih daripada 200 spesies tumbuhan daripada pelbagai kumpulan hidupan, terutamanya di kawasan tropika dan subtropika di seluruh dunia (Panchalingam et al. 2022).



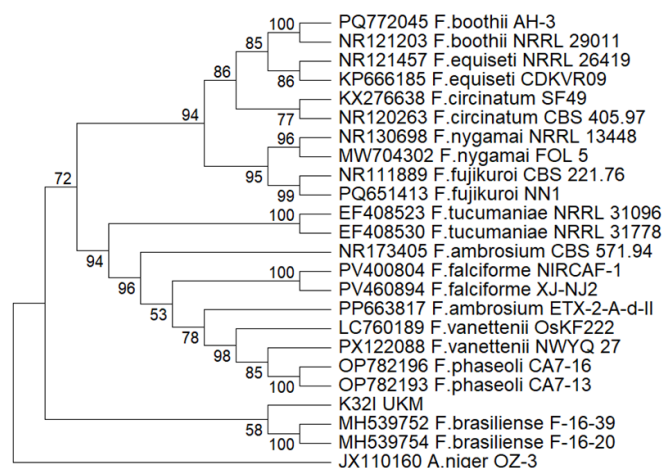
Rajah 4. Pokok filogenetik yang dihasilkan untuk pencilan K24. K24 dalam klad yang sama dengan *P. noxium* apabila penanda ITS digunakan.

Seterusnya, analisis jujukan kawasan ITS bagi pencilan K25 dibina menggunakan model Kimura two-parameter dengan invariant sites (I). Pencilan K25 dikelompokkan dalam klad yang sama dengan *Nigrospora sphaerica* strain BJ28 dengan nilai *Bootstrap* 85, menunjukkan sokongan filogenetik yang kukuh (Rajah 5A). Corak yang sama turut diperoleh dalam analisis menggunakan penanda gen elongation factor 1-alpha (EF-1 α) (Rajah 5B), di mana K25 sekali lagi dikelompokkan bersama klad *N. sphaerica* dengan nilai bootstrap 73. Keseragaman keputusan daripada kedua-dua penanda molekul ini mengesahkan bahawa pencilan K25 dikenal pasti sebagai *N.sphaerica*, kulat yang lazim menyebabkan penyakit bintik daun pada tumbuhan (Xu et al. 2022).



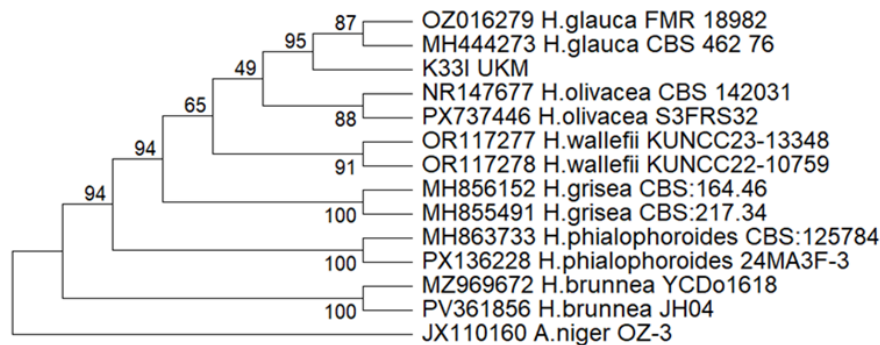
Rajah 5. Pokok filogenetik yang dihasilkan untuk penciran kulat K25. K25 ditempatkan dalam klad yang sama dengan *N. sphaerica* apabila penanda ITS dan penanda gen EF-1 α digunakan.

Selanjutnya, pohon filogeni bagi K32 bagi analisis jujukan kawasan ITS dihasilkan menggunakan Tamura 3-parameter model dengan kadar dan corak gamma distributed (G). K32 ditempatkan dalam klad yang sama dengan *Fusarium brasiliense* dengan nilai *Bootstrap* yang sederhana iaitu 58 (Rajah 6). Pendekatan molekul dengan menggunakan penanda ITS yang terpulihara dalam beberapa spesies adalah sesuai bagi membezakan spesies bagi kebanyakan kulat. (Nosratabadi et al. 2019). Namun, pengenalpastian spesies *Fusarium* menggunakan ITS sahaja adalah tidak mencukupi memandangkan terdapat variabiliti jujukan ITS yang rendah pada kompleks spesies *Fusarium solani* (FSSC) (Mirhendi et al. 2010). Oleh itu, penanda seperti gen β -tubulin yang meluas digunakan dalam analisis filogenetik kulat didapati lebih dipercayai untuk pembezaan spesies *Fusarium* berbanding kawasan ITS, kerana penanda ini mampu menghasilkan pemisahan spesies yang lebih jelas (Myburg et al. 2002). Menurut Nosratabadi et al. (2019), walaupun gen β tubulin memberikan pengenalpastian spesies *Fusarium* yang lebih baik berbanding ITS, penanda ini masih mempunyai keterbatasan dalam membezakan beberapa spesies tertentu. Justeru, pengesahan spesies di masa akan datang memerlukan penggunaan analisis multilokus berasaskan penjujukan gen lain seperti RPB1 dan RPB2.



Rajah 6. Pokok filogenetik yang dihasilkan untuk penciran K32. K32 dalam klad yang sama dengan *Fusarium brasiliense* apabila penanda ITS digunakan.

Seterusnya, analisis filogenetik berdasarkan jujukan kawasan ITS bagi pencilan K33 yang dibina menggunakan model Kimura two-parameter dengan kadar dan corak invariant sites (I) menunjukkan bahawa pencilan ini berkelompok dalam klad yang sama dengan *Humicola glauca* iaitu suatu spesies yang biasa dijumpai di persekitaran dalaman bangunan, tanah dan habitat kompos (Wang et al. 2019). Nilai *Bootstrap* yang tinggi iaitu 95 menyokong perkelompokan pencilan K33 dalam spesies tersebut (Rajah 7).



Rajah 7. Pokok filogenetik yang dihasilkan untuk pencilan K33. K33 dalam klad yang sama dengan *Humicola glauca* apabila penanda ITS digunakan.

4. Kesimpulan

Pencilan kulat daripada dinding bangunan Sains Kimia, UKM berjaya dilakukan. Sebanyak 14 pencilan kulat yang berbeza secara morfologi telah direkodkan dan disimpan. Sehubungan itu, sebanyak 4 koloni kulat digunakan untuk penentuan spesies melalui kaedah amplifikasi berdasarkan jujukan penjarak transkripsi, jujukan gen β -tubulin dan jujukan gen EF1- α . Hasil mendapati kulat daripada filum Ascomycota adalah yang dominan dengan kehadiran tiga pencilan kulat iaitu *Nigrospora sphaerica*, *Fusarium brasiliense*, *Humicola glauca* dan satu pencilan kulat lagi dikenal pasti daripada filum Basidiomycota, iaitu *Pyrrhoderma noxium*. Kebanyakan kulat yang ditemui merupakan kulat patogen tumbuhan atau kulat yang lazimnya berasal daripada persekitaran tanah. Oleh itu, penemuan ini mencadangkan berlakunya peralihan atau peluasan habitat, di mana organisma tersebut berupaya menjajah habitat baharu, berkemungkinan disokong oleh kehadiran sumber nutrien daripada pengumpulan bahan organik pada permukaan bangunan.

Penghargaan

Terima kasih ditujukan kepada Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) serta Malaysia Genome and Vaccine Institute (MGVI) atas kemudahan makmal dan sokongan penyelidikan yang disediakan. Terima kasih juga kepada semua warga Makmal Biologi Molekul MGVI, khususnya Aisyah Fatiha, Jonathan Ling dan Domniq Pavitiren atas nasihat, bantuan dan perkongsian idea yang amat dihargai dalam menyiapkan kajian ini.

Rujukan

- Allsopp, D., Seal, K.J. & Gaylarde, C.C. 2004. *Introduction to biodeterioration*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Burley, J. 2004. *Encyclopedia of Forest Sciences*. ScienceDirect
- Dias, L., Rosado, T., Candeias, A., Mirão, J. & Caldeira, A.T. 2020. Linking ornamental stone discolouration to its biocolonisation state. *Building and Environment* 180: 106934.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792–1797.
- Kausrud, H. 2023. ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology* 65: 101274.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S. & Tamura, K. 2024. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology*

- and *Evolution* 41: 1–9.
- Ma, Z.S. 2021. Niche-neutral theoretic approach to mechanisms underlying biodiversity and biogeography of human microbiomes. *Evolutionary Applications* 14(2): 322–334.
- Mirhendi, H., Ghiasian, A., Vismer, H., Asgary, M.R., Jalalizand, N., Arendrup, M.C. & Makimura, K. 2010. Preliminary identification and typing of pathogenic and toxigenic *Fusarium* species. *Iranian Journal of Public Health* 39(4): 35–44
- Myburg, H., Gryzenhout, M., Wingfield, B.D. & Wingfield, M.J. 2002. β -tubulin and histone H3 gene sequences distinguish *Cryphonectria cubensis*. *Canadian Journal of Botany* 80(6): 590–596.
- Nosratabadi, M., Kachuei, R., Rezaie, S. & Harchegani, A.B. 2018. Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species. *Le Infezioni in Medicina* 26(1): 52–60.
- Panchalingam, H., Powell, D., Adra, C., Foster, K., Tomlin, R., Quigley, B. L., Nyari, S., Hayes, R. A., Shapcott, A., & Kurtböke, D. İ. 2022. Assessing the Various Antagonistic Mechanisms of *Trichoderma* Strains against the Brown Root Rot Pathogen *Pyrrhoderma noxium* Infecting Heritage Fig Trees. *Journal of Fungi*, 8(10), 1105.
- Straus, D. C., Cooley, J., Wong, W. C., & Jumper, C. 2003. Studies on the Role of Fungi in Sick Building Syndrome. *Archives of Environmental Health*, 58(8), 475–478.
- Tyagi, P., Verma, R.K. & Jain, N. 2021. Fungal degradation of cultural heritage monuments. *Current Science* 121(12): 1553–1560.
- Wang, X. W., Yang, F. Y., Meijer, M., Kraak, B., Sun, B. D., Jiang, Y. L., Wu, Y. M., Bai, F. Y., Seifert, K. A., Crous, P. W., Samson, R. A., & Houbraken, J. 2019. Redefining *Humicola sensu stricto* and related genera in the *Chaetomiaceae*. *Studies in Mycology*, 93(1), 65–153.
- Xu, T., Song, Z., Hou, Y., Liu, S., Li, X., Yang, Q., & Wu, S. 2022. Secondary metabolites of the genus *Nigrospora* from terrestrial and marine habitats: Chemical diversity and biological activity. *Fitoterapia*, 161, 105254.

Analisis Kajian Sistematis Gen UCP1, PRDM16 dan MT-ND1 terhadap Penyakit Distrofi Otot

*(Systematic Review Analysis of UCP1, PRDM16 and MT-ND1 Genes on Muscular
Dystrophy)*

**Shahrul Hisham Z.A.^{1*}, ‘Alya Natasya M.R.¹, Puteri Qurratul Aini
A.M.¹, Rohaya Megat A.W.² & Intan Zarina Z.A.³**

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

²Jabatan Ortodontik, Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

³Jabatan Sains Farmaseutikal, Fakulti Farmasi, Universiti Cyberjaya, 63000 Cyberjaya, Selangor, Malaysia

*E-mel pengarang koresponden: hisham@ukm.edu.my

Abstract: Muscular dystrophy is an X-linked recessive genetic disorder that is commonly inherited from mothers to their male offspring. A systematic review approach was employed in this study to obtain information on mutations in the UCP1, PRDM16, and MT-ND1 genes that are involved in various human diseases, particularly those presenting muscular dystrophy symptoms. Although numerous previous studies have reported the effects of mutations in these target genes on human health, their specific associations with muscular dystrophy remain limited. Therefore, the objective of this study was to identify mutations in the MT-ND1, UCP1, and PRDM16 genes that may be associated with muscular dystrophy through a systematic review analysis. The review was conducted in accordance with PRISMA guidelines, involving a search of articles published between 2015 and 2025 from five electronic databases: PubMed, Web of Science, Medline, Scopus, and ScienceDirect. The screening results showed that 13 out of 290 articles for the MT-ND1 gene, 3 out of 330 articles for the PRDM16 gene, and 4 out of 204 articles for the UCP1 gene met the inclusion and exclusion criteria and were assessed for quality using the Q-Genie tool. The findings revealed that mutations in the MT-ND1 gene, including variants m.3376G>A, m.4171C>A, m.3697G>A, m.3890G>A, and m.3685T>C, were associated with diseases such as Mitochondrial encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes and Leigh syndrome, which exhibit symptoms resembling muscular dystrophy. Furthermore, mutations in the PRDM16 gene (rs2493292) and the UCP1 gene (rs10011540) also showed overlapping clinical symptoms with muscular dystrophy. In conclusion, mutations in these genes do not directly cause muscular dystrophy but are involved in other diseases that share similar clinical symptoms.

Keywords: Systematic analysis, *MT-ND1*, *UCP1*, *PRDM16*, muscular dystrophy

Abstrak: Distrofi otot merupakan penyakit genetik resesif terangkai-X yang lazimnya diwarisi daripada ibu kepada anak lelaki. Analisis tinjauan sistematik digunakan dalam kajian ini bagi memperoleh maklumat berkaitan mutasi gen UCP1, PRDM16 dan MT-ND1 yang terlibat dalam pelbagai penyakit manusia, khususnya yang menunjukkan simptom distrofi otot. Walaupun pelbagai kajian terdahulu telah melaporkan kesan mutasi pada gen-gen sasaran ini terhadap kesihatan manusia, hubungan spesifiknya dengan penyakit distrofi otot masih terhad. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk mengenal pasti mutasi pada gen MT-ND1, UCP1 dan PRDM16 yang berpotensi terlibat dalam distrofi otot melalui analisis tinjauan sistematik. Kajian ini dijalankan mengikut garis panduan PRISMA dengan pencarian artikel yang diterbitkan antara tahun 2015 hingga 2025 daripada lima pangkalan data elektronik iaitu PubMed, Web of Science, Medline, Scopus dan ScienceDirect. Hasil saringan mendapati sebanyak 13 daripada 290 artikel bagi gen MT-ND1, 3 daripada 330 artikel bagi gen PRDM16, dan 4 daripada 204 artikel bagi gen UCP1 telah memenuhi kriteria kemasukan dan pengecualian serta dinilai menggunakan alat Q-Genie. Hasil kajian menunjukkan bahawa mutasi pada gen MT-ND1, iaitu varian m.3376G>A, m.4171C>A, m.3697G>A, m.3890G>A dan m.3685T>C, dikaitkan dengan penyakit seperti Ensefalopati mitokondria, Asidosis Laktik, dan episod menyerupai Strok dan Sindrom Leigh yang menunjukkan simptom menyerupai distrofi otot. Selain itu, mutasi pada gen PRDM16 (rs2493292) dan gen UCP1 (rs10011540) turut menunjukkan potensi pertindihan simptom berkaitan distrofi otot. Kesimpulannya, mutasi pada gen-gen ini tidak menyebabkan distrofi otot secara langsung namun terlibat dalam penyakit lain yang berkongsi simptom yang hampir serupa.

Kata kunci: Analisis sistematik, *MT-ND1*, *UCP1*, *PRDM16*, distrofi otot

1. Pendahuluan

Pendekatan analisis tinjauan sistematik digunakan untuk mengumpulkan maklumat terkini tentang mutasi dalam gen sasaran daripada pelbagai kajian terdahulu. Kaedah ini membantu dalam mengenal pasti jenis mutasi yang berlaku dan patogenesis penyakit kepada manusia. Tiga gen sasaran yang menjadi fokus dalam kajian ini ialah *UCP1*, *PRDM16* dan *MT-ND1*. Terdapat pelbagai jenis distrofi otot, termasuk *Duchenne Muscular Dystrophy* (DMD), *Becker Muscular Dystrophy* (BMD), dan *Congenital Muscular Dystrophy* (CMD). Secara global, kira-kira 3.6 daripada setiap 100,000 orang menghidap distrofi otot. Di Malaysia, penyakit ini masih dikategorikan sebagai jarang jumpa kerana hanya berlaku pada kira-kira 1 daripada 4,000 individu. Antara simptom distrofi otot ialah kemerosotan dan kelemahan otot, masalah penglihatan, dan masalah pernafasan, (Liaqat et al. 2022).

Gen *UCP1* (*Uncoupling Protein 1*) membolehkan ion proton dari intermembran mitokondria menembusi semula ke dalam matriks mitokondria tanpa melalui proses fosforilasi oksidatif ADP. Sintesis ATP akan berkurangan manakala kadar respirasi sel meningkat yang sekali gus membebaskan tenaga dalam bentuk haba. Sel lemak coklat menunjukkan ekspresi gen *UCP1* yang paling tinggi dalam tubuh manusia dan terlibat dalam proses termogenesis tanpa menggigil dengan menghasilkan haba (Pravednikova et al. 2020). Mutasi pada gen ini boleh menyebabkan gangguan termoregulasi yang juga ada dikaitkan dengan obesiti dan penyakit metabolik.

PRDM16 membantu menjaga fungsi mitokondria dan melindungi sel daripada kerosakan akibat tekanan oksidatif yang berlebihan akibat radikal bebas. Mutasi dalam gen *PRDM16* telah dikaitkan dengan gangguan kardiomiopati dalam beberapa keadaan seperti sindrom pemadaman 1p36, kardiomiopati tidak termampat ventrikel kiri, dan kardiomiopati terdilat (Pravednikova et al. 2020).

MT-ND1 berfungsi dalam pemindahan elektron daripada NADH kepada koenzim Q10 dalam mitokondria serta penyusunan Kompleks I dalam rantai pernafasan mitokondria yang penting untuk penghasilan ATP. *MT-ND1* malah dikenali sebagai gen utama mutasi dalam keluarga LHON. Mutasi pada gen ini dikenal pasti sebagai punca penyakit mitokondria seperti LHON dan sindrom MELAS (Im et al. 2015).

Objektif utama kajian adalah untuk mengenal pasti mutasi pada gen *UCP1*, *PRDM16* dan *MT-ND1* yang terlibat dengan penyakit distrofi otot melalui analisis tinjauan sistematik. Seterusnya dua objektif khusus, iaitu yang pertama untuk mengenal pasti simptom-simptom penyakit distrofi otot yang berkaitan dengan mutasi pada gen mitokondria *MT-ND1*. Kedua ialah untuk mengenal pasti simptom-simptom penyakit distrofi otot yang berkaitan dengan mutasi pada gen nuklear *UCP1* dan *PRDM16*.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Bahan Elektronik dan Pencarian data

Analisis ini dijalankan mengikut garis panduan *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)* bagi memastikan proses pencarian, pemilihan dan pelaporan kajian dilakukan secara sistematik dan telus. Analisis sistematik melibatkan artikel-artikel berkaitan kajian yang diperolehi melalui beberapa pangkalan data elektronik utama, iaitu Medline, Web of Science, PubMed, Scopus dan ScienceDirect. Artikel yang dikenal pasti kemudiannya disaring berdasarkan kriteria kemasukan dan pengecualian yang telah ditetapkan. Selain itu, penilaian risiko bias terhadap kajian yang terpilih telah dijalankan menggunakan alat Q-Genie untuk menilai kualiti kajian.

Artikel berkaitan kajian dicari melalui pangkalan data elektronik iaitu Medline, Web of Science, PubMed, Scopus dan ScienceDirect. Pencarian artikel ini berdasarkan kata kunci daripada tajuk kajian iaitu seperti "*mutation*", "*UCP1*", "*PRDM16*", "*MT-ND1*", "*diseases*", dan "*muscular dystrophy*". Semua artikel yang dipilih adalah dalam bahasa Inggeris dengan tahun terbitan diutamakan kepada tempoh dalam julat 10 tahun terakhir iaitu dari 2015 hingga 2025. Artikel berbentuk ulasan, abstrak, majalah, bab dalam buku serta bukan teks penuh telah dikecualikan. Kemudian artikel yang mengkaji mutasi pada gen *MT-ND1*, *UCP1*, *PRDM16* dan distrofi otot serta memenuhi kriteria kelayakan diambil.

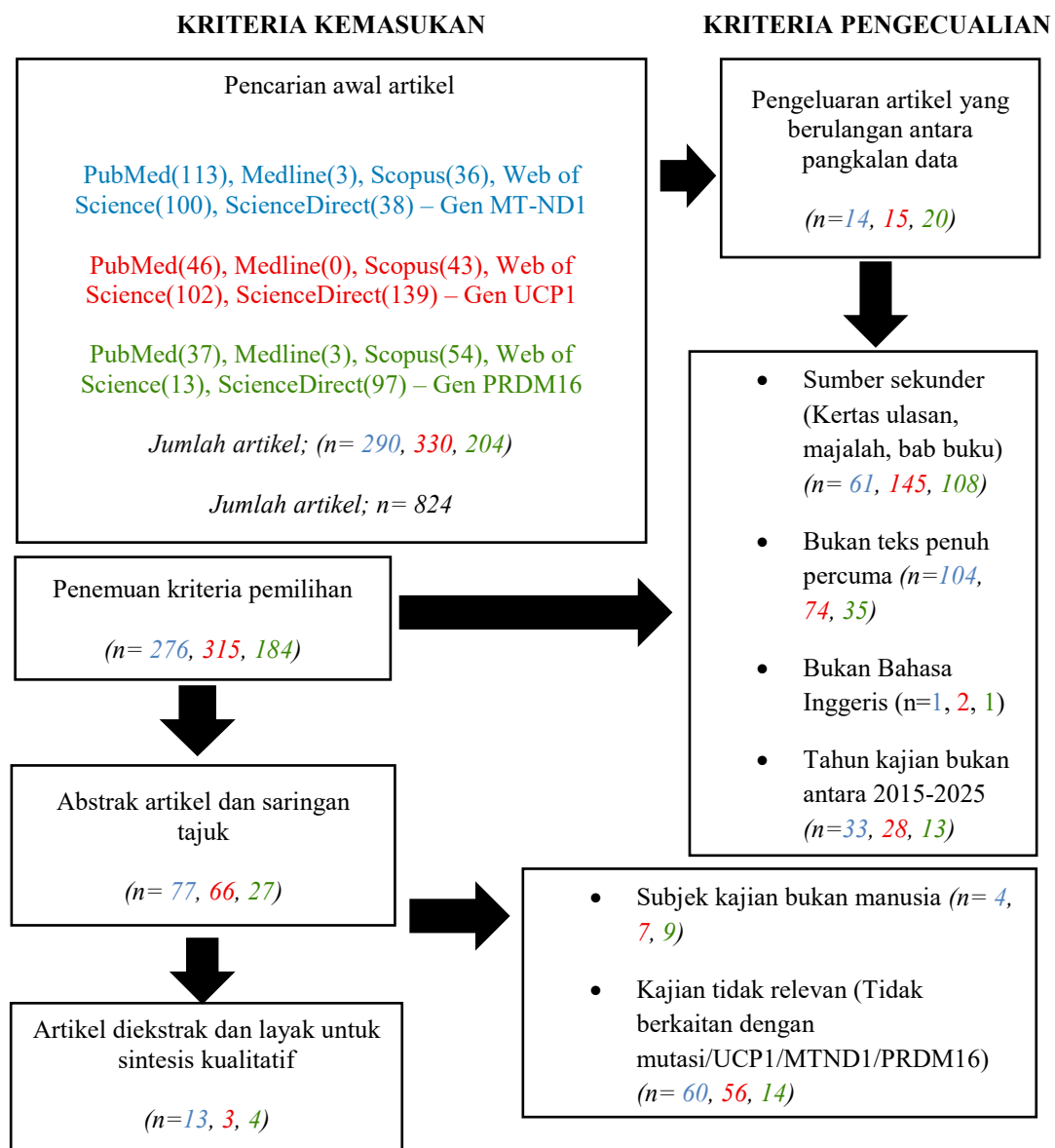
Alat Q-Genie telah digunakan bagi menilai risiko bias dan kualiti artikel yang dipilih. Alat 'Quality of Genetic Association Studies (Q-Genie)' mengandungi 11 item yang dinilai pada Skala Likert 7 mata, merangkumi tema-tema iaitu rasional kajian, pemilihan dan definisi hasil kajian yang diminati, pemilihan dan perbandingan kumpulan, pengelasan pendedahan teknikal, pengelasan bukan pendedahan teknikal, sumber bias, saiz sampel, perancangan analisis kajian, kaedah statistik dan

kawalan pemboleh ubah, pengujian andaian dan inferens untuk analisis genetik dan kesesuaian kesimpulan yang dibuat daripada hasil kajian.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Kriteria kelayakan pemilihan artikel

Dapatan carian memperoleh sebanyak 824 artikel. Tiada artikel berbahasa Melayu ditemui dalam carian tersebut. Selepas proses penyingkiran artikel berulang, jumlah artikel berkurang kepada 775. Seterusnya, proses pemilihan berdasarkan kriteria kelayakan menghasilkan 170 artikel. Setelah mengeluarkan artikel yang tidak berkaitan dengan mutasi gen dan distrofi otot, sebanyak 20 artikel yang diterbitkan antara tahun 2015 hingga 2025 layak untuk analisis kualitatif. Kriteria kemasukan adalah i) Sumber primer (artikel asli) tahun 2015-2025, ii) Artikel *open access*, iii) Artikel berkaitan dengan gen MTND1, PRDM16, UCP1, iv) Mutasi, distrofi otot dan v) Subjek kajian manusia. Kriteria pengecualian pula adalah i) Sumber sekunder (ulasan, abstrak, majalah, bab buku), ii) artikel bukan teks penuh, iii) Bahasa digunakan selain Bahasa Inggeris dan Bahasa Melayu, iv) Artikel yang berulang antara pangkalan data dan v) Subjek kajian bukan manusia (mikoorganisma, haiwan, tumbuhan). Rajah 1 menggambarkan carta alir proses pemilihan artikel berserta jumlah artikel pada setiap peringkat.



Rajah 1. Proses pemilihan artikel. Pangkalan data elektronik: i) PubMed, ii) Web of Science, iii) Medline, iv) Scopus, dan v) ScienceDirect.

3.2 Variasi mutasi bagi gen MT-ND1

Daripada 13 artikel yang disertakan berkenaan gen MT-ND1, varian m.3460G>A adalah yang paling kerap (kekerapan 7 artikel) dilaporkan menunjukkan mutasi berkaitan penyakit manusia seperti LHON dan MELAS (Jadual 1). Bukan itu sahaja, terdapat beberapa varian mutasi lain yang turut menyebabkan penyakit kepada manusia seperti varian m.3635A>G (4 artikel), m.3406G>A (2 artikel), m.3902-3908inv7 (2 artikel), m.3395A>G (1 artikel), m.3634A>G (1 artikel), m.3866T>C (1 artikel) dan m.3733G>A (3 artikel). Kemudian, berdasarkan penyakit-penyakit yang dikenal pasti, analisis difokuskan kepada penyakit yang mempunyai simptom paling hampir dengan distrofi otot. Bagi gen MT-ND1, MELAS merupakan penyakit yang menunjukkan simptom seperti distrofi otot iaitu kelemahan otot. MELAS merupakan penyakit yang menyebabkan pemendekan protein MT-ND1 yang akan mengganggu fungsi dan pengumpulan Kompleks 1 (Lou et al. 2023). Apabila fungsi Kompleks 1 terjejas penghasilan ATP akan berkurang kerana rantai pengangkutan elektron tidak mapan. Otot mempunyai keperluan tenaga (ATP) yang sangat tinggi. Oleh itu, apabila ATP tidak mencukupi, fungsi sel otot juga terganggu dan boleh menyebabkan kelemahan otot yang progresif. Penyakit LHON juga menunjukkan simptom masalah penglihatan yang boleh diperhatikan pada pesakit distrofi otot. Namun begitu, ia tidak melibatkan kerosakan atau kemerosotan pada bahagian otot dan tidak dikategorikan terlibat dengan distrofi otot. Jadual 1 menunjukkan semua variasi, penyakit serta simptom yang terlibat pada gen MT-ND1.

Jadual 1. Varian mutasi bagi gen MT-ND1 dengan simptom penyakit.

Rujukan	SNP / Varian	Penyakit	Simptom	Perkaitan Langsung dengan DO	Simptom Menyerupai DO
Ji et al. (2022)	m.3635A > G	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
Blickhäuser et al. (2024)	m.3406G > A	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
Carreño-Gago et al. (2017)	m.3634A > G, m.3460G > A, m.3866T > C, m.3635G > A, m.3733G > A	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
Sheremet et al. (2016)	m.3472T > C	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
Karaarslan (2019)	m.3460G > A	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
Chin et al. (2018)					
Danhelovska et al. (2020)					
Ji et al. (2016)	m.3460G > A, m.3394T > C, m.3635G > A, m.3733G > A, m.3866T > C	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
Jean et al. (2022)	m.3460G > A, m.3635G > A, m.3700G > A, m.3733G > A, m.3376G > A	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
		LHON & MELAS	Kehilangan penglihatan, sawan, episod	—	Kelemahan otot, masalah penglihatan

			strok, kelemahan otot		
	m.4171C > A	LHON & Sindrom Leigh	Kehilangan penglihatan, kelemahan otot, kelewatan perkembangan, masalah makan	—	Kelemahan otot, masalah penglihatan
	m.3697G > A	MELAS & Sindrom Leigh	Sawan, episod strok, kelemahan otot, kelewatan perkembangan, masalah makan	—	Kelemahan otot
Buonfiglio et al. (2023)	m.3890G > A, m.3685T > C	Sindrom Leigh	Kelemahan otot, kelewatan perkembangan, masalah makan & tumbesaran	—	Kelemahan otot
	m.3460G > A	LHON	Kehilangan penglihatan tengah, penglihatan kabur	—	—
	m.3395A > G	LHON & Pekak	Kehilangan penglihatan, bunyi kedengaran perlahan, telinga berdesing (<i>tinnitus</i>)	—	—
Hoeser, Weiß & Friedrich (2022)	m.3902-3908inv7	Pekak	Bunyi kurang jelas, telinga berdesing (<i>tinnitus</i>)	—	—
de Souza et al. (2024)	m.4158A > G, m.4248T > C	Kusta	Luka tidak sembuh, mata kering/masalah penglihatan, penebalan saraf	—	—
Im et al. (2015)	m.3460G > A, m.11778G > A, m.14484T > C	LHON & MELAS	Kehilangan penglihatan, sawan, episod strok, kelemahan otot	—	—

LHON- *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*, MELAS- *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic acidosis, and Stroke-like episodes*, DO – Distrofi Otot

3.3 Variasi mutasi bagi gen UCP1

Varian mutasi bagi gen UCP1 (Jadual 2), iaitu polimorfisme nukleotida tunggal A-112C (rs10011540) dengan kekerapan 2 artikel merujuk kepada variasi ini, didapati mempengaruhi motif konsensus (T(G/A) TTT(T/G) (G/T)) bagi elemen tindak balas insulin (*Insulin Response Element, IRS*), seterusnya menyumbang kepada perkembangan diabetes mellitus jenis 2 (Pravednikova et al., 2020). Dalam kajian ini, varian A-112C merupakan satu-satunya varian UCP1 yang boleh dikaitkan dengan simptom menyerupai distrofi otot, khususnya keletihan otot yang cepat. Penggantian nukleotida A kepada C pada kedudukan -112 menyebabkan kecekapan IRS untuk mengikat faktor transkripsi

berkurang sekali gus menurunkan ekspresi dan aktiviti protein UCP1.

Protein UCP1 memainkan peranan penting dalam tisu adipos perang melalui mekanisme termogenesis untuk membakar tenaga. Penurunan aktiviti UCP1 akibat mutasi A-112C mengurangkan proses termogenesis, yang membawa kepada pengumpulan lemak. Otot rangka memerlukan bekalan tenaga dan glukosa yang mencukupi untuk berfungsi secara normal. Oleh itu, gangguan metabolisme tenaga akibat penurunan aktiviti UCP1 boleh menyebabkan penggunaan tenaga yang tidak efisien, menjadikan otot lebih mudah mengalami keletihan serta berpotensi mengalami atrofi atau degenerasi. Sebaliknya, varian lain seperti rs3811791 (2 artikel) dan rs1800592 (3 artikel) didapati berkaitan dengan obesiti sahaja dan tidak menunjukkan simptom yang menyerupai distrofi otot.

Jadual 2. Varian mutasi bagi gen UCP1 dengan simptom penyakit.

Rujukan	SNP / Varian	Penyakit	Simptom	Perkaitan Langsung dengan DO	Simptom Menyerupai DO
Pravednikova et al. (2020)	A-1766G (rs3811791)	Obesiti	Nilai WHR yang tinggi jisim lemak tinggi, peratusan lemak badan tinggi	—	—
Dinas et al. (2022)	A-112C (rs10011540)	Diabetes mellitus jenis 2	Cepat penat (keletihan otot), kerap kencing, penglihatan kabur	—	Keletihan otot, masalah penglihatan
	A-3826 (rs1800592)	Obesiti	BMI tinggi, lemak berlebihan, hipertensi	—	—
Yatsuda et al. (2025)	A-3826G (rs1800592)	Obesiti	BMI tinggi, lemak berlebihan, hipertensi	—	—

WHR- waist-hip ratio, BMI- Body Mass Indeks, DO- Distrofi Otot

3.4 Variasi mutasi bagi gen PRDM16

Seterusnya, bagi gen PRDM16, mutasi pada gen ini yang didapati berkemungkinan berkait dengan simptom distrofi otot ialah penyakit arteri koronari. Gen PRDM16 dikenal pasti sebagai gen utama yang diekspresikan dalam tisu arteri dan berfungsi sebagai faktor transkripsi yang terlibat dalam pengawalan metabolisme serta peralihan antara tisu adipos perang dan otot rangka (Turner et al., 2022). Variasi mutasi dan simptom penyakit bagi gen PRDM16 ditunjukkan pada Jadual 3. Polimorfisme nukleotida tunggal pada rs2493292 (kekerapan 1 artikel) menyumbang kepada penyakit ini melalui perubahan fenotip sel otot licin vaskular daripada keadaan kontraktile kepada fenotip sintetik yang bersifat proliferasif, sekali gus menggalakkan pembentukan plak aterosklerosis. Keadaan ini menyebabkan penyempitan saluran arteri dan aliran darah yang tidak optimum, seterusnya mengurangkan bekalan oksigen dan nutrien ke otot rangka.

Akibatnya, pesakit boleh mengalami gangguan degupan jantung, sesak nafas dan mudah keletihan akibat kekurangan oksigen ke otot, iaitu simptom yang turut menyerupai ciri klinikal distrofi otot. Sebaliknya, varian mutasi lain seperti rs12409277 (kekerapan 1 artikel) dan rs2651899 (kekerapan 2 artikel) tidak menunjukkan kaitan dengan simptom menyerupai distrofi otot, tetapi lebih dikaitkan dengan penyakit lain seperti hipokolesterolemia, obesiti dan migrain.

Jadual 3. Varian mutasi bagi PRDM16 dengan simptom penyakit.

Rujukan	SNP / Varian	Penyakit	Simptom	Perkaitan Langsung dengan DO	Simptom Menyerupai DO
Maksimovic et al. (2019)	rs12409277	Hipokolesterolemia	Tahap TC rendah Tahap LDL-C rendah	—	—
AlAmrani, AbdelKarim & AlZoghaibi (2018)	rs2651899	Obesiti	BMI tinggi, lemak berlebihan	—	—
Zafar et al. (2021)	rs2651899	Migrain	Sakit berdenyut di sebelah kepala, sensitif kepada cahaya dan bau, sakit belakang mata	—	—
Turner et al. (2022)	rs2493292	Koronari Arteri	Sakit dada, sesak nafas (masalah pernafasan), mudah penat, degupan jantung tidak normal	—	Masalah pernafasan

TC- Total Cholesterol, LDL-C- low density lipoprotein cholesterol, BMI- Body Mass Index, DO- Distrofi Otot

3.5 Penilaian risiko bias

Q-Genie digunakan untuk melakukan penilaian risiko bias yang telus dan komprehensif bagi meningkatkan mutu kualiti kajian yang dilaksanakan. Q-Genie melibatkan 11 komponen iaitu 1- rasional kajian, 2-pemilihan dan definisi hasil kajian yang diminati, 3-pemilihan dan perbandingan kumpulan, 4-klasifikasi pendedahan teknikal, 5-klasifikasi bukan pendedahan teknikal, 6-sumber bias, 7-saiz sampel, 8-perancangan analisis kajian, 9-kaedah statistik dan kawalan pembolehubah, 10-pengujian andaian dan inferens untuk analisis genetik, dan 11-kesesuaian kesimpulan yang dibuat daripada hasil kajian. Markah diberikan berdasarkan Skala Likert 7 mata (Buruk-1, baik-3, sangat baik-5, cemerlang-7). Jumlah markah ≤ 32 menunjukkan kajian berkualiti rendah, >32 dan ≤ 40 menunjukkan kajian kualiti sederhana, dan >40 menunjukkan kajian berkualiti baik.

Berdasarkan penilaian risiko bias menggunakan Q-Genie, kesemua 20 artikel yang dianalisis menunjukkan kualiti yang baik dengan jumlah markah melebihi 40. Julat jumlah markah kualiti menggunakan Q-Genie melibatkan kesemua 20 artikel adalah antara 54 hingga 62 dengan purata markah dan sisihan piawaian (SD) sebanyak 58.8 ± 3.1 mata. Secara keseluruhan, kajian daripada 20 artikel yang disaring mempunyai rasional yang jelas, definisi hasil kajian yang sesuai, pemilihan kumpulan perbandingan yang baik, pengelasan pendedahan genetik yang tepat, perbincangan tentang sumber bias, saiz sampel yang mencukupi, perancangan analisis yang terperinci, penggunaan kaedah statistik yang sesuai, pengujian andaian yang sesuai dan kesimpulan yang disokong oleh hasil kajian. Penilaian risiko bias menunjukkan bahawa kajian daripada 20 artikel yang telah disaring mencapai tahap kualiti yang tinggi serta memenuhi syarat untuk dianalisis dalam tinjauan sistematik.

4. Kesimpulan

Berdasarkan analisis kajian, beberapa varian mutasi pada gen MT-ND1, PRDM16 dan UCP1 didapati menunjukkan simptom yang menyerupai ciri distrofi otot. Varian m.3376G>A pada gen MT-ND1 dikaitkan dengan penyakit MELAS, manakala varian m.4171C>A, m.3890G>A dan m.3685T>C dikaitkan dengan Sindrom Leigh, serta m.3697G>A yang dikaitkan dengan kedua-dua penyakit. MELAS menunjukkan simptom seperti kelemahan otot, manakala Sindrom Leigh menunjukkan simptom seperti masalah penglihatan dan juga kelemahan otot, yang dapat diperhatikan pada pesakit distrofi otot. Selain itu, varian rs2493292 pada gen PRDM16 dikaitkan dengan penyakit arteri koronari yang menyebabkan keletihan akibat kekurangan oksigen ke bahagian otot dan masalah pernafasan,

manakala varian rs10011540 pada gen UCP1 dikaitkan dengan diabetes mellitus jenis 2 yang turut menunjukkan gejala penglihatan kabur dan mudah penat akibat penggunaan tenaga yang tidak efisien yang menyebabkan keletihan otot. Walau bagaimanapun, mutasi-mutasi yang telah dikenalpasti melalui kajian-kajian lepas pada gen MT-ND1, UCP1 dan PRDM16 ini tidak terbukti atau menunjukkan perkaitan secara langsung dengan distrofi otot. Namun begitu, terdapat penyakit hasil daripada mutasi pada ketiga-tiga gen ini yang menunjukkan simptom menyerupai distrofi otot yang boleh membuka peluang untuk kajian lanjut bagi memahami mekanisme patogenesis distrofi otot dan membuktikan sama ada mutasi-mutasi ini mempunyai perkaitan atau merupakan salah satu punca penyakit distrofi otot.

Penghargaan

Penyelidikan ini dibiayai oleh geran penyelidikan daripada Geran Universiti Penyelidikan, Universiti Kebangsaan Malaysia [GUP-2023-002].

Rujukan

- AlAmrani, A., AbdelKarim, M. & AlZoghaibi, M. 2018. *PRDM16* gene polymorphism is associated with obesity and blood lipids profiles in Saudi population. *Journal of Clinical Medicine*. 7:141.
- Blickhäuser, B., Stenton, S.L., Neuhofer, C.M., Floride, E., Nesbitt, V., Fratter, C., Koch, J., Kauffmann, B., Catarino, C., Schlieben, L.D., Kopajtich, R., Valerio, C., Sadun, A.A., McFarland, R., Fang, F., Morgia, C.L., Paquay, S., Nassogne, M.C., Ghezzi, D., Lamperti, C., Wortmann, S., Poulton, J., Klopstock, T. & Prokisch, H. 2024. Digenic Leigh syndrome on the background of the m.11778G>A Leber hereditary optic neuropathy variant. *BRAIN REPORT*. 147:1967-1974.
- Buonfiglio, P.I., Menazzi, S., Liliana, F., Lotersztejn, V., Ferreira, V., Elgoyhen, A.B. & Dalamón, V. 2023. Mitochondrial DNA variants in a cohort from Argentina with suspected Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). *PLoS ONE*. 18(2):e0275703.
- Carreño-Gago, L., Gamez, J., Cámara, Y., de la Campa, E.A., Aller-Alvarez, J.S., Moncho, D., Salvado, M., Galan, A., de la Cruz, X., Pinós, T. & García-Arumí, E. 2017. Identification and characterization of the novel point mutation m.3634A>G in the mitochondrial MT-ND1 gene associated with LHON syndrome. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1863:182-187.
- Chin, R.M., Panavas, T., Brown, J.M. & Johnson, K.K. 2018. Patient-derived lymphoblastoid cell lines harboring mitochondrial DNA mutations as tool for small molecule drug discovery. *BMC Research Notes*. 11:205.
- Danhelovska, T., Kolarova, H., Zeman, J., Hansikova, H., Vaneckova, M., Lambert, L., Kucerova-Vidrova, V., Berankova, K., Honzik, T. & Tesarova, M. 2020. Multisystem mitochondrial disease due to mutations in mtDNA-encoded subunits of complex I. *BMC Pediatrics*. 20:41.
- De Souza, F., Silva, S.C., de Araújo, G.S., Santana-da-Silva, M.N., Gobbo, A.R., da Silva, M.B., Pinto, P., da Costa, P.F., Salgado, C.G., Ribeiro-dos-Santos, A. & Cavalcante, G.C. 2024. Mitochondrial variants of complex I genes associated with leprosy clinical subtypes. *Nature portfolio*. 14:6365.
- Dinas, P.C., Nintou, E., Vliora, M., Pravednikova, A.E., Sakellariou, P., Witkowicz, A., Kachaev, Z.M., Kerchev, V.V., Larina, S.N., Cottom, J., Kowalska, A., Gkiata, P., Bargiota, A., Khachatryan, Z.A., Hovhannisyan, A.A., Antonosyan, M.A., Margaryan, S., Partyka, A., Bogdanski, P., Szulinska, M., Kregielska-Narozna, M., Czepczyński, R., Ruchała, M., Tomkiewicz, A., Yepiskoposyan, L., Karabon, L., Shidlovskii, Y., Metsios, G.S. & Flouris, A.D. 2021. Prevalence of uncoupling protein one genetic polymorphisms and their relationship with cardiovascular and metabolic health. *PLoS ONE*. 17(4): e0266386.
- Dongmei Ji, Xun Su, Chao Hu, Zhikang Zhang, Mengyao Wang, Weiwei Zou, Lingchao Shen, Yajing Liu, Chunmei Liang, Yinan Du, Dan Liang & Yunxia Cao. Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with leber's hereditary optic neuropathy carrying a homoplasmic m.3635G>A mutation in mitochondrial ND1 gene. *Stem Cell Research*. 63:102858.
- Hoeser, F., Weiß, M. & Friedrich, T. 2022. The clinically relevant triple mutation in the mtND1 gene inactivates *Escherichia coli* complex I. *FEBS Letters*. 596:1124-1132.
- Im, I., Jang M., Park, S.J., Lee, S., Choi, J., Yoo, H., Kim, S. & Han, Y. 2015. Mitochondrial respiratory defect causes dysfunctional lactate turnover via AMP-activated protein kinase activation in human-induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 290(49):29493-29505.
- Jean, J., Christodoulou, E., Gai, X., Tamrazi, B., Vera, M., Mitchell, W.G. & Schmidt, R.J. 2022. m.3685T>C is a novel mitochondrial DNA variant that causes Leigh syndrome. *Cold Spring Herb Mol Case Stud*. 8: a006136.
- Karaarslan, C. 2019. Leber's hereditary optic neuropathy as a promising disease for gene therapy development. *Adv Ther*. 36:3299-3307.

- Liaqat, S.T., Akram, F., Waseem, R., Akram A., Altaf, M.Z., Haider, B., Zulfiqar, N. & Arif, A. 2022. Overview of muscular dystrophy, it's types, symptoms, management and possible treatment. *Pure Appl. Biol.* 12(1):261-273.
- Lou, X., Zhou, Y., Liu, Z., Xie, Y., Zhang, L., Zhao, S., Gong, S., Zhuo, X., Wang, J., Dai, L., Ren, X., Tong, X., Jiang, L., Fang, H., Fang, F. & Lyu, J. 2023. De novo frameshift variant in MT-ND1 causes a mitochondrial complex I deficiency associated with MELAS syndrome. *Gene*. 860:147229.
- Maksimovic, N., Vidovic, V., Damjanovic, T., Jekic, B., Singh, N.M., Simeunovic, S., Bozovic, D.S. Vidovic, S. & Novakovic, I. 2019. Association of PRDM16 rs12409277 and CtBP2 rs1561589 gene polymorphisms with lipid profile of adolescents. *Arch Med Sci.* 19(3):593-599.
- Pravednikova, A.E., Shevchenko, S.Y., Kerchev, V. V., Skhirtladze, M.R., Larina, S.N., Kachaev, Z.M., Egorov, A.D. & Shidlovskii, Y. V. 2020. Association of uncoupling protein (Ucp) gene polymorphisms with cardiometabolic diseases. *Molecular Medicine* 2020 26:1 26(1): 1–19.
- Sheremet, N.L., NevinitSYna, T.A., Zhorzholadze, N.V., Ronzina, I.A., Itkis, Y.S., Karylova, T.D., Tsygankova, P.G., Malakhova, V.A., Zakharova, E.Y., Tokarchuk, A.V., Panteleeva, A.A., Karger, E.M., Lyamzaev, K.G. & Avetisov, S.E. 2016. Previously unclassified mutation of mtDNA m.3472T>C: evidence of pathogenicity in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochemistry (Moscow)*. 81(7):748-754.
- Turner, A.W., Hu, S.S., Mosquera, J.V., Ma, W.F., Hodonsky, C.J., Wong, D., Auguste, G., Song, Y., Sol-Church, K., Farber, E., Kundu, S., Kundaje, A., Lope, N.G., Ma, L., Ghosh, S.K.B., Onengut-Gumuscu, S., Ashley, E.A., Quertermous, T., Finn, A.V., Leeper, N.J., Kovacic, J.C., Björkegren, J.L.M., Zhang C. & Miller, C.L. 2022. Single-nucleus chromatin accessibility profiling highlights regulatory mechanisms of coronary artery disease risk. *Nat Genet.* 54(6):804-816.
- Yatsuda, M., Furou, M., Kamachi, K., Sakamoto, K., Shoji, K., Ishihara, O. & Kagawa, Y. 2025. Serotonin transporter gene polymorphisms predict adherence to weight loss programs independently of obesity-related genes. *Nutrients*. 17:1094.
- Zafar, R., Saleem, T., Sheikh, N., Maqbool, H., Mukhtar, M. & Abbasi, M.H. 2021. PRDM16, LPR1 and TRPM8 genetic polymorphisms are risk factor for Pakistani migraine patients. *Saudi Journal of Biological Science*. 28:5793-5799.

**Kesan Tekanan Osmotik terhadap Perubahan Ciri Morfo-fisiologi
dalam Transgenik Arabidopsis yang membawa Pengekspresan
Terlampau Gen *OsSAP4* yang mengalami Mutasi Domain A20/AN1**
(Effect of Osmotic Stress on the Morpho-physiological Changes in Arabidopsis Transgenic
Overexpressing the *OsSAP4* Gene Mutated in A20/AN1 Domain)

Diana Atira Rohaimi & Nurulhikma Md Isa*

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

*E-mel pengarang koresponden: hikma@ukm.edu.my

Abstrak: Tekanan osmotik akibat kemarau merupakan faktor pembatas utama yang menjejaskan produktiviti tanaman global. Kajian ini dijalankan bagi menilai peranan gen *OsSAP4* serta kepentingan domain A20/AN1 dalam mengawal tindak balas morfo-fisiologi *Arabidopsis thaliana* terhadap tekanan osmotik. Objektif utama adalah membandingkan kesan rawatan polietilena glikol (20% PEG) terhadap kandungan klorofil, kandungan air relatif (RWC) dan perkembangan akar antara varieti jenis liar (*Col-0*), pengekspresan terlampau *OsSAP4* (*oe-OsSAP4*) dan mutan domain A20/AN1 (*a20man1m*). Hasil kajian menunjukkan kandungan klorofil meningkat pada hari ke-7 di bawah tekanan dengan *a20man1m* merekodkan nilai tertinggi (29.88 nmol/mg). Pada hari ke-14, *a20man1m* mengekalkan RWC tertinggi (65.48%) berbanding varieti lain, menunjukkan keupayaan pengawalan homeostasis air yang lebih cekap. Hasil analisis perkembangan akar mendapati kesemua genotip gagal menunjukkan perkembangan akar apabila diberi rawatan 20% PEG sebaliknya dalam keadaan normal (kawalan tanpa 20%PEG), didapati akar pada genotip pengekspresan terlampau *OsSAP4* (*oe-OsSAP4*) menunjukkan perkembangan yang baik berbanding genotip liar (*Col-0*) dan mutan domain A20/AN1 (*a20man1m*). Ini menunjukkan manipulasi genetik yang dilakukan telah merubah perkembangan akar dan berkemungkinan besar gen yang dikaji mempunyai kaitan dengan pemanjangan akar. Kesimpulannya, gen *OsSAP4* terlibat secara langsung dalam gerak balas fisiologi terhadap tekanan osmotik manakala mutasi pada domain A20/AN1 berpotensi meningkatkan daya tahan tumbuhan melalui pengimbangan homeostasis air yang lebih stabil berbanding pengekspresan terlampau.

Kata kunci: *Arabidopsis thaliana*; domain A20/AN1; tekanan osmotik; morfo-fisiologi

Abstract: Osmotic stress caused by drought is a major limiting factor affecting global crop productivity. This study was conducted to evaluate the role of the *OsSAP4* gene and the importance of the A20/AN1 domains in regulating the morpho-physiological responses of *Arabidopsis thaliana* to osmotic stress. The primary objective was to compare the effects of polyethylene glycol (20% PEG) treatment on chlorophyll content, relative water content (RWC) and root development among wild-type (*Col-0*), *OsSAP4* overexpressing (*oe-OsSAP4*) and A20/AN1 domain mutant (*a20man1m*) varieties. The results showed that chlorophyll content increased on day 7 under stress with *a20man1m* recording the highest value (29.88 nmol/mg). By day 14, *a20man1m* maintained the highest RWC (65.48%) compared to other varieties, indicating a more efficient water homeostasis regulation. Root development analysis revealed that all genotypes failed to show root growth when treated with 20% PEG. Conversely, under normal conditions (control without 20% PEG), the roots of the *OsSAP4* overexpressing (*oe-OsSAP4*) genotype demonstrated superior development compared to the wild-type (*Col-0*) and the A20/AN1 domain mutant (*a20man1m*) genotypes. This indicates that the genetic manipulation performed has altered root development, suggesting a high probability that the gene under study is associated with root elongation. In conclusion, the *OsSAP4* gene is directly involved in the physiological response to osmotic stress while mutations in the A20/AN1 domains potentially enhance plant resilience through more stable water homeostasis balancing compared to overexpression.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; domain A20/AN1; osmotic pressure; morpho-physiology

1. Pendahuluan

Tekanan osmotik yang berpunca daripada kemarau atau saliniti tinggi (Foflonker & Fatima, 2025). Ini menyebabkan tumbuhan mengaktifkan mekanisme adaptasi seperti pelarasan osmotik. Proses ini melibatkan pengumpulan bahan terlarut dalam sel untuk menurunkan potensi osmotik sekali gus mengekalkan tekanan segah dan aktiviti metabolik yang kritikal seperti fotosintesis (Sanders & Arndt, 2012). Kestabilan tekanan segah amat penting bagi memastikan kelangsungan pertumbuhan dan produktiviti tanaman dalam persekitaran yang mencabar.

Protein berkaitan tekanan (SAP) yang mengandungi domain jejari zink A20/AN1 dikenal pasti sebagai pengawal utama tindak balas terhadap tekanan biotik dan abiotik (Su et al., 2022). Dalam keluarga gen *Oryza sativa*, gen *OsSAP4* menunjukkan tahap pengekspresan yang sangat tinggi khususnya semasa keadaan kemarau (Hazbir et al., 2024). Penggunaan *Arabidopsis thaliana* sebagai model tumbuhan dalam kajian ini adalah strategik kerana saiz genomnya yang kecil, kitaran hidup yang pantas dan kemudahan proses transformasi genetik (Chen et al., 2004).

Walaupun peranan protein SAP dalam adaptasi tekanan telah diketahui, mekanisme terperinci mengenai fungsi domain A20/AN1 dalam mengawal perubahan morfo-fisiologi masih belum difahami sepenuhnya. Oleh itu, kajian ini difokuskan untuk menilai pengaruh gen *OsSAP4* dan kesan mutasi pada domain A20/AN1 terhadap ciri morfo-fisiologi *Arabidopsis thaliana*. Kajian ini penting bagi merungkai bagaimana manipulasi domain protein tersebut dapat meningkatkan daya tahan tumbuhan terhadap tekanan osmotik.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Bahan

Kajian ini menggunakan tiga varieti biji benih *Arabidopsis thaliana* iaitu *Arabidopsis* jenis liar (*Col-0*), *Arabidopsis* transgenik pengekspresan terlampau gen *OsSAP4* (*oe-OsSAP4*) dan transgenik pengekspresan terlampau gen *OsSAP4* yang mengalami mutasi pada domain A20 dan AN1 (*a20man1m*). Biji benih ini diperolehi daripada koleksi mutan pelajar sarjana Kharunisa Japlus (2023). Rawatan osmotik yang digunakan adalah rawatan *Polietilena glikol* (PEG) yang berkepekatan 20% rawatan PEG.

2.2 Kaedah kajian

2.2.1 Penanaman *Arabidopsis thaliana*

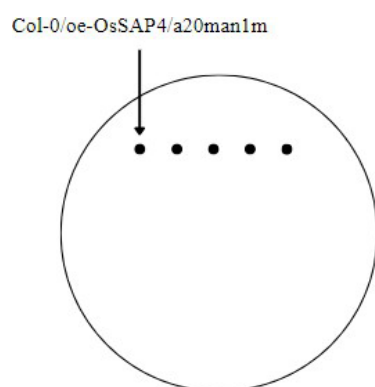
Kajian dimulakan dengan merendam biji benih varieti *Col-0*, *oe-OsSAP4* dan *a20man1m* dalam air suling pada suhu 4°C selama empat hari bagi memecahkan kedormanan sebelum disemai di atas media tanah dan vermikulat (nisbah 2:1) dan dibesarkan di dalam ruang pertumbuhan (22°C, kitaran 16 jam cahaya/8 jam gelap) sehingga berusia 21 hari. Selepas tempoh tersebut, anak pokok dipindahkan secara individu ke dalam pasu kecil yang diletakkan di dalam bekas seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1. Seterusnya, anak pokok disiram secara berkala setiap tiga hari sehingga mencapai fasa matang (*bolting*). Eksperimen ini disusun mengikut reka bentuk blok lengkap rawak (RCBD) yang melibatkan dua blok utama, iaitu plot kawalan dan plot rawatan tekanan osmotik (20% PEG) dengan tiga replikasi biologi bagi setiap varieti. Rawatan tekanan osmotik menggunakan 20% PEG diberikan secara berterusan selama 14 hari sebaik sahaja pokok matang bagi menilai perubahan morfo-fisiologi yang berlaku. Rawatan PEG 20% merupakan kepekatan yang cukup untuk mengaruh tekanan osmotik dalam *Arabidopsis* (Roszelin et al 2023).



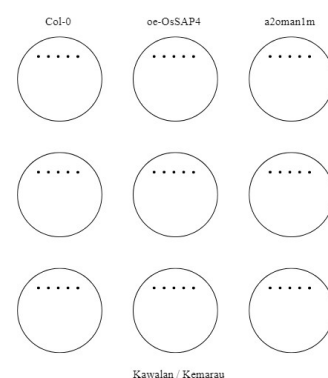
Rajah 1. Reka bentuk eksperimen penanaman pokok *Arabidopsis thaliana* yang berada di dalam pot pasu kecil diletakkan di dalam sebuah bekas.

2.2.2 Analisis panjang akar *Arabidopsis thaliana*

Proses dimulakan dengan penyediaan media *Murashige & Skoog* (MS) separuh kepekatan yang ditambah 1% sukrosa dan dilaraskan pH (5.5–5.7) sebelum diautoklaf serta dituang ke dalam piring petri steril di dalam kebuk aliran laminar. Biji benih varieti *Col-0*, *oe-OsSAP4*, dan *a20man1m* disterilkan menggunakan etanol 70% dan larutan pensterilan sebelum dibilas lima kali dengan air suling steril bagi mengelakkan kontaminasi. Biji benih kemudiannya dipiringkan secara aseptik di atas media kawalan atau media rawatan (20% PEG) dengan susunan 5×1 dan jarak 0.5–1.0 cm bagi setiap varieti seperti di Rajah 2. Eksperimen ini melibatkan tiga bilangan replikasi biologi bagi setiap rawatan seperti di Rajah 3 untuk memastikan kebolehpercayaan data. Selepas piring dieram di bilik sejuk selama dua malam bagi memecahkan kedormanan, piring petri disusun secara menegak dalam bilik pertumbuhan pada suhu 20°C–23°C dengan kitaran fotokala 16 jam cahaya bagi membolehkan pemerhatian dan analisis perkembangan akar dilakukan secara individu. Perkembangan akar anak benih dinilai melalui pengukuran panjang akar pada hari ke-7 dan hari ke-14 selepas penanaman biji benih dalam media rawatan 20% PEG. Piring petri disusun secara menegak bagi memastikan akar tumbuh mengikut arah graviti. Pada hari ke-7 dan hari ke-14, pengukuran panjang akar dijalankan secara manual dengan menggunakan pembaris. Bagi setiap anak benih, panjang akar terpanjang diukur dengan teliti dalam unit sentimeter (cm) untuk mendapatkan purata kepanjangan akar pada peringkat anak pokok. Data yang diperoleh digunakan untuk membandingkan perkembangan akar antara tiga jenis varieti.



Rajah 2. Benih di piring petri untuk percambahan biji benih.



Rajah 3. Reka bentuk eksperimen perkembangan akar biji benih varieti *Arabidopsis thaliana* bagi satu rawatan.

2.2.3 Analisis data

Semua data dianalisis menggunakan Ujian ANOVA untuk menilai kesan signifikan rawatan dan perbezaan antara kumpulan data. Ini adalah untuk menentukan perbezaan yang signifikan. Analisis ini membolehkan penilaian yang lebih tepat tentang kesan rawatan terhadap kandungan klorofil relatif, kandungan air relatif dan perkembangan akar anak benih.

2.2.4 Kandungan klorofil relatif

Kandungan klorofil relatif diukur pada daun roset *Arabidopsis* pada hari ke-7 (pokok berusia 28 hari) dan hari ke-14 (pokok berusia 35 hari) menggunakan meter SPAD 502. Sebanyak tiga helai daun daripada setiap tumbuhan diukur bagi mendapatkan nilai purata yang mewakili setiap sampel. Kajian ini melibatkan sembilan replikasi biologi bagi setiap varieti bagi memastikan ketepatan data yang diperolehi.

2.2.5 Kandungan air relatif

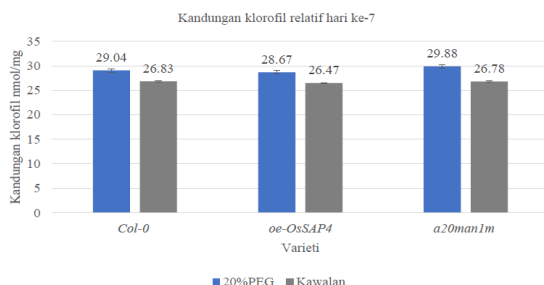
Kandungan air relatif (RWC) ditentukan pada hari ke-7 dan ke-14 tempoh rawatan dengan mengumpul 12 helai daun bagi setiap varieti. Prosedur dimulakan dengan penimbangan berat basah (FW), diikuti dengan perendaman daun di dalam air suling semalaman untuk mendapatkan berat segar (TW). Seterusnya, daun dikeringkan di dalam ketuhar pada suhu 60°C semalaman untuk memperoleh berat kering (DW). Nilai RWC dikira menggunakan formula berikut:

$$\text{Kandungan air relatif (\%)} = \frac{\text{Berat basah daun} - \text{Berat kering daun}}{\text{Berat segar daun} - \text{Berat kering daun}} \times 100$$

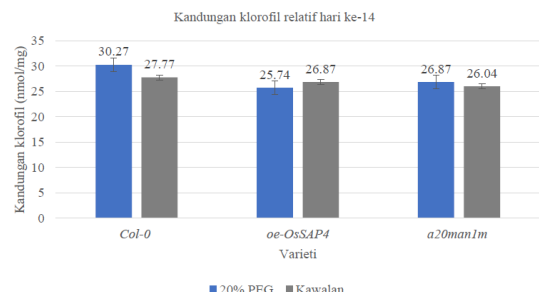
3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Kandungan klorofil relatif

Pada hari ke-7, graf pada Rajah 4 menunjukkan perbezaan yang signifikan antara rawatan kawalan dan tekanan osmotik 20% PEG, di mana semua varieti (*Col-0*, *oe-OsSAP4*, dan *a20man1m*) mencatatkan kandungan klorofil yang lebih tinggi di bawah tekanan PEG berbanding kawalan ($p < 0.05$). Fenomena ini menunjukkan tindak balas adaptasi awal tumbuhan untuk melindungi sistem fotosintesis (Bao et al., 2025), dengan varieti *a20man1m* merekodkan bacaan tertinggi. Sebaliknya, pada hari ke-14, trend graf pada Rajah 5 menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) secara keseluruhan antara rawatan dan kawalan bagi kesemua varieti. Walaupun secara visual varieti *Col-0* dan *a20man1m* masih menunjukkan sedikit peningkatan klorofil di bawah 20% PEG, varieti *oe-OsSAP4* pula menunjukkan penurunan klorofil berbanding kawalannya dan mencerminkan kesan negatif pengekspresan terlampau gen terhadap kestabilan kloroplas dalam tempoh tekanan yang lebih lama (Roszelin et al., 2025). Secara keseluruhannya, graf membuktikan bahawa kandungan klorofil relatif bertindak sebagai penanda prestasi fisiologi yang dinamik mengikut tempoh masa tekanan abiotik yang dikenakan.



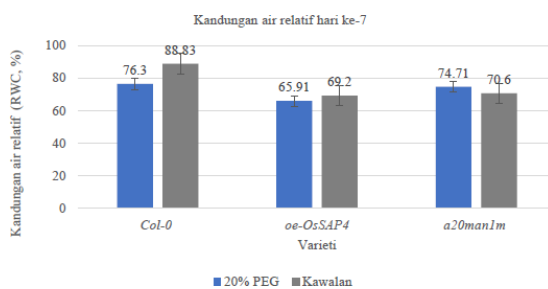
Rajah 4. Graf purata kandungan klorofil relatif pada varieti *Arabidopsis thaliana* terhadap rawatan kawalan dan PEG 20% pada hari ke-7 ($p < 0.05$).



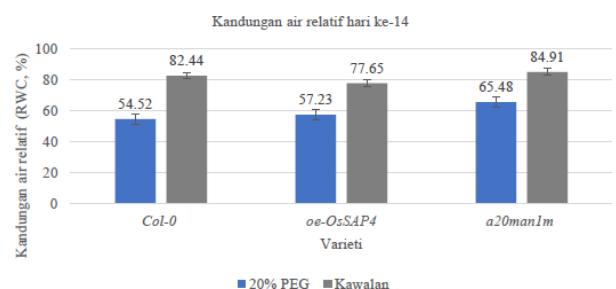
Rajah 5. Graf purata kandungan klorofil relatif pada varieti *Arabidopsis thaliana* terhadap rawatan kawalan dan PEG 20% pada hari ke-14.

3.2 Kandungan air relatif

Berdasarkan analisis graf kandungan air relatif (RWC) pada hari ke-7 dalam Rajah 6, data menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan antara rawatan kawalan dan tekanan osmotik 20% PEG dengan corak penurunan yang tidak konsisten di mana varieti *a20man1m* secara visual mencatatkan nilai yang lebih tinggi berbanding kawalannya. Hasil ini berkemungkinan berpunca daripada ralat teknikal semasa proses penimbangan berat segar, penentuan berat segar yang tidak konsisten atau ralat instrumen penimbang. Sebaliknya, pada hari ke-14, graf pada Rajah 7 menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) di mana rawatan 20% PEG menyebabkan penurunan RWC yang konsisten merentasi semua varieti akibat sekatan penyerapan air oleh akar (Verslues et al., 2006). Varieti *a20man1m* menonjol dengan nilai RWC tertinggi, yang menunjukkan keupayaan penahanan air yang lebih baik berbanding *Col-0* dan *oe-OsSAP4*. Keunggulan *a20man1m* ini berkait rapat dengan mutasi pada domain A20 dan AN1 gen *OsSAP4* yang mengubah suai fungsi protein tersebut menjadi lebih adaptif dalam mengawal homeostasis air, mengurangkan kehilangan air sel dan mengimbangi tindak balas tekanan tanpa mencetuskan kesan negatif akibat pengekspresan melampau (Kang et al., 2011; Saad et al., 2020; Vij & Tyagi, 2008). Secara keseluruhan, RWC terbukti sebagai penunjuk fisiologi yang kritikal dalam menilai status air dan kecekapan mekanisme penutupan stomata tumbuhan di bawah tekanan kemarau berpanjangan (Soltys-Kalina et al., 2016).



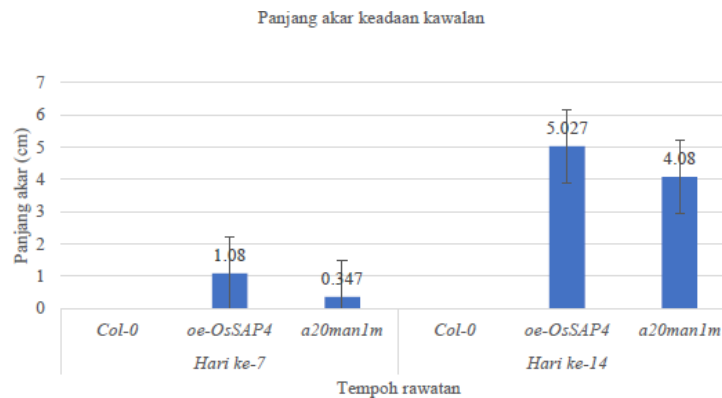
Rajah 6. Graf purata kandungan air relatif pada varieti *Arabidopsis thaliana* terhadap rawatan kawalan dan PEG 20% pada hari ke-7.



Rajah 7. Graf purata kandungan air relatif pada varieti *Arabidopsis thaliana* terhadap rawatan kawalan dan PEG 20% pada hari ke-14 ($p < 0.05$).

3.3 Panjang akar

Penilaian pertumbuhan akar pada Rajah 8 menunjukkan perbezaan ketara antara varieti di bawah keadaan kawalan, di mana varieti *oe-OsSAP4* mencatatkan panjang akar tertinggi pada hari ke-7 (1.08 cm) dan hari ke-14 (5.03 cm) diikuti oleh *a20man1m*, manakala varieti jenis liar *Col-0* gagal menunjukkan sebarang pertumbuhan. Kegagalan pertumbuhan *Col-0* berkemungkinan berpunca daripada kerosakan oksidatif atau penurunan kebolehidupan benih akibat tempoh penyimpanan yang lama (Basbous-Serhal et al., 2016; Shinozaki et al., 2024). Sebaliknya, prestasi perkembangan akar yang baik pada varieti *oe-OsSAP4* dan *a20man1m* mencadangkan bahawa pengekspresan terlampau gen *OsSAP4* serta mutasi pada domain A20/AN1 memainkan peranan penting dalam menyokong pemanjangan dan perkembangan struktur akar (Giri et al., 2013). Bagi rawatan tekanan osmotik 20% PEG, tiada data dapat direkodkan kerana kepekatan PEG yang tinggi telah menyekat penyerapan air yang diperlukan untuk proses imbibisi, sekali gus merencat metabolisme percambahan dan perkembangan awal akar (Pratap & Sharma, 2010). Secara keseluruhannya, panjang akar terbukti sebagai penunjuk fisiologi yang kritikal bagi menilai tahap toleransi genotip terhadap status air dan potensi pertumbuhan awal tumbuhan, di mana perkembangan akar yang meluas meningkatkan keupayaan menyerap air serta mengekalkan kestabilan dan kecerunan pengangkutan air secara kapilari bagi menampung keperluan transpirasi (Verslues et al., 1998).



Rajah 8. Graf purata panjang akar pada varieti *Arabidopsis thaliana* terhadap keadaan kawalan pada hari ke-7 dan hari ke-14.

4. Kesimpulan

Kajian ini merumuskan bahawa pengekspresan gen *OsSAP4* dan mutasi pada domain A20/AN1 memainkan peranan kritikal dalam mengawal tindak balas morfo-fisiologi *Arabidopsis thaliana* terhadap tekanan osmotik 20% PEG. Pada fasa awal (hari ke-7), semua varieti menunjukkan peningkatan kandungan klorofil relatif sebagai mekanisme perlindungan fotosintesis, namun kesan ini menjadi tidak signifikan pada hari ke-14 akibat fasa penyesuaian. Penilaian status air menunjukkan bahawa tekanan berterusan sehingga hari ke-14 mengakibatkan penyusutan kandungan air relatif (RWC) yang ketara bagi semua genotip. Walau bagaimanapun, varieti mutan *a20man1m* didapati lebih berupaya mengekalkan homeostasis air, sekali gus menunjukkan daya tahan yang lebih tinggi berbanding *oe-OsSAP4* dan *Col-0*. Bagi parameter pertumbuhan, varieti transgenik (*oe-OsSAP4* dan *a20man1m*) menunjukkan perkembangan akar yang lebih baik dalam keadaan kawalan berbanding *Col-0*, manakala rawatan 20% PEG sepenuhnya menyekat percambahan akibat kegagalan imbibisi air. Secara keseluruhannya, mutasi pada domain A20 dan AN1 didapati menghasilkan tindak balas tekanan yang lebih seimbang dan adaptif, sekali gus membuktikan potensi pengubahsuaian domain genetik dalam meningkatkan daya tahan tumbuhan terhadap kemarau.

Penghargaan

Penghargaan diberikan kepada kakitangan yang terlibat di Makmal Bioteknologi Tumbuhan serta Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia atas kemudahan makmal yang telah disediakan. Penyelidikan ini juga telah dijayakan melalui sokongan kewangan daripada Universiti Kebangsaan Malaysia di bawah geran TAP-K019990.

Rujukan

- Bao, Q., Wu, Y., Du, H., Wang, Y., & Zhang, Y. (2025). Phenotypic Physiological and Metabolomic Analyses Reveal Crucial Metabolic Pathways in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in Response to PEG-6000 Induced Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(6).
<https://doi.org/10.3390/ijms26062599>
- Chen, Z. J., Wang, J., Tian, L., Lee, H.-S., Wang, J. J., Chen, M., Lee, J. J., Josefsson, C., Madlung, A., & Watson, B. (2004). The development of an Arabidopsis model system for genome-wide analysis of polyploidy effects. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 689–700.
- Foflonker, & Fatima. (2025, January 21). Osmotic pressure. Britannica
- Giri, J., Dansana, P. K., Kothari, K. S., Sharma, G., Vij, S., & Tyagi, A. K. (2013). SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *Bioessays*, 35(7), 639–648.
- Hazbir, N. A. M., Japlus, K. N., Mohammad-Sidik, A., Lam, S. D., & Isa, N. M. (2024). The Oryza sativa Stress Associated Protein (OsSAP) Promoter Modulates Gene Expression in Response to Abiotic Stress by Utilizing Cis Regulatory Elements Within The Promoter Region. *Malaysian Applied Biology*, 53(4), 89–102.
- Kang, M., Fokar, M., Abdelmageed, H., & Allen, R. D. (2011). Arabidopsis SAP5 functions as a positive regulator of stress responses and exhibits E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Molecular Biology*, 75, 451–466.
- Khairun Nisha Japlus, Lam Su Datt, Sobri Hussein, Nurulhikma Md Isa. 2023. Oryza Sativa Stress Associated Protein 4 (Ossap4) Cloning and Germination Analysis in Arabidopsis Transgenic. - 33rd Malaysian Society of Plant Physiology Conference (Mspp) 2023.14.
- Pratap, V., & Sharma, Y. K. (2010). Impact of osmotic stress on seed germination and seedling growth in black gram (*Phaseolus mungo*). In *Journal of Environmental Biology*.
- Roszelin, S., 'Aisyah M., Japlus, K. N., Goh, H. H., & Isa, N. M. (2025). Regulation of OsSAP8 Promoter in Response to Abiotic Stresses. *Malaysian Applied Biology*, 54(3), 46–58.
<https://doi.org/10.55230/mabjournal.v54i3.3210>
- Roszelin, S.A., Mohd Hazbir, N.A., Jumali, S.S., Shakri, T. & Md Isa, N. 2023. Characterization and functional study of stress-associated protein in rice and Arabidopsis. *Malaysian Applied Biology*, 52(3): 73-86.
- Saad, R. Ben, Romdhane, W. Ben, Mihoubi, W., Hsouna, A. Ben, & Brini, F. (2020). A Lobularia maritima LmSAP protein modulates gibberellic acid homeostasis via its A20 domain under abiotic stress conditions. *PLoS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233420>
- Sanders, G. J., & Arndt, S. K. (2012). Osmotic adjustment under drought conditions. In *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features* (pp. 199–229). Springer.
- Shinozaki, D., Takayama, E., Kawakami, N., & Yoshimoto, K. (2024). Autophagy maintains endosperm quality during seed storage to preserve germination ability in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.2321612121>
- Soltys-Kalina, D., Plich, J., Strzelczyk-Żyta, D., Śliwka, J., & Marczewski, W. (2016). The effect of drought stress on the leaf relative water content and tuber yield of a half-sib family of 'Katahdin'-derived potato cultivars. *Breeding Science*, 66(2), 328–331. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.66.328>
- Su, A., Qin, Q., Liu, C., Zhang, J., Yu, B., Cheng, Y., Wang, S., Tang, J., & Si, W. (2022). Identification and analysis of stress-associated proteins (SAPs) protein family and drought tolerance of ZmSAP8 in transgenic arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14109.
- Vashisth, V., Sharma, G., Giri, J., Sharma, A. K., & Tyagi, A. K. (2024). Rice A20/AN1 protein, OsSAP10, confers water-deficit stress tolerance via proteasome pathway and positive regulation of ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 43(9), 215.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45(4), 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02593.x>
- Verslues, P. E., Ober, E. S., & Sharp, R. E. (1998). Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology*, 116(4), 1403–1412.
- Vij, S., & Tyagi, A. K. (2008). A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Functional & Integrative Genomics*, 8, 301–307.

Pengekspresan *OsABP57* yang Berlebihan Meningkatkan Ketahanan *Arabidopsis* terhadap Tekanan Rendaman

(*The Overexpression of OsABP57 Enhanced Arabidopsis Tolerance to Submergence Stress*)

Muhammad Fahmi Razuki¹, Farah Afiqah Baharuddin² & Noor Liyana Sukiran^{1*}

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

²Institut Latihan Pengembangan Pertanian (ILPP), Kompleks Jabatan Pertanian, 43400 Serdang, Selangor, Malaysia

*E-mel pengarang koresponden: liyana@ukm.edu.my

Abstrak: Penenggelaman boleh mengancam pertumbuhan dan menjejaskan hasil tanaman dengan mengehadkan pengambilan oksigen dan mengurangkan ketersediaan cahaya, yang mengurangkan aktiviti dan kecekapan fotosintesis. PROTEIN PENGIKAT AUKSIN 57 (ABP57) ialah protein pengikat auksin yang boleh meningkatkan toleransi pokok padi terhadap kemarau, kemasinan, dan penenggelaman. Sehingga kini, gerak balas *Arabidopsis* yang mengekspreskan *OsABP57* secara berlebihan terhadap penenggelaman masih tidak diketahui. Dalam kajian rintis ini, dua titisan *Arabidopsis* 35S::*OsABP57* transgenik dan jenis liar (WT) telah digunakan untuk membandingkan peratusan kemandirian dan perubahan pertumbuhan semasa penenggelaman. Rawatan penenggelaman telah dikenakan pada *Arabidopsis* berusia 4 minggu di dalam bekas yang berisi air selama tiga hari, dan peratusan kemandirian dan perubahan pertumbuhan selepas pemulihan telah ditentukan. Hasil menunjukkan bahawa *Arabidopsis* WT tidak dapat hidup selepas penenggelaman, manakala *Arabidopsis* transgenik #3 dan #13 masing-masing menunjukkan pemulihan dengan peratusan kebolehidupan 50% dan 25%. Walaupun kedua-dua *Arabidopsis* transgenik dapat pulih daripada penenggelaman, pertumbuhan mereka terbantut akibat rawatan tersebut. Tambahan pula, titisan transgenik yang dirawat memerlukan bilangan hari untuk berbunga yang lebih panjang serta mempunyai bilangan dan panjang silik yang lebih rendah berbanding tumbuhan kawalan. Kesimpulannya, pengekspressan berlebihan *OsABP57* meningkatkan toleransi *Arabidopsis* terhadap penenggelaman tetapi masih menunjukkan pengurangan hasil.

Kata kunci: *OsABP57*; pasca-rendaman; penenggelaman; pemulihan

Abstract: Submergence can threaten plant growth and affect crop yields by limiting oxygen uptake and reducing light availability, which reduces photosynthesis activity and efficiency. AUXIN BINDING PROTEIN 57 (ABP57) is an auxin binding protein that can enhance the tolerance of rice plants to drought, salinity, and submergence stresses. To date, the response of *Arabidopsis* overexpressing *OsABP57* to submergence remains unknown. In this preliminary study, two lines of transgenic *Arabidopsis* 35S::*OsABP57* and wild type (WT) were used to compare the survival percentage and growth changes under submergence stress. Submergence was applied to 4-week-old *Arabidopsis* in water-filled containers for three days, and survival percentage and growth changes after recovery were determined. The results showed that WT *Arabidopsis* could not survive submergence, while the transgenic *Arabidopsis* lines #3 and #13 recovered with survival percentages of 50% and 25%, respectively. Although both transgenic *Arabidopsis* were able to recover from submergence, their growth was stunted by the treatment. Furthermore, both transgenic lines that underwent submergence require a longer flowering days and possess lower silique number and silique length as compared to control plants. In conclusion, overexpression of *OsABP57* increased *Arabidopsis* tolerance to submergence but still showed yield reduction.

Keywords: *OsABP57*; post-submergence; submergence; recovery

1. Pendahuluan

Banjir merupakan salah satu tekanan abiotik yang mengancam kemandirian tumbuhan kerana keadaan penenggelaman dapat menyebabkan kekurangan oksigen kepada tumbuhan (Wang & Komatsu 2022). Penenggelaman boleh menjejaskan pertukaran gas antara tumbuhan dan atmosfera kerana resapan gas di dalam air berkurangan dan menjadi lebih perlahan berbanding daripada di udara. Penenggelaman seringkali dikaitkan dengan banjir yang mewujudkan keadaan anoksia dan hipoksia, sekaligus menghalang akar daripada memperolehi nutrien yang mencukupi. Kekurangan oksigen di dalam air seterusnya menjejaskan pertumbuhan serta perkembangan tumbuhan. Selain itu, penenggelaman boleh mengakibatkan perencatan dan pengurangan kadar fotosintesis (Voeselek et al. 2006; Iftikhar et al. 2025).

Protein pengikat auksin (ABP) berperanan penting dalam pengisyratan auksin yang mempengaruhi perkembangan tumbuhan. Umumnya, auksin memerlukan reseptor bagi mengaktifkan tapak jalan pengisyratannya semasa gerak balas pertumbuhan mahupun semasa dalam keadaan tekanan. OsABP57 merupakan protein pengikat auksin yang dipencilkan daripada tumbuhan padi. Pengikatan auksin kepada OsABP57 mengaktifkan membran plasma H^+ -ATPase (Kim et al. 2001) yang penting untuk homeostasis pH intrasel (Palmgren 2001). Semasa tekanan penenggelaman, auksin terlibat dalam pemanjangan koleoptil (Wu & Yang 2020) dan perkembangan akar adventitus (Yang et al. 2018).

Pengekspresan *OsABP57* diaruh oleh tekanan kemarau, asid absisik dan auksin (Baharuddin et al. 2021). Peningkatan pengekspresan *OsABP57* pula didapati membantu toleransi tumbuhan padi dan Arabidopsis terhadap tekanan abiotik seperti kemarau dan kemasinan (Tan et al. 2018; Kamarudin et al. 2020). Pengekspresan *OsABP57* berlebihan turut menggalakkan pertumbuhan akar adventitus padi semasa penenggelaman (Zambrose et al. 2020). Ini mencadangkan bahawa gen ini terlibat dalam pengisyratan auksin untuk meningkatkan ketahanan tumbuhan terhadap tekanan abiotik.

Arabidopsis thaliana adalah organisma tumbuhan model yang seringkali digunakan untuk memahami fungsi sesuatu gen. *A. thaliana* merupakan tumbuhan dikotiledon dan tidak dapat bertoleransi terhadap keadaan hipoksia atau anoksia dalam tempoh masa yang panjang (Nakamura & Noguchi 2020). Kajian lepas menunjukkan bahawa pengekspresan *OsABP57* berlebihan pada *A. thaliana* mampu meningkatkan ketahanannya terhadap kemarau dan kemasinan (Tan et al. 2018) namun gerak balas tumbuhan transgenik ini terhadap penenggelaman masih kurang diketahui. Oleh yang demikian, kajian rintis ini dijalankan bertujuan untuk menilai gerak balas Arabidosis yang mengekspreskan *OsABP57* terhadap penenggelaman agar dapat mengukuhkan lagi pengetahuan mengenai fungsi *OsABP57* dalam keadaan tekanan.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Pensterilan dan penanaman biji benih

Biji benih *A. thaliana* ekotip Col-0 jenis liar (WT) dan transgenik yang membawa konstruk pengekspresan berlebihan *OsABP57* di bawah arahan promotor 35S CaMV, 35S::*OsABP57* (titisan #3 dan #13), telah direndam di dalam air suling selama 15 minit. Kemudian, air suling tersebut digantikan dengan 1 mL 70% EtOH sebelum digoncang selama dua minit. Larutan EtOH tersebut kemudiannya dikeluarkan dan digantikan dengan 1 mL 50% NaOCl sebelum digoncang selama 5 hingga 10 minit. Setelah digoncang, larutan tersebut dikeluarkan dan biji benih dibilas dengan 1 mL ddH₂O sebanyak tujuh kali untuk memastikan agar biji benih tersebut steril.

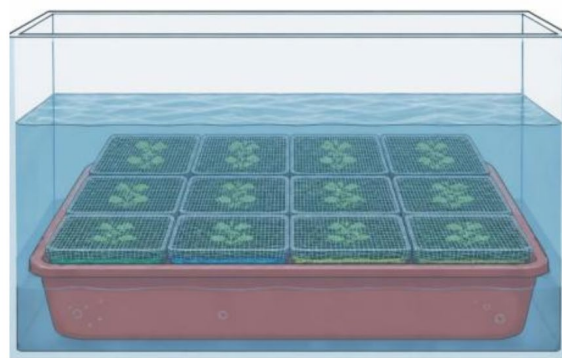
Biji benih WT yang steril ditanam di atas piring petri yang mengandungi agar Murashige-Skoog (MS) manakala biji benih transgenik diletakkan ke dalam piring petri MS yang mengandungi 50 µg/mL higromisin (MS + Hyg). Saringan dengan piring MS + Hyg dilakukan bagi memastikan anak benih transgenik digunakan dalam eksperimen ini. Kesemua piring petri ditutup dengan menggunakan parafilm bagi mengelakkan kekeringan dan disimpan di dalam bilik sejuk (4°C) dalam keadaan gelap selama tiga hari sebelum dipindahkan ke bilik kultur tisu selama 14 hari.

Setelah 14 hari, anak benih WT dan 35S::*OsABP57* di dalam piring petri dipindahkan ke dalam pasu yang berisi campuran tanah dan vermikulit yang bernisbahkan 2:1. Hanya anak benih dengan saiz yang seragam sahaja dipindahkan ke dalam pasu dengan menggunakan forseps. Kemudian, anak benih disiram dan dibiarkan membesar selama 14 hari di dalam bilik pertumbuhan sebelum diberikan rawatan penenggelaman. Ini bertujuan untuk memastikan pertumbuhan tumbuhan di atas

tanah telah stabil sebelum dikenakan rawatan penenggelaman.

2.2 Rawatan penenggelaman

Anak benih Arabidopsis WT, titisan transgenik 35S::OsABP57 #3 dan 35S::OsABP57 #13 yang berusia 4 minggu telah dikenakan rawatan penenggelaman penuh. Eksperimen dijalankan secara reka bentuk rawak lengkap dan sebanyak 15 tumbuhan digunakan untuk setiap jenis Arabidopsis. Tiga replikasi dengan satu tumbuhan digunakan sebagai kawalan tanpa rawatan. Untuk rawatan penenggelaman, sebanyak 12 tumbuhan bagi setiap jenis Arabidopsis dibahagikan kepada dua replikasi ($n = 6$). Sebelum rawatan rendaman diberikan, kesemua pasu ditutupi dengan fabrik jejaring bagi mengelakkan campuran tanah serta tumbuhan tercabut apabila ditenggelami air. Pasu rawatan diletakkan ke dalam bekas yang berisi air sehingga keseluruhan tumbuhan tenggelam sepenuhnya (Rajah 1) selama tiga hari. Selepas itu, kesemua pasu dikeluarkan dari bekas air dan dibiarkan untuk pulih di atas rak.



Rajah 1. Rawatan penenggelaman penuh ke atas tumbuhan Arabidopsis. Sebanyak 12 pasu diletakkan di dalam bekas sebelum keseluruhan tumbuhan direndam.

2.3 Penentuan peratus kebolehidupan

Keupayaan tumbuhan WT dan transgenik untuk pulih diperhatikan melalui pertumbuhan daun baru atau daun yang masih hijau selepas 10 hari dikeluarkan dari bekas air. Peratusan tumbuhan yang masih hidup ditentukan bagi melihat pemulihan tumbuhan terhadap rawatan yang dikenakan melalui rumus di bawah. Nilai purata peratus kebolehidupan ditentukan berdasarkan dua replikasi.

$$\text{Peratus kebolehidupan} = \frac{\text{Pokok yang hidup}}{\text{Jumlah pokok (6)}} \times 100$$

2.4 Pemerhatian pertumbuhan selepas pemulihan

Pemerhatian terhadap pemulihan tumbuhan selepas rendaman dilakukan dengan memerhatikan pertumbuhan daun, bilangan hari untuk berbunga, bilangan silik (kapsul buah) dan panjang silik yang dihasilkan bagi tumbuhan yang dapat terus hidup. Bagi Arabidopsis WT, tiada data direkodkan kerana peratus kebolehidupannya adalah sifar. Bilangan hari untuk berbunga ditentukan dengan mengambil kira kemunculan bunga pertama selepas tumbuhan pulih dari penenggelaman, manakala bilangan silik ditentukan sehingga tiada penghasilan silik yang baru. Panjang silik daripada keseluruhan silik yang dihasilkan oleh setiap tumbuhan diukur menggunakan pembaris.

2.5 Analisis statistik

Nilai purata telah ditentukan daripada kesemua anak pokok yang masih hidup. Bagi pokok kawalan dan Arabidopsis transgenik titisan #3 rawatan, purata diambil kira daripada tiga anak pokok manakala dua anak pokok Arabidopsis transgenik titisan #13 rawatan digunakan untuk penentuan purata. Data yang diperolehi dianalisis dengan menggunakan perisian *GraphPad Prism* (v.11). Analisis varians

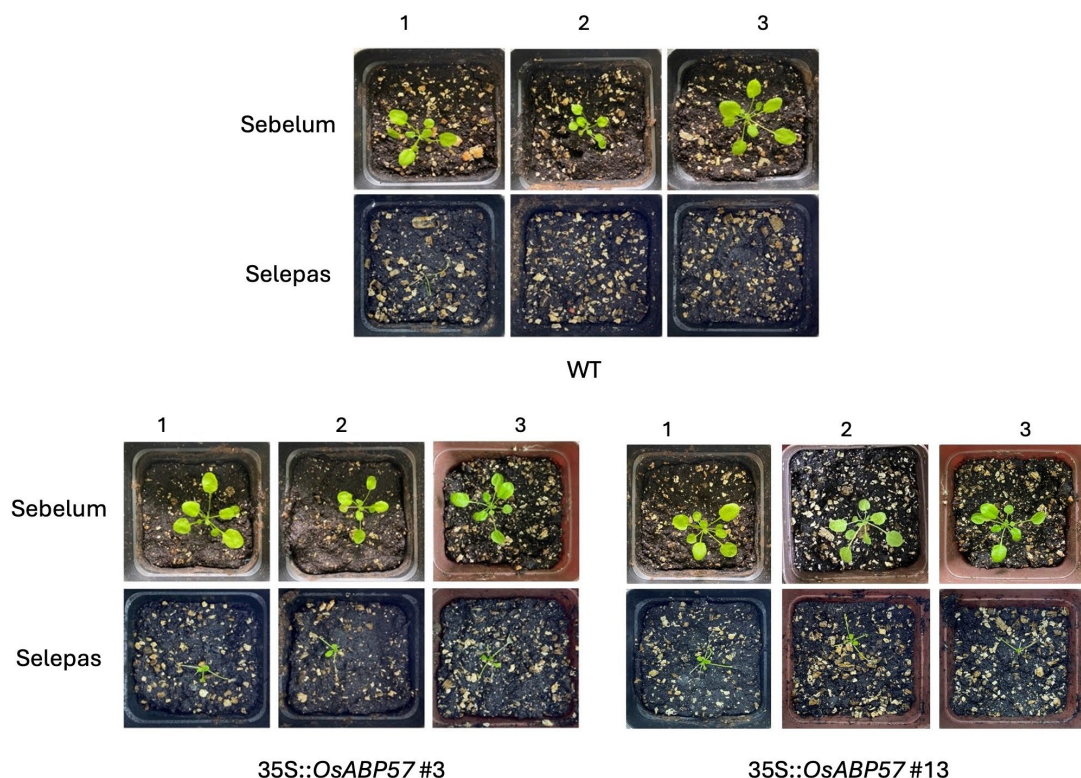
(ANOVA) dijalankan diikuti oleh perbandingan purata menggunakan ujian Fisher LSD bagi menentukan perbezaan yang ketara pada nilai $p < 0.05$.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Keupayaan untuk pulih dari tekanan rendaman

Berdasarkan Rajah 2, Arabidopsis WT yang mengalami penenggelaman tidak dapat hidup setelah dikeluarkan daripada air selama 3 hari. Bagi kedua-dua Arabidopsis transgenik pula, daun roset yang berkembang dengan baik pada permulaannya tidak lagi kelihatan tetapi daun roset yang lebih muda masih kekal hijau. Pemerhatian ini menunjukkan bahawa senesens yang diaruh oleh rendaman lebih cepat berlaku pada daun roset yang lebih tua mungkin akibat daripada pengumpulan etilena (Rankenberg et al. 2024).

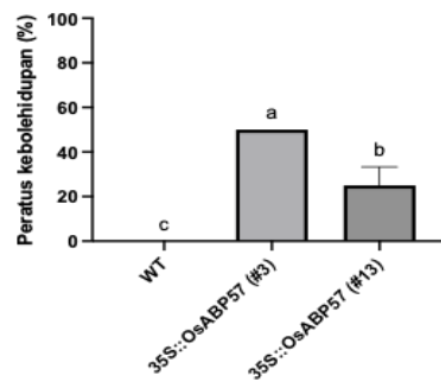
Penenggelaman membuatkan Arabidopsis WT tidak dapat bermandiri mungkin kerana kekurangan oksigen di dalam air. Berdasarkan kajian lepas, kerosakan pada tumbuhan yang terendam bertambah teruk dengan peningkatan kekeruhan kerana keadaan ini mengurangkan fotosintesis dan tahap oksigen terhadap tumbuhan (Nakamura & Noguchi 2020). Selain itu, penenggelaman juga menjejaskan resapan oksigen di dalam tisu tumbuhan dan mengehadkan pertukaran oksigen (Zhou et al. 2020). Namun bagi Arabidopsis transgenik, kehadiran *OsABP57* yang berlebihan membolehkan tumbuhan ini terus hidup walaupun pertumbuhannya agak terbantut. Secara keseluruhannya, penenggelaman telah memberi kesan yang negatif terhadap WT dan transgenik walaupun pengekspresan *OsABP57* dapat membantu kemandirian Arabidopsis selepas rawatan.



Rajah 2. Keadaan Arabidopsis WT dan transgenik *OsABP57* selepas 3 hari rendaman. Anak pokok yang masih hijau dikategorikan sebagai masih hidup. Setiap jenis Arabidopsis diwakili oleh tiga pasu yang berbeza.

Setelah 10 hari dikeluarkan dari rendaman, peratus kebolehidupan tumbuhan telah ditentukan bagi membandingkan kadar pemulihan mereka. Berdasarkan Rajah 3, Arabidopsis WT tidak dapat hidup selepas penenggelaman manakala tumbuhan transgenik masih lagi bertahan. Arabidopsis transgenik *35S::OsABP57* #3 menunjukkan peratus kebolehidupan yang lebih tinggi (50%) berbanding *35S::OsABP57* #13 (25%) dalam 10 hari tempoh pemulihan. Namun begitu, sebahagian daripada tumbuhan ini mati sebelum mencapai peringkat reproduktif, meninggalkan hanya tiga pokok bagi titisan #3 dan dua pokok bagi titisan #13 untuk pemerhatian pertumbuhan seterusnya.

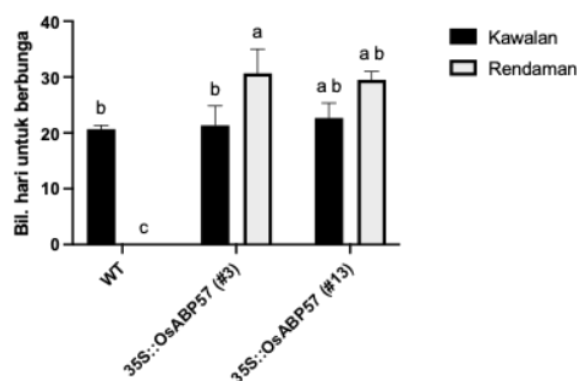
Kedua-dua titisan transgenik menunjukkan peratus kebolehidupan yang berlainan dan keadaan ini mungkin disebabkan oleh tahap pengekspresan *OsABP57* yang berbeza. Walaupun titisan transgenik tersebut mempunyai aruhan promoter 35S CaMV yang sama, kesan posisi integrasi T-DNA atau variasi bilangan salinan transgen (Bandopadhyay et al. 2010; Permyakova et al., 2021) mungkin mempengaruhi tahap pengekspresan *OsABP57* di dalam *Arabidopsis*. Peningkatan gen responsif tekanan kebiasaannya berkait rapat dengan peningkatan toleransi terhadap kepayahan (Lohani et al. 2022) dan sekaligus mempengaruhi keupayaan mereka untuk pulih dan bermandiri semula. Namun begitu, analisis pengekspresan melalui *Real-Time*-qPCR perlu dilakukan untuk mengesahkan tahap pengekspresan *OsABP57* di dalam kedua-dua tumbuhan transgenik ini.



Rajah 3. Perbandingan peratus kebolehidupan *Arabidopsis* WT dan transgenik *35S::OsABP57* selepas 10 hari dikeluarkan dari bekas rendaman. Nilai purata ditentukan daripada dua replikasi ($n = 6$) dan huruf yang berbeza menandakan terdapat perbezaan ketara pada $p < 0.05$.

3.2 Bilangan hari untuk berbunga

Tekanan rendaman yang dikenakan pada peringkat vegetatif telah melewati tempoh pembungaan *Arabidopsis* transgenik yang diuji (Rajah 4). Dalam keadaan kawalan, tiada perbezaan bilangan hari antara *Arabidopsis* WT dan transgenik (20 hingga 22 hari). Namun, berbeza dengan tumbuhan transgenik yang dikenakan rawatan penenggelaman, tempoh masa yang diperlukan untuk berbunga telah meningkat kepada 30 hari, yang mana peningkatan ketara ($p < 0.05$) diperhatikan pada *35S::OsABP57* #3. Walaupun *35S::OsABP57* #13 menunjukkan peningkatan hari untuk berbunga, perbezaannya adalah tidak ketara secara statistik apabila dibandingkan dengan tumbuhan kawalan. Ini mungkin disebabkan oleh bilangan sampel yang kecil ($n = 2$) dan menyukarkan perbandingan yang lebih tepat.

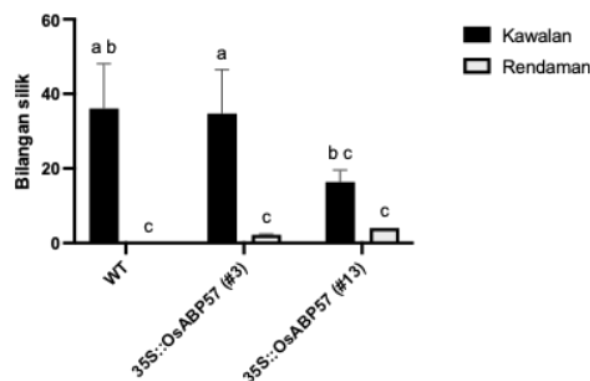


Rajah 4. Perbandingan bilangan hari untuk berbunga pada *Arabidopsis* WT dan transgenik *35S::OsABP57* selepas penenggelaman. Sebanyak tiga sampel digunakan bagi penentuan purata untuk setiap jenis *Arabidopsis*, kecuali bagi *35S::OsABP57* #13 ($n = 2$) yang dikenakan rawatan. Huruf yang berbeza menandakan terdapat perbezaan ketara pada $p < 0.05$.

Hasil ini telah dijangka kerana penenggelaman boleh menjejaskan penghasilan dan kematangan bunga (Afrin et al. 2018; Wening et al. 2020). Selepas penenggelaman berakhir, tumbuhan masih lagi menghadapi tekanan yang berlainan pada fasa pemulihan. Antaranya ialah oksigenasi semula, dehidrasi, fotoperencatan dan peningkatan senesens yang boleh menjejaskan homeostasis sel (Yuan et al. 2022). Selain itu, kebolehan untuk tumbuh semula memerlukan pengoptimuman fotosintesis agar sumber tenaga mencukupi diperolehi, namun secara tidak langsung telah memperlambatkan transisi fasa reproduktif (Liu et al. 2015; Yuan et al. 2022).

3.3 Kesan rendaman terhadap penghasilan silik (kapsul buah)

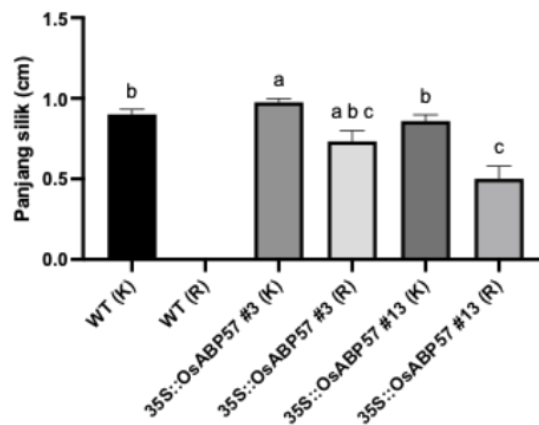
Selepas pulih daripada penenggelaman, kedua-dua Arabidopsis transgenik mampu menghasilkan silik namun bilangannya jauh lebih rendah berbanding silik yang dihasilkan oleh tumbuhan kawalan (Rajah 5). Perbezaan ketara ($p < 0.05$) dapat dilihat pada Arabidopsis 35S::*OsABP57* #3 rawatan yang menghasilkan silik dengan nilai purata 2.20. Biarpun penghasilan silik pada Arabidopsis 35S::*OsABP57* #13 rawatan turut berkurangan, perbezaan ini tidak ketara ($p > 0.05$) kerana penghasilan silik dalam keadaan kawalan agak rendah berbanding Arabidopsis yang lain. Dalam keadaan kawalan, tiada perbezaan di antara bilangan silik titisan #3 dan WT, tetapi titisan #13 menghasilkan silik yang lebih rendah. Pemerhatian ini perlu diulang untuk menentukan sama ada pengekspressan *OsABP57* di dalam titisan #13 memberikan kesan terhadap gen natif akibat daripada integrasi T-DNA yang mungkin menjejaskan perkembangan silik dalam keadaan tanpa tekanan.



Rajah 5. Perbandingan bilangan silik yang dihasilkan oleh Arabidopsis WT dan transgenik *OsABP57* selepas penenggelaman. Sebanyak tiga sampel digunakan bagi penentuan purata untuk setiap jenis Arabidopsis, kecuali bagi 35S::*OsABP57* #13 ($n = 2$) yang dikenakan rawatan. Huruf yang berbeza menandakan terdapat perbezaan ketara pada $p < 0.05$.

Di samping itu, kebanyakan silik titisan transgenik yang tumbuh di bawah keadaan kawalan mempunyai panjang yang hampir sama dengan silik yang dihasilkan oleh WT (Rajah 6). Ini menunjukkan bahawa kehadiran *OsABP57* tidak mempengaruhi saiz silik dalam keadaan kawalan. Namun, silik yang terhasil pada kedua-dua titisan Arabidopsis transgenik rawatan adalah lebih pendek daripada silik pokok kawalan, di mana hanya titisan #13 menunjukkan perbezaan ketara ($p < 0.05$) tetapi tidak bagi titisan #3. Perbezaan panjang silik yang tidak ketara pada titisan #3 kawalan dan rawatan mencadangkan bahawa penenggelaman memberikan kesan yang minima terhadap saiz silik. Berlainan dengan titisan #13, saiz silik yang berkurangan dengan ketara mencadangkan bahawa penenggelaman boleh menyebabkan kemerosotan hasil pada titisan ini.

Penurunan bilangan silik yang drastik mungkin disebabkan oleh kegagalan perkembangan bunga yang sekaligus menyebabkan penghasilan biji benih turut berkurangan. Keadaan ini mungkin terjadi akibat aktiviti fotosintesis yang terhad selepas fasa pemulihan (Liu et al. 2015) menyebabkan penggunaan simpanan karbon turut dihadkan untuk pembentukan organ pembiakan. Selain itu, penghasilan silik yang pendek berbanding kawalan mencadangkan bahawa perkembangan buah (silik) telah terjejas mungkin kerana pembentukan ovul yang tidak matang (Zhou et al. 2021) atau bekalan asimilat fotosintesis yang terbatas menjadikan pengisian biji benih tidak mencukupi (Manghwar et al. 2024).



Rajah 6. Perbandingan panjang silik yang dihasilkan oleh Arabidopsis WT dan transgenik *OsABP57* dalam keadaan kawalan (K) dan selepas rendaman (R). Sebanyak tiga sampel digunakan bagi penentuan panjang silik untuk setiap jenis Arabidopsis, kecuali bagi 35S::*OsABP57* #13 ($n = 2$) yang dikenakan rawatan. Purata panjang silik ditentukan berdasarkan keseluruhan silik yang terhasil daripada setiap genotip Arabidopsis. Huruf yang berbeza menandakan terdapat perbezaan ketara pada $p < 0.05$.

Berdasarkan hasil yang diperolehi, *OsABP57* mungkin berperanan dalam mengawalatur pertumbuhan dan gerak balas tekanan semasa penenggelaman. Penglibatan *OsABP57* dalam modulasi pengisyaratan auksin mungkin meningkatkan ketahanan terhadap penenggelaman tetapi tidak berupaya untuk membantu proses perkembangan vegetatif dan reproduktif selepas pulih daripada penenggelaman. Secara hipotetikal, pengekspresan *OsABP57* berlebihan mungkin mempengaruhi pengekspresan gen tertentu yang terlibat dengan kecekapan fotosintesis dan berpotensi mengubah translokasi karbon. Kesannya, keupayaan untuk pulih daripada keadaan penenggelaman melibatkan kompromi dari segi perkembangan reproduktif dan kehilangan hasil.

Perbezaan gerak balas di antara kedua-dua transgenik telah diperhatikan, di mana 35S::*OsABP57* #3 mempunyai peratus kebolehidupan yang tinggi dan mempunyai perbezaan ketara dengan pokok kawalan dari segi bilangan hari untuk berbunga, bilangan silik dan panjang silik. Berbanding dengan 35S::*OsABP57* #13, peratus kebolehidupannya lebih rendah dan kebanyakan parameter yang diukur tidak menunjukkan perbezaan ketara antara tumbuhan kawalan dan rawatan. Perbezaan ini juga dipengaruhi oleh bilangan sampel yang terhad akibat daripada kesan penenggelaman yang drastik, menjadikan perbandingan statistik tidak begitu tepat. Penggunaan sampel yang lebih banyak adalah diperlukan untuk mendapatkan hasil yang lebih jitu.

4. Kesimpulan

Kajian rintis ini mendapati bahawa pengekspresan *OsABP57* berlebihan di dalam Arabidopsis mampu meningkatkan kebolehidupan tumbuhan ini selepas penenggelaman namun memberikan hasil yang rendah. Ini mencadangkan bahawa *OsABP57* dapat membantu proses pemulihan tumbuhan agar dapat terus bermandiri. Namun, kajian lanjut perlu dilakukan dengan menggunakan lebih banyak sampel biologi dan mengesahkan pengekspresan gen *OsABP57* di dalam titisan transgenik. Selain itu, kostruk yang menyasarkan pengekspresan *OsABP57* pada bahagian akar diperlukan agar ketahanan terhadap rendaman dikekalkan dan kehilangan hasil dapat diminimakan.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh Kementerian Pengajian Tinggi dengan menggunakan dana FRGS-1-2016-STG03-UKM-02-3.

Rujukan

- Afrin, W., Nafis, M.H., Hossain, M.A., Islam, M.M. and Hossain, M.A. 2018. Responses of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to different levels of submergence. *Comptes Rendus Biologies* 341(2): 85-96.
- Baharuddin, F.A., Khong, Z. X., Zainal Z. and Sukiran, N.L. 2021. *In silico* promoter and expression analysis of rice *Auxin Binding Protein 57* (ABP57). *Plant Science Today* 8(3): 741-748.
- Bandopadhyay, R., Haque, I., Singh, D. and Mukhopadhyay, K. 2010. Levels and stability of expression of transgenes. *Transgenic Crop Plants*:145–186.
- Iftikhar, N., Bhutta, M.S., Zaman, N.T., Khalid, A., Latif, A., Azam, S., Shahid, N., Yasmeen, A. and Rao, A.Q. 2025. Submergence stress in plants: molecular mechanisms, physiological changes, and adaptive responses. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 31: 1853–1866.
- Kamarudin, Z.S., Shamsudin, N.A.A., Othman, M.H.C., Shakri, T., Tan, L.W., Sukiran, N.L., Isa, N.M., Rahman, Z.A. and Zainal, Z. 2020. Morpho-physiology and antioxidant enzyme activities of transgenic rice plant overexpressing *ABP57* under reproductive stage drought condition. *Agronomy* 10(10): 1530.
- Kim, Y.S., Min, J.K., Kim, D. and Jung, J. 2001. A soluble auxin-binding protein, ABP57: Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 276(14): 10730–10736.
- Lohani, N., Singh, M.B. and Bhalla, P.L. 2022. Biological parts for engineering abiotic stress tolerance in plants. *BioDesign Research* 2022: 9819314.
- Liu, Z., Cheng, R., Xiao, W., Guo, Q., Wang, Y., Wang, N. and Wang, Y. 2015. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence, non-structural carbohydrate content and growth responses of *Distylium chinense* during complete submergence and subaerial re-emergence. *Aquatic Botany* 124: 70–77.
- Manghwar H., Hussain, A., Alam, I., Ahmed Khoso, M., Ali, Q. and Liu, F. 2024. Waterlogging stress in plants: Unraveling the mechanisms and impacts on growth, development, and productivity. *Environmental & Experimental Botany* 224: 105824.
- Nakamura, M. and Noguchi, K. 2020. Tolerant mechanisms to O₂ deficiency under submergence conditions in plants. *Journal of Plant Research* 133(3): 343–371.
- Palmgren, M.G. 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1): 817–845.
- Permyakova, N.V., Marenkova, T.V., Belavin, P.A., Zagorskaya, A.A., Sidorchuk, Y.V., Uvarova, E.A., Kuznetsov, V.V., Rozov, S.M. and Deineko, E.V. 2021. Assessment of the level of accumulation of the dIFN protein integrated by the knock-in method into the region of the histone H3.3 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Cells* 10(8):2137.
- Rankenberg, T., van Veen, H., Sedaghatmehr, M., Liao, C.Y., Devaiah, M.B., Stouten, E.A., Balazadeh, S. and Sasidharan, R. 2024. Differential leaf flooding resilience in *Arabidopsis thaliana* is controlled by ethylene signaling-activated and age-dependent phosphorylation of ORESARA1. *Plant Communications* 5(6): 100848.
- Tan, L.W., Tan, C.S., Zuraida, A.R., Hossein, H.M., Goh, H.H., Ismanizan, I. and Zamri, Z. 2018. Overexpression of *Auxin Binding Protein 57* from Rice (*Oryza sativa* L.) increased drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 197(1): 012038.
- Voesenek, L.A.C.J., Colmer, T.D., Pierik, R., Millenaar, F.F. and Peeters, A.J.M. 2006. How plants cope with complete submergence. *New Phytologist* 170(2): 213-226.
- Wang, X. and Komatsu, S. 2022. The role of phytohormones in plant response to flooding. *International Journal of Molecular Sciences* 23(12): 6383.
- Wening, R.H., Purwoko, B.S., Suwarno, S.B., Rumanti, I.A. and Khumaida, N. 2020. Submergence and drought stresses in rice over genotype by environment interaction. *SABRAO Journal of Breeding & Genetics* 52(4): 435-445.
- Wu, Y.S. and Yang, C.Y. 2020. Comprehensive transcriptomic analysis of auxin responses in submerged rice coleoptile growth. *International Journal of Molecular Science* 21(4): 1292.
- Yang, X., Jansen, M.J., Zhang, Q., Sergeeva, L., Ligterink, W., Mariani, C., Rieu, I. and Visser E.J.W. 2018. A disturbed auxin signaling affects adventitious root outgrowth in *Solanum dulcamara* under complete submergence. *Journal of Plant Physiology* 224-225: 11-18.
- Yuan, L.B., Chen, M.X., Wang, L.N., Sasidharan, R., Voesenek, L.A.C.J. and Xiao, S. 2022. Multi-stress resilience in plants recovering from submergence. *Plant Biotechnology Journal* 21(3): 466-481.
- Zambrose, Z.A., Mohd Roszelin, S.A., Mohd Hazbir, N.A., Chew, B.L., Jumali, S.S., Wan Yahya, W.A. and Md Isa, N. 2020. Effect of rice *AUXIN BINDING PROTEIN 57* (*OsABP57*) overexpression in response to flooding. *Journal of Agricultural Science & Technology* B10: 125-133.
- Zhou, J., Tian, L., Wang, S., Li, H., Zhao, Y., Zhang, M., Wang, X., An, P. and Li, C. 2021. Ovary abortion induced by combined waterlogging and shading stress at the flowering stage involves amino acids and flavonoid metabolism in maize. *Frontiers in Plant Science* 12:778717.
- Zhou, W., Chen, F., Meng, Y., Chandrasekaran, U., Luo, X., Yang, W. and Shu, K. 2020. Plant waterlogging/flooding stress responses: From seed germination to maturation. *Plant Physiology and Biochemistry* 148: 228–236.

Cellulase from *Bacillus subtilis* SUNGB2: Characterisation of a Potential Industrial Biocatalyst

Yasheega Chemis, Nadiah Mohd Najmi Nagen, Vironica Winson &
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: Environmental pollution and the high cost of biofuel production have driven the search for efficient and eco-friendly sources of cellulase enzymes. This study aimed to characterise cellulase from thermophilic *Bacillus subtilis* SUNGB2 isolated from Sungai Klah Hot Spring, Malaysia. The bacteria were cultured in 1.5% vegetable waste medium and cellulase was harvested at 8 hours via centrifugation at 10,000 $\times$ g. Cellulase activity was assayed at 50°C for 30 minutes using CMC as the substrate and reducing sugars were quantified using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay at 540 nm. The enzyme was partially purified through 40% ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-75 gel filtration chromatography with a purification fold of 0.08 and 3.59% yield. The enzyme remained stable over a broad pH range (pH 4-9), with the highest enzyme activity of 1.84 U/mL at pH 8. The highest enzyme activity in the presence of ethanol was observed at 20% (0.17 U/mL). Kinetic parameters were determined via the Hanes–Woelf plot and yielded a K_M of 0.14 mg/mL and a V_{max} of 7.11 U/mL. Overall, cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 demonstrates stability under alkaline and organic solvent conditions and shows strong potential for industrial applications.

Keywords: *Bacillus subtilis*; cellulase; optimum growth medium; pH; organic solvent; kinetic parameters

Abstrak: Peningkatan pencemaran alam sekitar serta kos pengeluaran biobahan api yang tinggi telah mendorong pencarian enzim selulase yang cekap, stabil dan mesra alam. Kajian ini bertujuan untuk mencirikan enzim selulase daripada *Bacillus subtilis* SUNGB2 termofili yang dipencilkan daripada Sungai Klah Hot Spring, Malaysia. Bakteria tersebut dikultur dalam medium sisa sayuran 1.5% dan selulase dituai pada jam ke-8 melalui pengemparan pada 10,000 $\times$ g. Aktiviti selulase diuji pada suhu 50 °C selama 30 minit menggunakan CMC sebagai substrat, dan gula penurun diukur menggunakan kaedah pengesaian asid 3,5-dinitrosalisilik (DNS) pada 540 nm. Enzim tersebut ditulenkan separa melalui pemendakan ammonium sulfat 40% dan kromatografi penurasan gel Sephadex G-75 dengan faktor penulenan 0.08 dan peratus kembalian 3.59%. Enzim ini kekal stabil dalam julat pH yang luas (pH 4–9), dengan aktiviti enzim tertinggi bersamaan 1.84 U/mL pada pH 8. Aktiviti enzim tertinggi diperhatikan dalam kehadiran 20% etanol iaitu bersamaan 0.17 U/mL. Penentuan parameter kinetik menggunakan plot Hanes–Woelf memberikan nilai K_M bersamaan 0.14 mg/mL dan V_{max} bersamaan 7.11 U/mL. Secara keseluruhan, selulase daripada *B. subtilis* SUNGB2 menunjukkan kestabilan dalam keadaan beralkali dan pelarut organik serta mempunyai potensi yang tinggi untuk aplikasi industri.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*; selulase; medium pertumbuhan optimum; pH; pelarut organik; parameter kinetik

1. Introduction

Cellulase is a key industrial enzyme responsible for hydrolysing cellulose into fermentable sugars for bioethanol production and other biobased applications (Kuhad, Gupta & Singh 2011). Its industrial performance depends largely on catalytic stability under process conditions that may involve elevated temperatures, pH variations, and exposure to organic solvents (Bansal et al. 2012). Therefore, detailed biochemical characterisation is essential to evaluate its suitability for industrial applications.

Extremophilic microorganisms are known to produce enzymes with enhanced structural stability and resistance to denaturation (Rampelotto 2013; Raddadi et al. 2015). For example, thermophilic bacteria synthesise enzymes that remain functional at high temperatures due to structural adaptations such as compact folding and strengthened hydrophobic interactions (Mehta et al. 2016). Among industrially important bacteria, *Bacillus subtilis* is widely used for enzyme production because of its high secretion capacity and environmental tolerance (Gu et al. 2018). The thermophilic strain *Bacillus subtilis* SUNGB2 was isolated from the Sungai Klah hot spring, Perak, Malaysia, where environmental temperatures range from 50°C to 110°C, and has demonstrated cellulolytic activity (Msarah, Ibrahim & Aqma 2018). However, comprehensive biochemical and kinetic characterisation of its cellulase remains limited.

pH directly influences the ionisation state of amino acid residues at the enzyme active site, affecting enzyme–substrate interactions and catalytic performance. Determination of optimum pH provides insight into functional stability under different operational conditions. In bioethanol production systems, cellulases are commonly exposed to ethanol as both a solvent and fermentation product. Organic solvents may alter enzyme conformation by disrupting hydrogen bonding and hydrophobic interactions, thereby affecting catalytic efficiency depending on solvent concentration (Bansal et al. 2012). Evaluating solvent tolerance is therefore critical for assessing enzyme applicability in industrial bioconversion processes.

In enzyme kinetics, the kinetic parameters K_M and V_{max} describe substrate affinity and maximum catalytic rate, respectively. These parameters are essential for evaluating catalytic efficiency and comparing enzyme performance across strains (Ahmad et al. 2020; Shyaula et al. 2023). However, kinetic data for cellulase from strain SUNGB2 have not yet been reported. This study aims to characterise cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 by evaluating (i) the effect of ethanol as an organic solvent, (ii) the optimum pH for enzymatic activity, and (iii) the kinetic parameters K_M and V_{max} . This characterisation provides fundamental insight into the enzyme's catalytic behaviour and its potential for biomass-based industrial applications.

2. Methods

2.1 Preparation of Vegetable waste

Vegetable waste was first rinsed with sterile distilled water and dried in a hot-air oven at 80°C for 24 hours. The dried vegetable waste was then ground into powder form and stored at room temperature until further use.

2.2 Cell Cultivation

B. subtilis SUNGB2 was cultured on growth agar containing 2.0 g/L yeast extract, 5.0 g/L peptone, 5.0 g/L sodium chloride (NaCl), and 15 g/L agar. The plates were incubated at 37°C for 24 hours or until bacterial colonies formed. A single colony was inoculated into 10.0 mL of Luria-Bertani (LB) medium containing 10.0 g/L peptone, 5.0 g/L yeast extract, and 10.0 g/L NaCl. The culture was incubated overnight at 37°C with continuous shaking at 200 rpm and stored as stock culture after incubation.

Subculturing was performed by inoculating 2.5 mL of stock culture into 1.5% (w/v) vegetable waste medium. The culture was incubated at 37°C with shaking at 200 rpm for 8 hours.

2.3 Preparation of Crude Extract

Crude cellulase extract was prepared by centrifuging the culture medium at $10,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C . The supernatant containing extracellular cellulase was stored at -20°C for further analysis.

2.4 Cellulase Purification

Partial purification of cellulase was carried out using ammonium sulfate precipitation, dialysis, freeze-drying followed by gel filtration chromatography.

2.4.1 Ammonium Sulfate Precipitation

Ammonium sulfate was gradually added to the crude enzyme extract to achieve 40 % saturation, followed by stirring using a magnetic stirrer at 4°C for 1 hour. The solution was centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C . The resulting supernatant was stored.

2.4.2 Dialysis

Dialysis was carried out using dialysis tubing (12–14 kDa) that had been pre-soaked in distilled water and 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0). The enzyme solution was dialysed against 0.05 M phosphate buffer at 4°C to remove excess ammonium sulfate.

2.4.3 Freeze-Drying

The dialysed supernatant was subjected to freeze-drying to enhance sample stability and concentration (Manusha & Roopa, 2025). The sample was first frozen at -20°C for at least 24 hours, followed by drying under vacuum conditions at -80°C for three days. The dried sample obtained was stored at -20°C until further analysis. Prior to loading into the chromatography column, the sample was suspended in 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0).

2.4.4 Gel Filtration Chromatography

The enzyme sample was further purified using a Sephadex G-75 column ($1.5 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$). The Sephadex column was first equilibrated with 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0). The dialysed enzyme sample was loaded onto the Sephadex G-75 column and eluted with the same buffer. Fractions of 2.0 mL were collected at a flow rate of 0.5–1.0 mL/min. Protein concentration in each fraction was determined by measuring absorbance at 280 nm. Enzyme activity of each fraction was determined using the cellulase enzyme assay to identify peak fractions. The elution profile of protein (280 nm) and enzyme activity (540 nm) versus fraction number was plotted. All active fractions were pooled and stored at -20°C for subsequent analysis.

2.5 Determination of Protein Concentration

Protein concentration was determined using the Bradford method (Bradford, 1976). A Bradford standard curve (OD595 against BSA concentration) was prepared using bovine serum albumin (BSA) stock solution (100 $\mu\text{g/mL}$), distilled water, and Bradford reagent. BSA solutions with various concentrations ranging from 0.0 $\mu\text{g/mL}$ to 100.0 $\mu\text{g/mL}$ were prepared by mixing 0.1 mL of BSA with 0.7 mL distilled water. Then, 0.2 mL of Bradford reagent was added to each tube and mixed gently. The tubes were left at room temperature for 5 minutes before measuring absorbance at 595 nm (OD595). A blank containing distilled water and Bradford reagent was used. All samples were prepared in duplicate. For determination of protein concentration, the 0.1 mL BSA was substituted with the crude enzyme extract. The total protein content was calculated using the Bradford standard curve.

2.6 Determination of Enzyme Activity

A glucose standard curve was prepared using 1 mg/mL glucose solution, DNS reagent, and 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0). Various glucose concentrations were prepared using volumes of 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 mL of glucose solution. Phosphate buffer was added to make the final volume 1.0 mL. Then, 1.5 mL of DNS reagent was added to each tube and incubated in boiling water for 10 minutes. The absorbance was measured at 540 nm (OD540) to construct the glucose standard curve. A blank containing DNS reagent and phosphate buffer was used. All samples were prepared in duplicate.

Cellulase activity was determined using the DNS assay with CMC as the substrate. The reaction mixture consisted of 0.5 mL enzyme sample containing 0.52 mg total protein and 0.5 mL of 1% CMC prepared in 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0). The mixture was incubated in a water bath at 50°C for 30 minutes. After incubation, 1.5 mL DNS reagent was added, and the mixture was boiled for 10 minutes (Deshavath et al. 2020). The absorbance was measured at 540 nm to determine reducing sugars produced by cellulase. Cellulase activity was calculated using the glucose standard curve. One unit (U) of cellulase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of glucose per minute at 50°C (Saravanan et al. 2012).

2.7 Effect of pH on Cellulase Enzyme Activity

To evaluate the effect of pH on cellulase activity, 0.5 mL of cellulase was mixed with 0.5 mL of 1 % CMC prepared in buffers of varying pH values. The pH range tested was 4 to 9; using 0.05 M citrate–phosphate buffer for pH 4–6, 0.05 M phosphate buffer for pH 6–8, and 0.05 M Tris–HCl buffer for pH 8–9. The reaction mixtures were then subjected to enzyme activity determination following the procedure described in Subsection 2.6.

2.8 Effect of Ethanol on Enzyme Activity

The determination of enzyme activity was carried out as described in Subsection 2.6 using the purified enzyme sample, with the addition of ethanol at final concentrations of 10, 20, 30, 40, and 50% (v/v) in the assay solution. The standard enzyme assay without ethanol was used as the positive control and was designated as 100 % relative activity.

2.9 Determination of Kinetic Parameters

The enzyme assay was performed as described in Subsection 2.6 using CMC at various concentrations, namely 2.5, 5.0, 10.0, and 12.5 mg/mL. The enzyme activity was determined at each substrate concentration, obtained from the amount of glucose produced from substrate hydrolysis at 50°C. The kinetic parameters V_{max} and K_M were further determined using the construction of a Hanes–Woolf plot, in which the x-axis represents substrate concentration [S] and the y-axis represents the ratio $[S]/v_0$.

3. Results and Discussion

3.1 Partial purification of cellulase *Bacillus subtilis* SUNGB2

The purification of cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 was carried out through several steps, beginning with ammonium sulfate precipitation, followed by dialysis, freeze-drying, and gel filtration chromatography using Sephadex G-75.

The ammonium sulfate precipitation was carried out at a saturation level of 40%. After precipitation, dialysis was performed to remove excess ammonium sulfate salts. This step was important to prevent interference with enzyme activity and to prepare the sample for further purification. The dialysed enzyme was then freeze-dried to concentrate the protein and enhance its stability before chromatographic separation. As no cryoprotectant was used during the freeze-drying process, some loss of enzyme activity may have occurred.

The purification factor obtained after the gel filtration chromatography (Sephadex G-75) step was low (0.08), while the percentage yield of the enzyme increased to 3.59% (Table 1). The decrease

in specific activity and purification factor indicates that the purification process was not successful in enriching cellulase from *B. subtilis* SUNGB2. Overall, the purification steps resulted in a loss of enzyme activity rather than an improvement in enzyme purity.

The low enzyme recovery suggests that active enzyme may have been lost during the purification process, which could be associated with factors such as enzyme instability, irreversible adsorption to the chromatography matrix, dilution during fraction collection, or incomplete recovery of active fractions. The presence of contaminating proteins may also have contributed to the relatively high total protein content and reduced specific activity. However, this could not be confirmed in the present study due to the absence of protein profile analysis such as SDS-PAGE.

Table 1. Purification table for cellulase from *B. subtilis* SUNGB2.

Purification steps	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Percentage of Recovery (%)
Crude enzyme	300	0.48	68.2	142.0	1.00	100
40% ammonium sulfate precipitation	255	0.17	2.09	12.29	0.09	3.06
Sephadex G-75 in phosphate buffer pH 8	48.0	0.23	2.45	10.65	0.08	3.59

In addition, the initially low protein content in the crude extract may be associated with the nature of cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 as an extracellular enzyme secreted into the culture medium, where it is exposed to environmental conditions that may cause denaturation, including protease activity. As a result, its concentration may be lower compared to intracellular enzymes (Cruz-Vázquez et al. 2022). Although the percentage yield increased after gel filtration, enzyme purity did not increase significantly, reflecting the tendency of cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 to remain soluble alongside other proteins and its sensitivity to activity loss during the purification process.

3.2 Effect of pH on enzyme activity

The effect of pH on cellulase activity was investigated to determine the optimum pH condition for enzymatic hydrolysis of carboxymethyl cellulose (CMC). The catalytic activity of cellulases is strongly influenced by pH, as changes in proton concentration affect the ionisation state of amino acid residues at the enzyme active site and can alter enzyme-substrate interactions. Different buffer systems were used to evaluate cellulase activity across a pH range of 4 to 9. Since each buffer system possesses distinct chemical properties and buffering capacities, the results were compared to identify the most suitable pH and buffer condition for cellulase activity.

Figure 1 shows the cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 exhibited maximum activity at pH 8.0 in phosphate buffer, which was approximately 41% higher than in Tris-HCl, indicating that phosphate buffer provides better chemical compatibility with the enzyme and CMC substrate (Zhai, Hu & Saddler 2018). This optimal pH likely ensures proper protonation of catalytic residues at the active site, facilitating efficient proton transfer during β -1,4-glycosidic bond hydrolysis and maintaining the structural conformation required for substrate binding (Bu et al. 2013). The buffering capacity of phosphate, along with stabilising ions such as K^+ , likely contributes to enhanced enzyme stability and catalytic efficiency, consistent with previous reports on *Bacillus* cellulases (Yan et al. 2011).

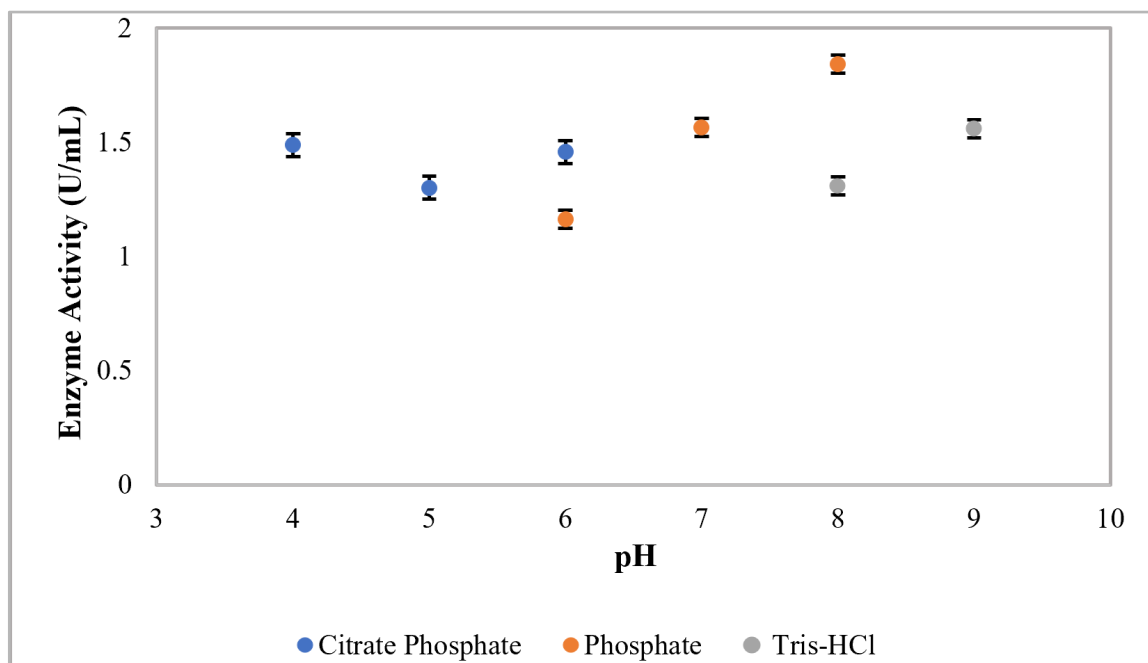


Figure 1. Effect of different pH values on the specific activity of cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 (n = 2).

Across the pH range tested (pH 4–9), cellulase activity ranged from 1.16 to 1.84 U/mL, indicating that the enzyme retained at least 63% of its maximum activity throughout the tested pH range. The highest activity (1.84 U/mL) was observed at pH 8 in the phosphate buffer, indicating optimal conditions for enzyme performance. In contrast, the lowest activity (1.16 U/mL) was recorded at pH 6 in the phosphate buffer. At the same pH, cellulase activity in citrate–phosphate buffer was approximately 12.9% higher, suggesting that buffer composition may influence enzyme–substrate interactions and help preserve the conformation of the enzyme's active site (Recoulat Angelini et al. 2022).

3.3 Effect of ethanol on enzyme activity

The effect of ethanol concentration on cellulase activity was investigated to evaluate the enzyme stability and catalytic performance in the presence of ethanol. Ethanol can influence enzyme activity by altering the protein structure, disrupting hydrophobic interactions, and affecting the solubility of the substrate, which may lead to changes in enzyme conformation and catalytic efficiency. Cellulase activity was determined in the presence of ethanol at final concentrations of 10%, 20%, 30%, 40%, and 50% (v/v), while the enzyme assay without ethanol served as the positive control and was designated as 100% relative activity. The relative enzyme activities obtained at different ethanol concentrations were compared to assess the tolerance of cellulase towards ethanol and to identify the concentration at which the enzyme retained the highest catalytic activity.

The activity of cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 was highest at 20% (v/v) ethanol, with a value of 0.17 U/mL (Figure 2). This represents an approximate 40% increase compared to the ethanol-free control (0.12 U/mL). The lowest activity was recorded at 50% ethanol (0.05 U/mL), which is about a 56% decrease compared to the ethanol-free control. The enzyme kept at least 50% of its normal activity between 10% and 40% ethanol, but at 50% ethanol the activity dropped below 50%. The increase in activity at 20% ethanol suggests that a moderate amount of ethanol may improve enzyme activity in enhancing the catalytic reaction of the enzyme towards its substrate. Similar results have been reported in other studies, where enzyme activity increases at low to moderate ethanol levels but decreases at higher concentrations due to the denaturing effect of ethanol on the protein structure (Podkaminer et al. 2012; Thomas et al. 2017; Li et al. 2013; Wang et al., 2023).

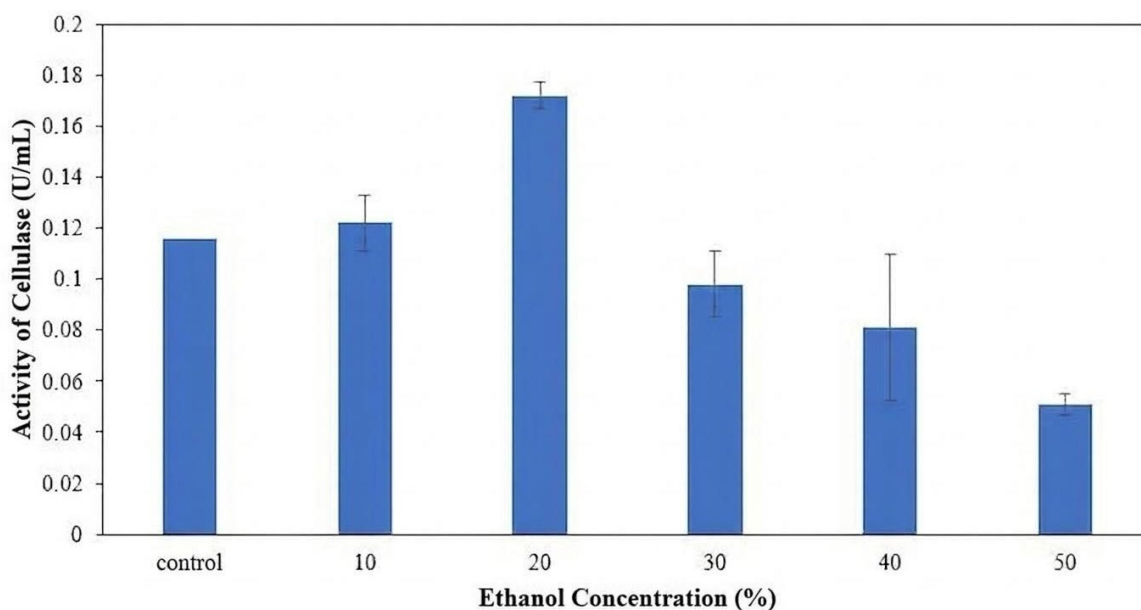


Figure 2. Effect of different ethanol concentration on the activity of cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 (n = 2).

The strong decrease in enzyme activity at 50 % ethanol is likely because high ethanol concentration can damage the enzyme structure. High ethanol concentrations are known to reduce cellulase activity in bioethanol production systems (Podkaminer et al., 2012; Xue et al., 2018; Wang et al., 2023). Interestingly, although both 10% and 20% ethanol represent relatively low ethanol concentrations, only 20% ethanol produced a marked enhancement in cellulase activity. This suggests that the stimulatory effect of ethanol is concentration-dependent rather than increasing gradually with ethanol concentration. At 10% ethanol, the amount of ethanol may have been insufficient to induce significant changes in the enzyme microenvironment or protein hydration shell that could improve substrate accessibility or catalytic efficiency. Consequently, the enzyme activity remained close to that of the control. In contrast, at 20% ethanol, the solvent concentration may have reached an optimum threshold that promoted favourable hydrophobic interactions and subtle conformational adjustments around the active site, thereby enhancing enzyme-substrate binding and catalytic turnover without disrupting the overall protein structure. Similar biphasic responses have been reported for solvent-tolerant cellulases, where moderate ethanol concentrations improve catalytic performance, whereas both lower concentrations produce negligible effects and higher concentrations destabilise the enzyme by disrupting hydrogen bonding and hydrophobic interactions (Thomas et al. 2017; Wang et al. 2023). Overall, cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 can tolerate ethanol and even works better at 20% ethanol. It also retained more than half of its normal activity up to 40% ethanol. This makes it suitable for bioethanol-related industrial processes where ethanol is present.

3.4 Determination of Kinetic Parameters

In determining the V_{max} and K_M of cellulase, CMC was selected because it is a soluble and an amorphous cellulose derivative that is easily hydrolysed by endoglucanase. Since CMC is a polymer with non-uniform molecular weight, substrate concentration was expressed in mg/mL instead of molar units. The reaction rate was determined based on the amount of glucose released from CMC hydrolysis.

The kinetic parameters were calculated using the Hanes–Woolf plot, where $[S]$ was plotted against $[S]/v_0$. Hanes–Woolf was considered the best kinetic plot as it tends to distribute the experimental error more evenly across the plot compared to Lineweaver–Burk plot (Yusuf & Al-Safi 2020). Figure 3 shows that linear regression analysis produced a V_{max} value of 7.11 U/mL and a K_M value of 0.14 mg/mL. V_{max} represents the maximum reaction rate when the enzyme is fully saturated with substrate and related to the turnover number (k_{cat}), while K_M indicates the substrate concentration required to reach half of V_{max} and reflects enzyme affinity toward the substrate. The relatively low K_M value obtained in this study suggests that cellulase from *B. subtilis* SUNGB2 has a high affinity for

CMC. Similar studies have reported different kinetic values for cellulases from other *Bacillus* species. For example, Ahmad et al. (2020) reported that cellulase from *Bacillus licheniformis* showed an optimum substrate concentration of 5 mg/mL with a K_M value of approximately 2.5 mg/mL and a V_{max} of 5.8 U/mL. Meanwhile, Kumar et al. (2018) reported a V_{max} of 6.5 U/mL and a K_M value of 0.6 mg/mL for cellulase from *Bacillus pumilus* when CMC was used as the substrate. These differences in kinetic parameters may be attributed to variations in bacterial strain, assay conditions, substrate type, temperature and pH used during the enzymatic analysis.

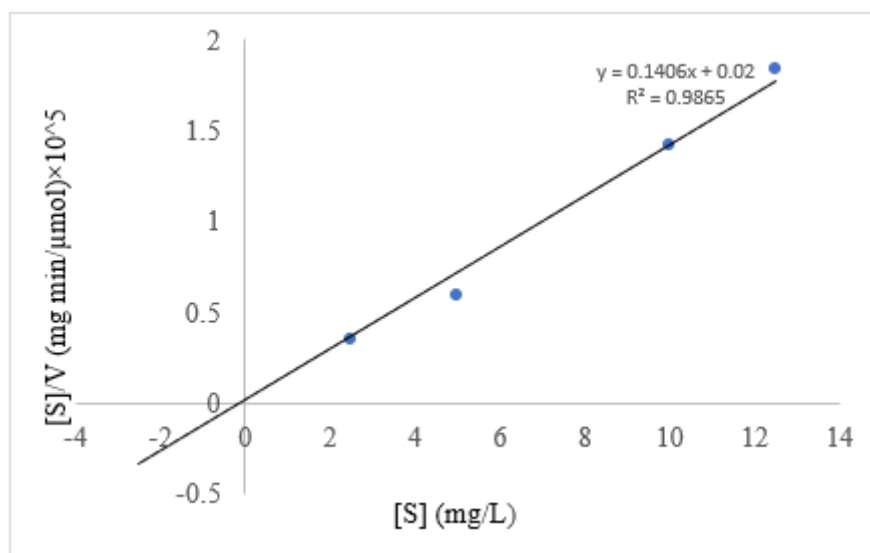


Figure 3. Hanes–Woolf plot with CMC concentrations of 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL and 12.5 mg/mL

4. Conclusion

After partial purification using ammonium sulfate precipitation followed by dialysis, freeze drying, then Sephadex G-75 gel filtration chromatography, the cellulase of *B. subtilis* SUNGB2 were purified with a purification factor of 0.09 and 0.08; percentage of recovery 3.06% and 3.59% respectively. The cellulase showed optimum activity at pH 8.0 in phosphate buffer, indicating that alkaline conditions favour its catalytic activity and suggesting its potential application in industrial processes operating under alkaline conditions. The enzyme retained at least 63% of its maximum activity across the tested pH range of pH 4–9, demonstrating its ability to maintain substantial catalytic activity over a wide pH range. For ethanol tolerance, the highest enzyme activity was recorded at 20% ethanol (0.17 U/mL), which was approximately 1.5 times higher than the control without ethanol (0.12 U/mL). The ability of the enzyme to maintain activity in the presence of ethanol suggests its potential application in bioethanol production processes. The enzyme maintained at least 50% of its activity between 10–40% ethanol but decreased to 0.05 U/mL at 50% ethanol. Kinetic analysis using the Hanes–Woolf plot produced a V_{max} value of 7.11 U/mL and a K_M value of 0.14 mg/mL, indicating a high affinity of the enzyme towards the CMC substrate.

Acknowledgements

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

References

- Ahmad, A., B. Z., & I. M. 2020. Kajian tentang kepekatan substrat optimum bagi enzim selulase daripada *Bacillus licheniformis*. *Jurnal Sains Bioteknologi*, 10(2), 123-130.
- Bansal, P., Hall, M., Realf, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. 2012. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* 30(4): 833–848.
- Bu, L., Crowley, M.F., Himmel, M.E. & Beckham, G.T. 2013. Computational investigation of the pH dependence of loop flexibility and catalytic function in glycoside hydrolases. *Journal of Biological Chemistry* 288(17): 12175–12186.
- Deshavath, N.N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V.D. & Sastri, C. V. 2020. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules* 156: 180–185.
- Gu, Y., Xu, X., Wu, Y., Niu, T., Liu, Y., Li, J., Du, G. & Liu, L. 2018. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. *Metabolic Engineering* 50: 109–121.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. & Singh, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* 2011(1): 280696.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Alam, A., Agrawal, K., Prasad, H. & Verma, P. 2018. Production, purification and characterization of an acid/alkali and thermo tolerant cellulase from *Schizophyllum commune* NAIMCC-F-03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes. *AMB Express* 8(1): 173. doi: 10.1186/s13568-018-0696-y
- Manusha C. & Roopa, B.S. 2025. Cryoconcentration: an integrated agro food processing technique for concentration. *Journal of Food Science and Technology* 62(6): 1021-1031.
- Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D. & Sharma, A.K. 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech* 6(1): 1–9.
- Msarah, M.J., Ibrahim, I. & Aqma, W.S. 2018. Isolation of Thermophilic Bacteria Producing Extracellular Enzyme From Sungai Klah Hot Spring, Malaysia. *Malaysian Applied Biology* 47(5): 269.
- Podkaminer, K. K., Guwy, A. J., & Dinsdale, R. M. 2012. Ethanol inhibition of cellulase and hemicellulase activities in lignocellulose conversion. *Biotechnology for Biofuels* 7(1): 42–53.
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M. & Fava, F. 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied microbiology and biotechnology* 99(19): 7907–7913.
- Rampelotto, P.H. 2013. Extremophiles and Extreme Environments. *Life* 2013, (3): 482– 485.
- Recoulat Angelini, A.A., Martínez Gache, S.A., Sabeckis, M.L., Melian, N.A. & González Flecha, F.L. 2022. On the role of citrate in 12-molybdophosphoric-acid methods for quantification of phosphate in the presence of ATP. *New Journal of Chemistry* 46(25): 12401–12409.
- Saravanan, P., Muthuvelayudham, R., Rajesh Kannan, R. & Viruthagiri, T. 2012. Optimization of cellulase production using *Trichoderma reesei* by RSM and comparison with genetic algorithm. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 6(4): 443–452.
- Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Dhakal, A., Koirala, D., Sijapati, J., et al. 2023. Characterisation of Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L Isolated from the Himalayan Soil. *International Journal of Microbiology* 2023:1-12. doi: 10.1155/2023/3615757
- Thomas, L., Larroche, C. & Pandey, A. 2017. Bioethanol production and ethanol tolerance by cellulolytic microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 1–1
- Wang, Y., Luo, Y., & Chen, S. 2023. Ethanol tolerance of cellulases in simultaneous saccharification and fermentation systems. *Bioresource Technology* 251: 113402 (1–9).
- Yan, H., Dai, Y., Zhang, Y., Yan, L. & Liu, D. 2011. Purification and characterization of an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus cereus*. *African Journal of Biotechnology* 10(72): 16277–16285.
- Yusof, F., & Aziz, N. A. A. 2020. Enhanced kinetic performance of CLEA-lipase extracted from skim latex of *Hevea brasiliensis* upon immobilization on magnetic iron nanoparticles. *Journal of Advanced Research in Applied Mechanics and Materials Science*. ms.1-11.

**Undergraduate Research Journal for
Biological Sciences and Biotechnology
ISSN 3120-306X**

**Effect of Processing Methods (Fresh, Roasted, and Fermented) on the
Phytochemical Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxic
Potential of *Allium sativum***

Shasvena Kaur & Fariza Juliana Nordin*

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

**E-mail of corresponding author: farizajuliana@ukm.edu.my*

Abstract: Garlic (*Allium sativum*) contains diverse phytochemicals with reported antioxidant and therapeutic properties. However, comparative data on how different processing methods influence its bioactivity remain limited. This study aimed to compare the phytochemical composition, antioxidant activity and cytotoxic potential of fresh, roasted and fermented garlic extracts prepared using 100% methanol and 50% hydroethanol. Qualitative phytochemical screening was conducted to detect major secondary metabolites, while antioxidant capacity was evaluated using total phenolic content (TPC) and DPPH assays expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). Cytotoxicity was assessed using the Sulforhodamine B assay on normal HaCaT cells and cancer cell lines MDA-MB-231 and HT-29. Fermented garlic exhibited the highest TPC for both methanolic (0.44-0.90 mg GAE/mL) and hydroethanolic extracts (0.34-0.59 mg GAE/mL). Methanolic extracts showed greater antioxidant activity (0.57-0.97 mg TEAC/mL) than 50% hydroethanolic extracts (0.40-0.54 mg TEAC/mL). All extracts were non-cytotoxic up to 100 µg/mL. These findings demonstrate that processing method and solvent type significantly influence the phytochemical profile and antioxidant capacity of garlic, supporting its potential application in functional foods and natural products research.

Keywords: *Allium sativum*; processing; antioxidant; total phenolic content; cytotoxicity

Abstrak: Bawang putih (*Allium sativum*) mengandungi pelbagai fitokimia yang dilaporkan mempunyai sifat antioksidan dan terapeutik. Walau bagaimanapun, data perbandingan mengenai kesan kaedah pemprosesan terhadap bioaktiviti bawang putih masih terhad. Kajian ini bertujuan membandingkan komposisi fitokimia, aktiviti antioksidan dan potensi sitotoksik ekstrak bawang putih segar, panggang dan difermentasi yang diekstrak menggunakan 100% metanol dan 50% hidroetanol. Saringan fitokimia kualitatif dijalankan untuk mengenal pasti metabolit sekunder utama, manakala kapasiti antioksidan dinilai melalui ujian jumlah kandungan fenolik (TPC) dan DPPH yang dinyatakan sebagai kapasiti antioksidan setara Trolox (TEAC). Ujian sitotoksik dijalankan menggunakan kaedah Sulforhodamine B terhadap sel normal HaCaT serta sel kanser MDA-MB-231 dan HT-29. Bawang putih difermentasi menunjukkan nilai TPC tertinggi bagi kedua-dua ekstrak metanol (0.44-0.90 mg GAE/mL) dan hidroetanol (0.34-0.59 mg GAE/mL). Ekstrak metanol menunjukkan aktiviti antioksidan lebih tinggi (0.57-0.97 mg TEAC/mL) berbanding 50% hidroetanol (0.40-0.54 mg TEAC/mL). Semua ekstrak tidak menunjukkan kesan sitotoksik sehingga 100 µg/mL. Dapatan ini menunjukkan bahawa kaedah pemprosesan dan jenis pelarut mempengaruhi profil fitokimia dan kapasiti antioksidan bawang putih, serta menyokong potensinya dalam pembangunan makanan berfungsi dan produk berasaskan bahan semula jadi.

Kata kunci: *Allium sativum*; pemprosesan; antioksidan; jumlah kandungan fenolik; sitotoksik

1. Introduction

Garlic (*Allium sativum* L.) is a widely cultivated herb that has long been used in culinary practices and traditional medicine worldwide. Believed to have originated in Central Asia, garlic is extensively consumed in Middle Eastern, Asian and Mediterranean cuisines. Its therapeutic properties have been attributed primarily to organosulfur compounds such as allicin, as well as other bioactive phytochemicals including phenolics, flavonoids, tannins, saponins, terpenoids and alkaloids (Al-Mamun et al. 2016). These compounds are associated with antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cardioprotective effects, contributing to garlic's relevance in health and nutrition research (Tudu et al. 2022).

However, the phytochemical composition and biological activity of garlic may be influenced by processing methods such as roasting and fermentation. Thermal treatment and controlled fermentation can alter the stability, concentration and bioavailability of bioactive constituents. In addition, solvent polarity plays a critical role in the extraction efficiency of secondary metabolites, thereby affecting the antioxidant capacity and overall bioactivity of the resulting extracts (Alide et al. 2020). Despite numerous reports on garlic bioactivity, direct comparisons between fresh, roasted and fermented garlic using standardised extraction and analytical approaches remain limited.

Therefore, this study aimed to evaluate the effects of processing methods and solvent type on the phytochemical composition, antioxidant activity and cytotoxic potential of garlic extracts. Qualitative phytochemical screening, antioxidant assays and cytotoxic evaluation were conducted to compare fresh, roasted and fermented garlic extracts. The findings are expected to clarify how processing influences garlic's bioactive profile and to support its potential application in functional foods and natural product development.

2. Materials and Methods

2.1 Sample preparation

Fresh garlic (*Allium sativum*) was purchased from a local supermarket. Fermented garlic was obtained commercially (Mesra Herbs Sdn Bhd). Roasted garlic was prepared by heating fresh garlic at 180°C for 30 minutes. All samples were peeled, crushed and stored at 4°C before extraction.

2.2 Extraction Procedure

Crushed garlic (65 g) was extracted using 100% methanol or 50% hydroethanol (v/v) at a 1:2 (w/v) ratio. Samples were macerated for 3 days at room temperature, followed by re-maceration for 1 day with fresh solvent. Extracts were pooled, filtered and concentrated using a rotary evaporator at 45°C. Concentrated extracts were air-dried to constant weight and stored at -10°C. Extraction yield (%) was calculated as:

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{Extract weight (g)}}{\text{Initial sample weight (g)}} \times 100$$

2.3 Qualitative Phytochemical Screening

Phytochemical screening was performed in duplicates (n=2). Distilled water was used as the negative control. The presence of saponins, tannins, alkaloids, terpenoids, flavonoids and fenol in all extracts were determined using method that has been previously described (Kong et al. 2019). Results were recorded based on observable colour change or precipitate formation.

2.4 Total Phenolic Content (TPC)

TPC was determined using the Folin-Ciocalteu method. Samples or gallic acid standard (50 µL) was mixed with Folin-Ciocalteu reagent and 7% sodium carbonate solution. After 2 h incubation in the dark, absorbance was measured at 765 nm. Results were expressed as mg gallic acid equivalent per mL extract (mg GAE/mL). Analyses were performed in triplicate (n=3).

2.5 DPPH Radical Scavenging Assay

Antioxidant activity was measured using the DPPH assay. Sample or Trolox standard (20 μ L) was mixed with 180 μ L DPPH solution and incubated for 30 minutes in the dark. Absorbance was measured at 517 nm. Percentage inhibition was calculated relative to the blank. The results were expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). Analyses were conducted in triplicate (n=3).

2.6 Cell culture and Cytotoxicity Assay

MDA-MB-231, HT-29 and HaCaT cells (ATCC, USA) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 5% fetal bovine serum and antibiotics at 37°C with 5% CO₂. SRB assay was carried out as previously described (Orellana et al. 2016). Briefly, cells were seeded in 96 well plates. After overnight incubation, cells were treated with various types of garlic extracts (0-100 μ g/mL) or curcumin as positive control and further incubated for additional 48 hours. Then, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and incubated at 4°C for an hour. Then, the plates were rinsed five times with tap water. Plates were stained with 0.4% SRB solution for 10 mins at room temperature. The plates were rinsed with 1% acetic acid for thrice and air dried. Then, 200 μ L of 10mM Trizma Base were added to dissolve the bound stains. Finally, the absorbance was measured using a plate reader at 490nm. All experiments were carried out in triplicates.

2.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Two-way ANOVA was used to evaluate the effects of garlic type and solvent, followed by Tukey's post hoc test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Extraction yield of Garlic Extracts

The extraction yield of fresh, roasted and fermented garlic obtained using 100% methanol or 50% hydroethanol is presented in Table 1.

Table 1. Percentage extraction yield of fresh, roasted and fermented garlic extracts in 100% methanol and 50% hydroethanol.

Sample Extracts	Extraction Yield (%) Methanol	Extraction Yield (%) 50% Hydroethanol
Fresh Garlic	18.58	21.98
Roasted Garlic	14.62	7.21
Fermented Garlic	18.58	28.83

Extraction yield ranged from 7.21 to 28.83% (w/w) depending on processing methods and solvent (Table 1). The highest yield was obtained from fermented garlic extracted with 50% hydroethanol (28.83%), whereas the lowest yield was observed for roasted garlic in 50% hydroethanol (7.21%). Methanolic extracts showed a narrower and more consistent yield range (14.62-18.58%). These findings indicate that both processing methods and solvent polarity influence extraction efficiency (Bar et al. 2022). Fermentation likely alters the plant matrix structure, increasing solvent penetration and solubilisation of extractable compounds. Conversely, roasting may reduce extractable constituents due to structural modification or degradation. Similar solvent-dependent variations in yield have been reported in previous phytochemical extraction studies.

3.2 Qualitative Phytochemical Screening of Garlic Extracts

The qualitative phytochemical profile of the garlic extracts is summarised in Table 2.

Table 2. Phytochemical screening of methanol and 50% hydroethanol garlic extracts.

Phytochemical Test/Type of Extracts		Saponin	Alkaloid	Terpenoid	Tanin	Flavonoid	Fenol
Fresh Garlic	50% Hydroethanol	-	+	+	-	-	+
	Methanol	-	+	+	-	-	+
Roasted Garlic	50% Hydroethanol	-	+	+	-	-	+
	Methanol	-	+	+	-	-	+
Fermented Garlic	50% Hydroethanol	-	+	+	-	-	+
	Methanol	-	+	-	-	-	+

Table 2 showed that alkaloids and phenolic compounds were present in all extracts, whereas terpenoids were absent in the methanolic fermented garlic extract. Saponins, tannins and flavonoids were not detected in any extract. The consistent presence of alkaloids and phenolics suggests these compounds are stable across processing conditions and soluble in both solvent systems. The absence of terpenoids in methanolic fermented garlic may reflect structural modification during fermentation or reduced detectability under qualitative testing conditions.

3.3 Total Phenolic Content (TPC) of Methanolic and 50% Hydroethanolic Garlic Extracts

Phenolics compounds are well known for their strong antioxidant properties, which enable them to scavenge free radicals and reduce oxidative damage in biological systems. The total phenolic content (TPC) is widely employed as a measure of the overall abundance of phenolic compounds in plant extracts. In this study, the TPC of methanolic (Table 3) and hydroethanolic (Table 4) extracts were prepared from fresh, roasted, and fermented garlic was evaluated and compared.

Table 3. Total Phenolic Content of Methanolic Garlic Extracts.

mg GAE/mL	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL	1.0 mg/mL
Fresh	0.31 ± 0.08 ^b	0.34 ± 0.09 ^b	0.24 ± 0.08 ^b	0.34 ± 0.02 ^b	0.35 ± 0.03 ^b
Roasted	0.15 ± 0.18 ^b	0.38 ± 0.14 ^b	0.41 ± 0.02 ^b	0.41 ± 0.11 ^b	0.49 ± 0.03 ^b
Fermented	0.44 ± 0.27 ^a	0.81 ± 0.06 ^a	0.73 ± 0.13 ^a	0.82 ± 0.20 ^a	0.90 ± 0.13 ^a

Mean (n=3) with different alphabets shows a significant difference (p < 0.001)

Table 4. Total Phenolic Content of 50% Hydroethanolic Garlic Extracts.

mg GAE/mL	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL	1.0 mg/mL
Fresh	0.06 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.06 ^b	0.10 ± 0.07 ^b	0.12 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.03 ^b
Roasted	0.20 ± 0.06 ^b	0.14 ± 0.08 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.07 ^b	0.11 ± 0.04 ^b
Fermented	0.34 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.08 ^a	0.53 ± 0.12 ^a	0.64 ± 0.03 ^a	0.59 ± 0.10 ^a

Mean (n=3) with different alphabets shows a significant difference (p < 0.001)

Total phenolic content (TPC) differed significantly among garlic types and solvent ($p < 0.001$). Fermented garlic exhibited the highest TPC in both methanolic (0.44-0.90 mg GAE/mL) and 50% hydroethanolic extracts (0.34-0.59 mg GAE/mL), followed by roasted and fresh samples. Two-way ANOVA confirmed significant effects of both processing method and solvent, with Tukey's post hoc analysis indicating that fermented garlic contained significantly higher phenolic levels than fresh and roasted forms ($p < 0.001$). Methanolic extracts consistently showed greater phenolic recovery compared to 50% hydroethanolic extracts, suggesting enhanced extraction efficiency with higher solvent polarity. The elevated TPC in fermented garlic may be due to the release of bound phenolics and the production of antioxidant metabolites during fermentation (Adebo and Medina-Miza 2020; Leonard et al. 2021), although the specific compounds responsible were not identified in the present study.

3.4 DPPH Radical Scavenging Assay of Methanolic and 50% Hydroethanolic Garlic Extracts

Garlic is known to possess strong antioxidant properties due to its sulfur-containing bioactive compounds such as allicin, diallyl sulfide and S-allyl cysteine (Lee et al. 2025). In this study, the antioxidant activity of the extracts was evaluated and expressed as TEAC values (Figure 1).

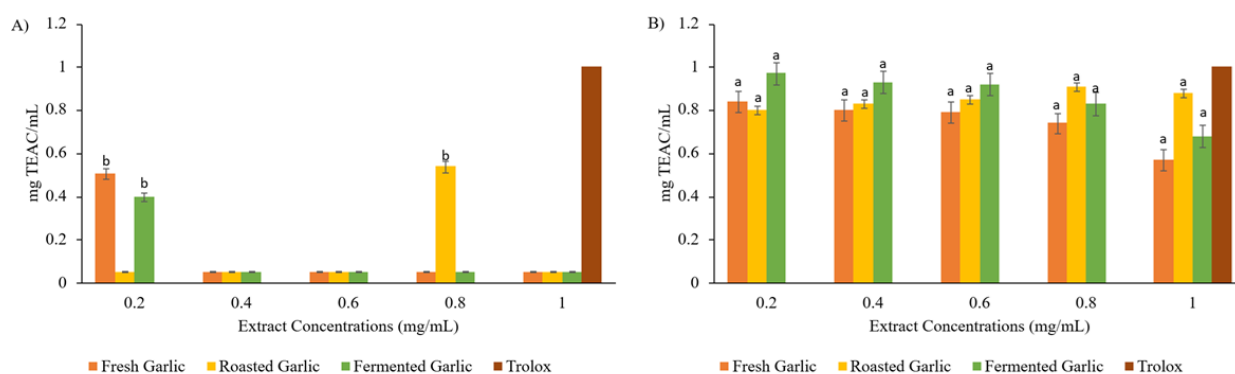


Figure 1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) of A) methanolic garlic extract, B) 50% hydroethanolic garlic extract.

Methanolic extracts exhibited significantly higher TEAC values (0.57-0.97 mg TEAC/mL) compared to 50% hydroethanolic extracts (0.40-0.54 mg TEAC/mL). Two-way ANOVA revealed a significant effect of solvent ($p < 0.001$), whereas garlic type did not significantly influence antioxidant activity ($p > 0.05$). These findings indicate that the solvent system plays a more critical role than the processing method in determining radical scavenging capacity. High antioxidant activity in the methanolic extract may be associated with its high TPC. However, other bioactive constituents may also contribute to the overall antioxidant capacity of the extract.

3.5 Cytotoxic Effects of Garlic Extracts on Normal HaCaT Cells, MDA-MB-231 and HT-29 Cancer Cells

Numerous studies have demonstrated that garlic-derived compounds exhibit cytotoxic effects against various cancer cell lines (Ghazanfari et al. 2011). Nevertheless, the extraction solvent and garlic preparation method play a crucial role in determining the type and quantity of phytochemicals extracted from the plant materials which may influence their biological activity. Therefore, evaluating cytotoxic effects of garlic extracts prepared using different solvent is important to better understand their potential as anticancer agent. In this study, various types of garlic extract showed no significant cytotoxic effects on HaCaT (Figure 2), MDA-MB-231 (Figure 3) and HT-29 (Figure 4).

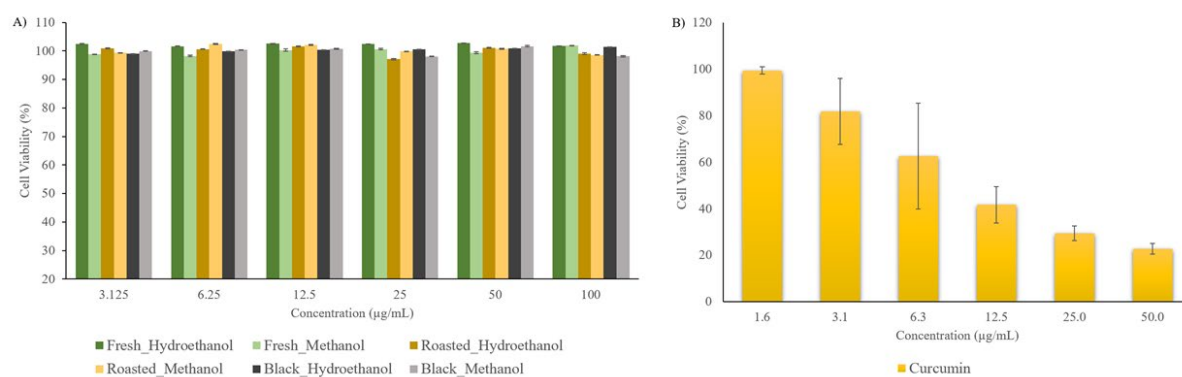


Figure 2. A) Cell viability (%) of normal HaCaT cells treated with fresh, roasted or fermented garlic prepared in methanol or 50% hydroethanol. B) Cell viability (%) of normal HaCaT cells treated with the positive control, curcumin.

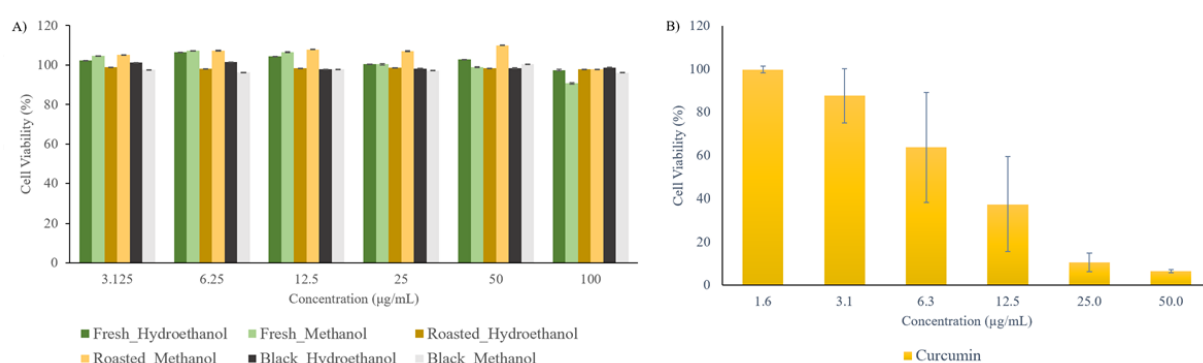


Figure 3. A) Cell viability (%) of MDA-MB-231 breast cancer cells treated with fresh, roasted or fermented garlic prepared in methanol or 50% hydroethanol. B) Cell viability (%) of MDA-MB-231 breast cancer cells treated with the positive control, curcumin.

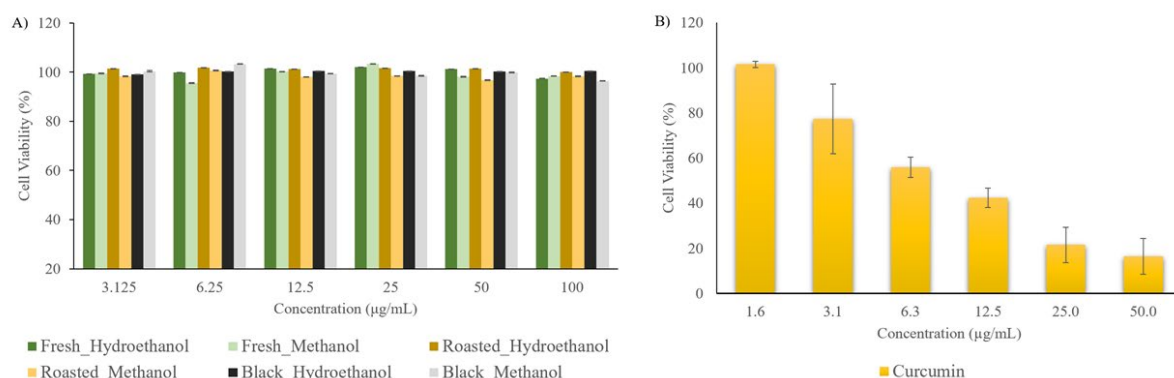


Figure 4. A) Cell viability (%) of HT-29 colorectal cancer cells treated with fresh, roasted or fermented garlic prepared in methanol or 50% hydroethanol. B) Cell viability (%) of HT-29 colorectal cancer cells treated with the positive control, curcumin.

All garlic extracts (3.125–100 µg/mL) maintained cell viability between 95-100% in HaCaT, MDA-MB-231 and HT-29 cells, with no observable dose-dependent cytotoxicity. In contrast, the positive control, curcumin, exhibited cytotoxic effects ($IC_{50} \approx 9\text{--}12$ µg/mL), confirming the validity of the assay. These findings indicate that the garlic extracts were non-cytotoxic at concentrations up to 100 µg/mL under the tested conditions. The inclusion of cancer cell lines in this study was intended to evaluate whether the extracts possess antiproliferative activity against cancer cells while simultaneously assessing their safety toward normal cells. Although no direct cytotoxic effects were observed, this does not necessarily indicate that the extracts lack of anticancer potential. Previous studies have reported that garlic extract exhibit cytotoxic effects against various cancer cell lines (Fayed et al. 2024; Njiki et al. 2025). The discrepancy between these findings and the presents study may be attributed to differences in extraction methods, phytochemical composition, and extract

concentrations. In addition, the phenolic compounds present in the garlic extracts may have been below the concentrations required to exert direct cytotoxic effects. At nutritionally relevant concentrations, these compounds were generally reported to contribute to chemoprevention by reducing oxidative stress rather than directly inducing cancer cell death (Almatroodi et al. 2019; Zhang et al. 2020).

4. Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that both processing methods and solvent type significantly influence the phytochemical composition and antioxidant activity of *Allium sativum* extracts. Methanolic extracts consistently exhibited higher total phenolic content and greater DPPH radical scavenging capacity than 50% hydroethanolic extracts, highlighting the importance of solvent polarity in phenolic recovery. Among the processing methods evaluated, fermented garlic showed the most enhanced phenolic profile, indicating that fermentation promotes the availability or formation of antioxidant-related compounds. Despite variations in phytochemical and antioxidant properties, all extracts were non-cytotoxic toward HaCaT, MDA-MB-231 and HT-29 cells at concentrations up to 100 µg/mL, suggesting a favourable safety profile under the tested conditions. Overall, these findings provide mechanistic insight into how processing modulates the bioactive potential of garlic and support the strategic use of fermentation to enhance its functional value in food and health-related applications.

Acknowledgements

This study was supported by Universiti Kebangsaan Malaysia through Geran Galakan Penyelidikan Muda (GGPM-2023-057).

References

- Adebo, O. A. & Medina-Miza, I. G. 2020. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules* 25(4): 927.
- Alide, T., Wangila, P. & Kiprop, A. 2020. Effect of cooking temperature and time on total phenolic content, total flavonoid content and total in vitro antioxidant activity of garlic. *BMC Research Notes* 13(1):1 – 7.
- Al Mamun, M., Hasan, N., Belal, H., Ul, K.M.R., Mamun, A., Karim, R.U., Islam, D., Afroz, S., Islam, A., Ara, T., Munira, S., Khan, H. & Islam, A. 2016. Investigation on phytochemical content and antioxidant activity of locally grown garlic (*Allium sativum* L.) in Bangladesh. *International Journal of Biology Research* 1(5): 37–42.
- Almatroodi, S. A., Alsahli, M. A., Almatroudi, A. & Rahmani, A. H. 2019. Garlic and its Active Compounds: A Potential Candidate in The Prevention of Cancer by Modulating Various Cell Signalling Pathways. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 19(11): 1314-1324.
- Bar, M., Binduga, U.E. & Szychowski, K.A. 2022. Methods of isolation of active substances from garlic (*Allium sativum* L.) and its impact on the composition and biological properties of garlic extraction. *Antioxidants* 11(7): 1–29.
- Fayed, A. M., S, N.H., Samy, W., Bassiouny, K., Abd-El-Aziz, A. A., Alkhafaf, D. M. R., Shareef, H. K., AbdelRahman, M., Aldhalmi, A. K., Obaida, D. S., Khalil, H. & Elbadee, A. A. 2024. Anticancer Properties of Garlic and Ginger Extract in Colon Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 25(11): 3895-3905.
- Ghazanfari, T., Yaraee, R., Rahmati, B., Hakimzadeh, H., Shams, J. & Jalali-Nadoushan, M.R. 2011. In vitro cytotoxic effect of garlic extract on malignant and nonmalignant cell lines. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 33(4): 603–608.
- Kong, H.S., Musa, K.H., Kasim, Z.M., & Sani, N.A. Qualitative and quantitative phytochemical analysis and antioxidant properties of leaves and stems of *Clinacanthus nutan* (Burm. f.) Lindau from two herbal farms of Negeri Sembilan, Malaysia. *ASM Sc J.* 2019: 12.
- Lee, S.M., Cheng, Y.T., Tsai, M.C., Chen, L.J., Pan, H.C., Lin, Y.C., Chang, C.W., Tsai, Y.C., Tsai, C.Y., Lee, W.C., & Lai, D.W. 2025. Protective role of black garlic Water extract in kidney injury induced by cisplatin in mice. *BMC Complement Med Ther* 25(1): 440
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B. & Fang, Z. 2021. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. *Biotechnology Advances* 49: 107763.
- Njiki, S., Johnson, K., Sims, J. N., Chitoh, A. M., Yedjou, C. G. Noubissi, F. K., Graham, B. & Tchounwou, P. B. 2025. Garlic Extract Triggers Cytotoxicity, DNA Damage, and Cell Cycle Arrest in Human Leukemic Cells via Oxidative Stress. *Journal of Nutrition and Food Sciences* 15(2): 67.
- Orellana, E.A. & Kalinski, A.L. (2016). Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio-protocol* 6(21): 1984.

- Tudu, C.K., Dutta, T., Ghorai, M., Biswas, P., Samanta, D., Oleksak, P., Jha, N.K., Kumar, M., Radha, Proćków, J., Pérez de la Lastra, J.M. & Dey, A. 2022. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of garlic (*Allium sativum*), a storehouse of diverse phytochemicals: A review of research from the last decade focusing on health and nutritional implications. *Frontiers in Nutrition* 9(9): 1–19.
- Zhang, Y., Liu, X., Ruan, J., Zhuang, X., Zhang, X. & Li, Z. 2020. Phytochemicals of Garlic: Promising Candidates for Cancer Therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 123: 109730.

**Undergraduate Research Journal for
Biological Sciences and Biotechnology
ISSN 3120-306X**

**Pengenalpastian Molekul dan Keupayaan Antioksidan Ekstrak Rumpai
Laut Merah *Gracilaria* spp.**

(*Molecular Identification and Antioxidant Capacity of Red Seaweed *Gracilaria* spp.
Extracts*)

**Sharmin Balqis Zahid¹, Suriyanti Su^{2,3} & Herryawan Ryadi Eziwar
Dyari^{2,3*}**

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

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

³Pusat Penyelidikan Ekosistem Marin, ALAF-UKM, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi,
Selangor, Malaysia

*E-mel pengarang koresponden: herry@ukm.edu.my

Abstrak: Rumpai laut merupakan sumber semula jadi sebatian bioaktif seperti fenolik yang berpotensi bertindak sebagai antioksidan dan memberi manfaat kesihatan. Walau bagaimanapun, maklumat mengenai kandungan fenolik keseluruhan (TPC) dan aktiviti antioksidan spesies *Gracilaria* tempatan masih terhad. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk menilai TPC dan aktiviti penyingkiran radikal bebas DPPH bagi ekstrak *Gracilaria* spp., serta menentukan kesan jenis pelarut terhadap keberkesanan pengekstrakan. Dua spesies *Gracilaria* diekstrak menggunakan etanol 96% dan metanol 96%, kemudian diuji pada kepekatan 1–5 mg/mL dengan tiga ulangan. Ekstrak etanol menunjukkan nilai TPC lebih tinggi berbanding metanol bagi kedua-dua sampel. Nilai TPC tertinggi diperoleh bagi Sampel 1 menggunakan etanol (10.47 ± 2.00 mg GAE/g), manakala terendah bagi Sampel 2 menggunakan metanol (7.32 ± 1.34 mg GAE/g). Semua ekstrak menunjukkan aktiviti DPPH yang lebih rendah berbanding asid askorbik, dengan julat penyingkiran antara 0.15% sehingga 32.09%. Walaupun aktiviti antioksidan didapati sederhana, keputusan menunjukkan potensi antioksidan *Gracilaria* bergantung kepada jenis pelarut, dengan etanol dikenal pasti lebih berkesan dalam mengekstrak sebatian bioaktif.

Kata kunci: Rumpai laut merah; *Gracilaria*; antioksidan; ujian penyingkiran radikal bebas DPPH

Abstract: Seaweed is a natural source of bioactive compounds such as phenolics that have potential antioxidant properties and health benefits. However, information regarding the total phenolic content (TPC) and antioxidant activity of local *Gracilaria* species remains limited. Therefore, this study was conducted to evaluate the TPC and DPPH free radical scavenging activity of *Gracilaria* spp. extracts, as well as to determine the effect of solvent type on extraction efficiency. Two *Gracilaria* species were extracted using 96% ethanol and 96% methanol, and the extracts were tested at concentrations of 1–5 mg/mL in triplicate. Ethanol extracts showed higher TPC values compared to methanol extracts for both samples. The highest TPC was recorded in Sample 1 extracted with ethanol (10.47 ± 2.00 mg GAE/g), while the lowest was observed in Sample 2 extracted with methanol (7.32 ± 1.34 mg GAE/g). All extracts exhibited lower DPPH scavenging activity compared to ascorbic acid, with inhibition values ranging from 0.15% to 32.09%. Although the antioxidant activity was moderate, the findings indicate that the antioxidant potential of *Gracilaria* depends on the solvent used, with ethanol identified as more effective in extracting bioactive compounds.

Keywords: Red seaweed; *Gracilaria*; antioxidant; DPPH free radical scavenging assay

1. Pendahuluan

Rumpai laut ialah makroalga marin yang kaya dengan sebatian bioaktif seperti sebatian fenolik dan flavonoid yang mempunyai aktiviti antioksidan. Antioksidan berperanan melindungi sel daripada kerosakan oksidatif yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (ROS), yang boleh merosakkan lipid, protein dan asid nukleik dan menyumbang kepada pelbagai penyakit degeneratif (Halliwell & Gutteridge 2015; Remya et al. 2022). Penggunaan antioksidan sintetik seperti BHT dan BHA telah meluas namun menimbulkan kebimbangan terhadap kesan toksik, dan ini meningkatkan minat terhadap sumber antioksidan semula jadi daripada rumpai laut yang kaya dengan metabolit sekunder (Shahidi & Zhong 2015; Princely & Dhanaraju 2017). Genus *Gracilaria* merupakan salah satu rumpai laut merah yang berpotensi sebagai sumber antioksidan semula jadi kerana kandungan sebatian bioaktifnya yang tinggi mengikut kajian terdahulu, namun maklumat mengenai kandungan fenolik dan aktiviti antioksidan spesies tempatan masih terhad (Holdt & Kraan 2011; Yuan et al. 2018). Objektif kajian ini adalah untuk menilai kandungan fenolik keseluruhan dan aktiviti antioksidan ekstrak *Gracilaria*.

2. Bahan dan Kaedah

2.1 Bahan

Sampel rumpai laut (Sampel 1 dan Sampel 2) diambil dan dicuci dengan air suling. Pemerhatian secara makroskopik dijalankan ke atas sampel terlebih dahulu. Kemudian, sampel dikeringbekukan dan ditumbuk menjadi serbuk halus menggunakan lesung. Serbuk yang terhasil disimpan pada suhu -20°C sehingga digunakan untuk analisis selanjutnya.

2.2 Pemerhatian Morfologi Rumpai Laut

Ciri morfologi yang diperhatikan merangkumi warna, bentuk dan struktur talus, jenis percabangan, dan tekstur permukaan. Panjang dan lebar talus diukur dan direkodkan. Spesies *Gracilaria* dikenal pasti berdasarkan penerangan taksonomi oleh Ahmad Ismail (2016) dan Gurgel et al. (2004).

2.3 Pengekstrakan DNA *Gracilaria*

2.3.1 Kaedah CTAB

DNA diekstrak menggunakan kaedah CTAB daripada OPS Diagnostics (2010). Kualiti dan kepekatan DNA dianalisis menggunakan gel agarosa 1% pada 90 Volt selama 1 jam bersama penanda BioLabs 1 kb, dan bacaan spektrofotometer Nanodrop pada penyerapan 260/280 nm.

2.3.2 Kaedah PCR secara langsung (Direct PCR)

Sebanyak 100 mg serbuk halus rumpai laut dipindahkan ke dalam tiub mikroempar, diikuti dengan penambahan 500 μL penampakan CTAB ke dalam tiub. Campuran tersebut divorteks sehingga homogen. Kemudian, tiub diinkubasi dalam rendaman air bersuhu 90°C selama 30 minit. Supernatan yang terhasil dipindahkan ke dalam tiub mikroempar 1.5 ml yang baharu. DNA ini kemudiannya digunakan untuk tindak balas PCR.

2.4 Tindak Balas Berantai Polimerase (PCR) dan

Tindak balas dijalankan bagi mengamplifikasi gen *coxI* dengan menggunakan primer GazF1 (5'-TCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') dan GazR1 (5'-ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA-3'). Jumlah isipadu PCR adalah sebanyak 25 μL yang mengandungi 14 μL air suling, 2 μL template DNA bagi setiap sampel, 5 μL penimbal PCR bersama Mg^{++} (10 mM), 2 μL dNTPs (2.5 mM), 0.75 μL bagi setiap primer (10 mM), 0.25 μL BSA (10 mM), dan 0.25 μL Taq DNA (500 unit). Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi adalah seperti Jadual 1. Hasil PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% pada 90V selama 1 jam bersama penanda GeneDireX 100 bp. Produk dihantar ke Apical Scientific Sdn. Bhd. untuk proses penjujukan DNA.

Jadual 1. Program tindak balas berantai polimerase (PCR).

Langkah	Suhu (°C)	Tempoh (s)
Denaturasi	94	60
Penyepuhlindapan	52-48	10 kitaran
Pemanjangan	72	
Denaturasi	94	
Penyepuhlindapan	50	15 kitaran
Pemanjangan	72	
Pemanjangan akhir	72	
		300

2.5 Analisa Filogenetik

Jujukan DNA yang diperoleh dibandingkan menggunakan BLASTn dengan pangkalan data GenBank NCBI. Jujukan diselaraskan secara manual menggunakan BioEdit Sequence Alignment Editor, dengan nukleotida berpasangan diijarkan menggunakan penjajaran GLOBAL optimum. Pokok filogenetik dijana menggunakan perisian MEGA12 bagi menilai hubungan antara organisma, manakala analisis statistik dijalankan menggunakan kaedah Maximum Likelihood dan Maximum Parsimony dengan 1,000 ulangan bootstrap.

2.6 Penyediaan Ekstrak Kasar Rumpai Laut

Sebanyak 1 g serbuk rumpai laut diekstrak secara maserasi menggunakan 25 mL metanol 96% dan etanol 96% selama 24 jam (ulang ekstraksi 12 jam), dituras dan dipekatkan dengan penyejat vakum berputar. Peratus hasil dikira, dan ekstrak disimpan pada -20°C sebelum disediakan pada kepekatan 1, 3 dan 5 mg/mL.

2.7 Penentuan Kandungan Fenolik Keseluruhan (TPC)

Eksperimen dijalankan menggunakan kaedah Folin–Ciocalteu oleh Yap et al (2019). dengan sedikit pengubahsuaian di mana isipadu reagen dibahagi kepada dua untuk menyesuaikan kepada sistem plat mikro. Kapasiti penurunan Folin–Ciocalteu ditentukan berdasarkan lengkung piawai asid galik pada kepekatan 0.005-0.500 mg/mL, dan keputusan dinyatakan sebagai miligram asid galik per gram sampel (mg GAE/g). Semua analisis dijalankan dalam tiga ulangan.

2.8 Penentuan Aktiviti Penyingkiran Radikal Bebas (DPPH)

Ujian dijalankan dalam mikropelat 96-telaga steril dan di bawah keadaan gelap. Sebanyak 5 μL larutan ekstrak pada kepekatan berbeza (1, 3, 5 mg/ml) dicampurkan ke dalam mikropelat dan ditambahkan dengan 195 μL larutan DPPH (0.15 mM) yang telah disediakan. Campuran diinkubasi selama 30 minit dalam keadaan gelap. Selepas inkubasi, serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Asid askorbik digunakan sebagai kawalan positif. Setiap analisis dijalankan dalam tiga kali ulangan. Aktiviti penyingkiran radikal DPPH dinyatakan sebagai peratusan penyingkiran radikal.

2.9 Analisa Statistik

Semua data yang dikumpul adalah dalam tiga ulangan bagi kandungan fenolik keseluruhan dan aktiviti penyingkiran radikal DPPH. Keputusan dibentangkan sebagai nilai min $\pm$ sisihan piawai. Keputusan dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA) sehala, diikuti oleh ujian pasca-hoc (Tukey) dengan menggunakan Minitab bagi menentukan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara ekstrak.

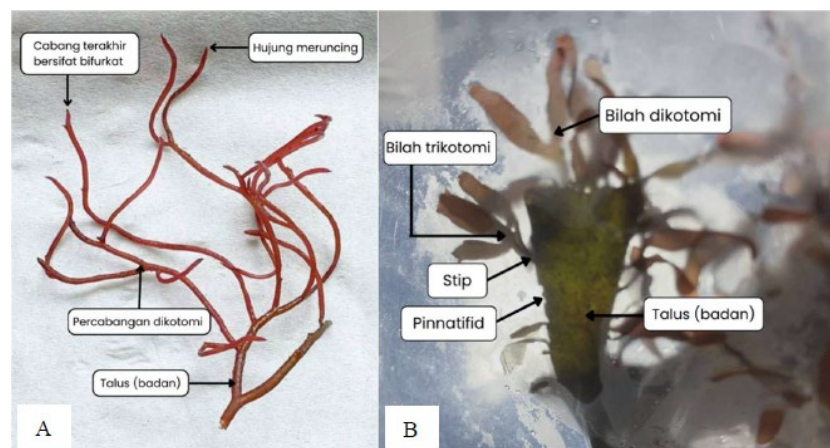
3. Hasil dan Pembincangan

3.1 Pemerhatian Morfologi Rumpai Laut

Ringkasan pemerhatian morfologi dilaporkan dalam Rajah 1 berdasarkan penerangan taksonomi oleh Ahmad Ismail (2016) dan Gurgel et al. (2004). Pengenalpastian morfologi dalam genus ini mencabar kerana keplastikan morfologi yang tinggi dan kewujudan spesies kriptik.

Sampel 1 menunjukkan talus tegak yang tumbuh secara sespitos membentuk rumpun rimbun, berwarna perang kemerahan dan boleh mencapai ketinggian sehingga 14 cm. Talus berbentuk silinder (teret) dengan percabangan dikotomi dan divarikat, serta mempunyai hujung cabang yang meruncing. Struktur permukaan adalah tidak rata tetapi konsisten, dan talus melekat pada substrat melalui cakera pelekap yang menghasilkan beberapa paksi utama.

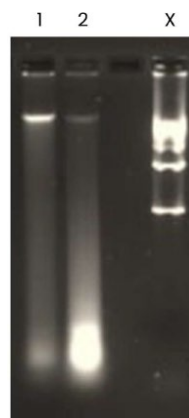
Sampel 2 pula mempunyai talus tegak yang juga bersifat sespitos tetapi lebih berserabut dan membentuk rumpun padat, berwarna hijau kelabu gelap dengan ketinggian sehingga 10 cm. Talus terdiri daripada paksi merayap yang membentuk bilah leper berbentuk lanseolat, dengan percabangan tidak teratur sama ada berselang-seli, bertentangan, serta dikotomi atau trikotomi. Lekatan pada substrat diperkuatkan oleh rizoid berbentuk pasak yang berkembang daripada paksi merayap.



Rajah 1. Pemerhatian morfologi Sampel 1 (A) dan Sampel 2 (B).

3.2 Pengekstrakan DNA

Rajah 2 menunjukkan hasil pengekstrakan DNA manakala Jadual 2 menunjukkan hasil keseluruhan bacaan spektrofotometer Nanodrop bagi setiap sampel. Hasil yang diperoleh bagi pengekstrakan DNA menunjukkan genomik DNA berukuran molekul tinggi, namun terdapat lumuran (smear), menunjukkan sebahagian daripada DNA mengalami degradasi atau kehadiran RNA.



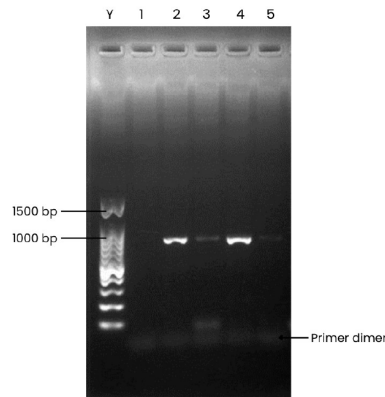
Rajah 2. Pengekstrakan genom DNA daripada sampel rumpai laut. 1: Sampel 1; 2: Sampel 2; X: Penanda 1kb.

Jadual 2. Hasil keseluruhan bacaan spektrofotometer Nanodrop.

Sampel	Kepekatan (ng/ul)	A260	A280	260/280	260/230
1	206	4.120	2.384	1.73	3.35
2	135.9	2.718	1.326	1.326	1.46

3.3 Tindak Balas Berantai Polimerase PCR

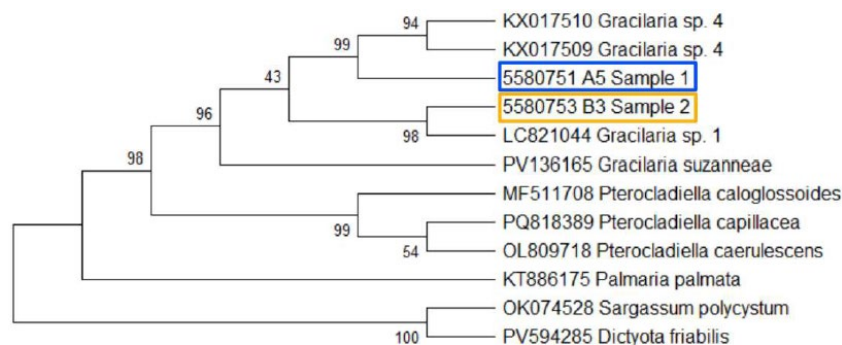
Amplifikasi dijalankan dengan kawalan negatif bagi memeriksa kehadiran bahan pencemar di dalam campuran master. Berdasarkan Rajah 3, tiada jalur pada kawalan negatif namun terdapat jalur samar di bawah 100 bp menunjukkan pembentukan primer dimer. Hasil PCR dengan jalur DNA spesifik yang jelas menandakan amplifikasi berjaya membolehkan pengesahan DNA sasaran untuk penjujukan.



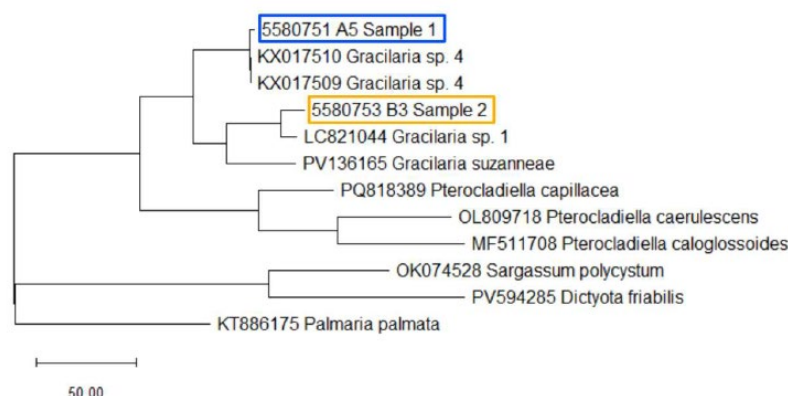
Rajah 3. Hasil elektroforesis pengestrakan DNA daripada sampel rumput laut. Lajur Y: Penanda 100 bp; Lajur 1: Kawalan negatif; Lajur 2: Sampel 1 (Kaedah CTAB); Lajur 3: Sampel 2 (Kaedah CTAB); Lajur 4: Sampel 1 (Kaedah Direct PCR); Lajur 5: Sampel 2 (Kaedah Direct PCR).

3.4 Analisa Filogenetik

Analisis filogenetik bagi kedua-dua sampel telah dijalankan menggunakan kaedah Maximum Likelihood (ML) dan Maximum Parsimony (MP), seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4 dan Rajah 5. Pokok-pokok ini menunjukkan hubungan evolusi antara sampel kajian dan spesies lain dalam genus *Gracilaria*. Kedua-dua pokok filogeni (ML dan MP) menunjukkan bahawa sampel kajian berada dalam klad yang sama dengan spesies dalam genus *Gracilaria*, dengan nilai sokongan bootstrap yang tinggi iaitu 94% dan 98%.



Rajah 4. Pokok filogeni menggunakan kaedah Maximum Likelihood.



Rajah 5. Pokok filogeni menggunakan kaedah Maximum Parsimony.

3.5 Hasil Ekstrak Kasar Sampel

Jadual 3 menunjukkan peratus hasil ekstrak kasar bagi dua spesies rumpai laut dalam genus *Gracilaria* yang diekstrak menggunakan pelarut etanol dan metanol. Bagi Sampel 1, peratus hasil ekstrak etanol (9.7%) adalah lebih tinggi berbanding ekstrak metanol (7.9%), manakala bagi Sampel 2, peratus hasil ekstrak metanol (1.9%) adalah sedikit lebih tinggi berbanding ekstrak etanol (1.8%). Secara keseluruhan, Sampel 1 mencatatkan peratus hasil ekstrak kasar yang jauh lebih tinggi berbanding Sampel 2 bagi kedua-dua pelarut. Walau bagaimanapun, corak perbezaan yang diperhatikan berkemungkinan disebabkan oleh variasi biologi dan komposisi kimia, termasuk spesies, kematangan tisu dan kandungan metabolit sekunder.

Komposisi bioaktif rumpai laut dipengaruhi oleh faktor persekitaran seperti cahaya, suhu, saliniti dan nutrien, yang seterusnya mempengaruhi jumlah sebatian larut yang diekstrak dan nilai hasil ekstrak kasar (Lomartire et al. 2021; Kim et al. 2023; Brix da Costa et al. 2025).

Selain itu, penggunaan campuran pelarut seperti alkohol:air meningkatkan kecekapan pengekstrakan kerana kepolaran yang sesuai membolehkan lebih banyak sebatian fenolik diekstrak, seperti yang dilaporkan bagi ekstrak metanol 75% *Gracilaria sp.* (Kim et al. 2023).

Jadual 3. Peratus hasil ekstrak kasar bagi setiap sampel.

Sampel	Pelarut	Berat ekstrak diperoleh (g)	Peratus hasil (%)
1	Etanol	0.097	9.7
	Metanol	0.079	7.9
2	Etanol	0.018	1.8
	Metanol	0.019	1.9

3.6 Penentuan Kandungan Fenolik Keseluruhan (TPC)

Secara keseluruhan, nilai TPC bagi semua ekstrak berada dalam julat 7.32 hingga 10.47 mg GAE/g ekstrak, seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 4. Bagi Sampel 1, ekstrak etanol menunjukkan TPC lebih tinggi (10.47 ± 2.00 mg GAE/g) berbanding metanol (8.84 ± 0.33 mg GAE/g). Bagi Sampel 2, nilai TPC juga lebih tinggi untuk etanol (9.34 ± 0.66) berbanding metanol (7.32 ± 1.34 mg GAE/g). Walau bagaimanapun, analisis varians sehala (ANOVA) menunjukkan tiada perbezaan signifikan antara kumpulan ekstrak pada aras $p < 0.05$. Oleh itu, ujian pasca-hoc Tukey tidak diteruskan.

Nilai TPC yang diperoleh menunjukkan ekstrak *Gracilaria* mempunyai kandungan sebatian fenolik pada tahap sederhana. Kajian terdahulu melaporkan bahawa jenis pelarut mempengaruhi nilai TPC (Kim et al. 2023; Chan, Matanjun & Tan 2014). Parameter pengekstrakan turut mempengaruhi hasil TPC dan aktiviti antioksidan, menyebabkan variasi kecil antara pelarut bergantung kepada matriks sampel dan keadaan ekstraksi (Reboleira et al. 2020).

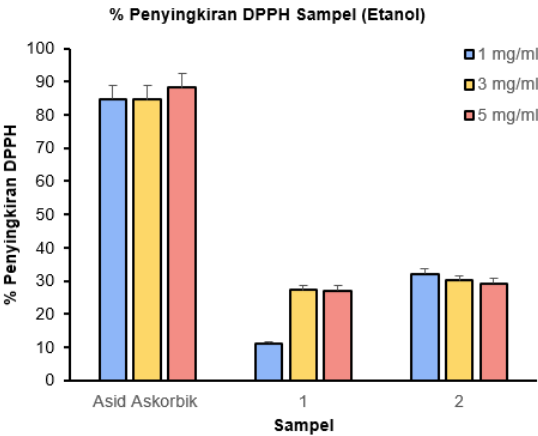
Jadual 4. Nilai TPC bagi setiap sampel dalam pelarut yang berbeza.

Sampel	Pelarut	TPC (mg GAE/g)
1	Etanol	10.47 ± 2.00^a
	Metanol	8.84 ± 0.33^a
2	Etanol	9.34 ± 0.66^a
	Metanol	7.32 ± 1.34^a

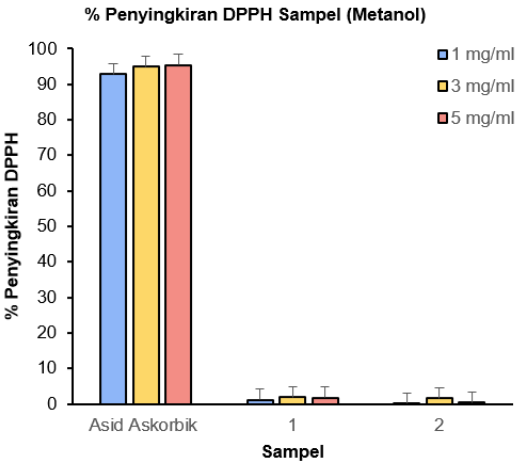
3.7 Penentuan Aktiviti Penyingkiran Radikal Bebas (DPPH)

Ekstrak etanol bagi kedua-dua sampel *Gracilaria* menunjukkan peratus penyingkiran radikal DPPH lebih tinggi berbanding metanol, dengan Sampel 2 mencatatkan aktiviti tertinggi (32.09% pada 1 mg/mL), seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 6 dan Rajah 7. Namun, tiada perbezaan signifikan antara kumpulan berdasarkan ujian ANOVA.

Kajian terdahulu melaporkan bahawa jenis pelarut mempengaruhi aktiviti antioksidan, di mana etanol sering menunjukkan aktiviti DPPH lebih tinggi berbanding pelarut lain, walaupun keberkesanannya bergantung kepada spesies dan komposisi fitokimia (Chan et al. 2014; Sornalakshmi, Tresina & Jeba Ananthi 2024; Salunke, Wakte & Wakure 2021).



Rajah 6. Peratus penyingkiran DPPH bagi setiap sampel dalam etanol (n=3).



Rajah 7. Peratus penyingkiran DPPH bagi setiap sampel dalam metanol (n=3).

4. Kesimpulan

Kajian ini berjaya mencapai kesemua objektif yang ditetapkan melalui kaedah dan analisis data ujian, dan membuktikan potensi sampel kajian berdasarkan keputusan ujian yang dijalankan. Pengenalpastian spesies berjaya dijalankan sehingga peringkat genus melalui analisis filogenetik yang menunjukkan hubungan evolusi yang jelas antara sampel kajian dan spesies lain dalam genus *Gracilaria*. Hasil kajian menunjukkan bahawa ekstrak etanol dapat mengekstrak kandungan fenolik keseluruhan yang lebih tinggi berbanding metanol bagi kedua-dua sampel.

Selain itu, ekstrak *Gracilaria* mencatatkan nilai peratus penyingkiran radikal DPPH yang lebih rendah dalam julat kepekatan 1–5mg/mL, dengan aktiviti antioksidan etanol lebih tinggi berbanding metanol untuk kedua-dua sampel. Metanol bersifat sangat polar, justeru secara umumnya lebih berkesan mengekstrak sebatian bioaktif dan sering dikaitkan dengan aktiviti antioksidan yang tinggi secara *in vitro*.

Sebaliknya, etanol bersifat separa polar, membolehkannya mengekstrak julat sebatian yang lebih luas merangkumi sebatian polar dan separa polar. Walaupun aktiviti antioksidan bagi sampel dalam etanol sering lebih rendah berbanding metanol dalam sesetengah kajian, etanol sering menjadi pelarut dominan dalam aplikasi makanan, farmaseutikal dan kosmetik kerana tahap ketoksikannya yang lebih rendah serta lebih selamat untuk kegunaan manusia.

Hasil kajian ini menunjukkan bahawa *Gracilaria* mengandungi sebatian fenolik yang mampu menyumbang kepada aktiviti antioksidan dan menyediakan pengetahuan asas untuk kajian lanjutan.

Penghargaan

Setinggi-tinggi penghargaan kepada pihak kakitangan Universiti Kebangsaan Malaysia, Fakulti Sains dan Teknologi, serta Institut Biologi Sistem (INBIOSIS) di atas penggunaan peralatan.

Rujukan

- Ahmad I. 2016. Rumpai Laut Malaysia. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka.
- Brix da Costa, B., Kunzmann, A. & Springer, K. 2025. Comparative analysis of the nutritional profiles of five edible macroalgae as sustainable food sources. *Discover Food* 5(1).
- Chan, P.T., Matanjun, P., Yasir, S.M. & Tan, T.S. 2014. Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology* 27(6): 2377–2386.
- Gurgel, C. F. D., Fredericq, S., & Norris, J. N. 2004. Molecular systematics and taxonomy of flattened species of *Gracilaria* Greville (Gracilariaceae, Gracilariales, Rhodophyta) from the Western Atlantic. *Taxonomy of Economic Seaweeds with reference to the Pacific and other locations* 9: 159-200.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine. Edisi ke-5. Oxford University Press: Oxford.
- Holdt, S.L. & Kraan, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23(3): 543–597.
- Kim, J.-S., Choi, C. & Lee, H.-H. 2023. Changes in the biological activities of *Gracilaria verrucosa* extracted using different extraction solvents. *Applied Sciences* 13(22): 12314–12314.
- OPS Diagnostics. 2010. CTAB Protocol for the Isolation of DNA from Plant Tissues. https://opsdiagnostics.com/notes/protocols/ctab_protocol_for_plants.htm. 14 Ogos 2025]
- Princely, S. & Dhanaraju, M. 2017. Assessment of phytochemical constituents, in vitro antimicrobial and antioxidant potential of Ulva Extracts from Vishakhapatnam Coast. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(8): 87.
- Salunke M. A., Wakte P. S. & Wakure B. S. 2021. An assessment of anti-oxidant activity of marine algal polyphenols retrieved from Sargassum wightii, Turbinaria ornata, *Gracilaria corticata* and Gelidiella acerosa. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 12(9): 4964-4971.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. 2015. Measurement of Antioxidant Activity. *Journal of Functional Foods* 18(1756-4646): 757–781.
- Yap, W.-F., Tay, V., Tan, S.-H., Yow, Y.-Y. & Chew, J. 2019. Decoding Antioxidant and Antibacterial Potentials of Malaysian Green Seaweeds: Caulerpa racemosa and Caulerpa lentillifera. *Antibiotics* 8(3): 152.
- Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y. & Zhang, C. 2018. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. *Food Research International* 113: 288–297.

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 $\text{C}14$ or $\text{P}32$), 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

Editor-in-Chief

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**