

BAB 2
KAJIAN
ANTIBAKTERIA

BAB 2 : KAJIAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA

2.1 . PENGENALAN

2.1.1 Tumbuhan sebagai sumber bahan antibakteria

Tumbuhan merupakan sumber kepada bahan dadah yang digunakan dalam bidang perubatan untuk merawat pelbagai jenis penyakit. Ini menunjukkan betapa besarnya sumbangan oleh tumbuhan dalam bidang perubatan saintifik. Dianggarkan terdapat 25.00.0, 000 spesies tumbuhan Angiosperma di dunia dan sejumlah kecil sahaja daripada spesies tumbuhan ini telah dikenalpasti secara farmakologi sebagai tumbuhan yang berguna dari segi perubatan (Goh *et al.*, 1993). WHO juga telah menekankan betapa pentingnya kajian dilakukan terhadap tumbuhan ubatan herba selaras dengan keperluan perubatan (Farnsworth dan Soejarto, 1991).

Tumbuhan telah lama digunakan secara tradisional sebagai penawar untuk mengubati penyakit yang disebabkan oleh bakteria dan juga untuk menghalang pertumbuhan bakteria. Sebahagian daripada tumbuhan ini telah diuji keberkesannya secara saintifik yang membuktikan keberkesanan penggunaannya sebagai ubat tradisional (Ahmad dan Raji, 1993; Goh *et al.*, 1994). Banyak kajian telah dijalankan untuk mengenalpasti komponen-komponen yang terdapat pada tumbuh-tumbuhan agar ia dapat digunakan dalam industri perubatan.

Di Malaysia kaedah perubatan tradisional menggunakan tumbuhan herba merupakan asas terhadap perubatan pelbagai penyakit fisiologi. Walaupun terdapat laporan mengenai kajian aktiviti antibakteria daripada ekstrak tumbuhan (Nadkarni, 1908; Dhar *et al.*, 1968) tetapi kajian ini tidak dibuat secara sistematik kecuali dalam beberapa kes, oleh itu kekeliruan dalam membuat kesimpulan tertentu berlaku (Padmaja *et al.*, 1993; Ndamba *et al.*, 1994; Vijaya *et al.*, 1995). Penggunaan ubatan secara tradisional di Malaysia amat meluas dan kebanyakan penduduk di kawasan pedalaman bergantung kepadanya. Keadaan ini boleh dikaitkan dengan beberapa faktor seperti kekurangan doktor di kawasan pedalaman dan kadar bayaran yang dikenakan oleh klinik swasta adalah tinggi. Banyak kegunaan tumbuhan herba dari famili Zingiberaceae telah diketahui dan dibukukan, tetapi hanya sebahagian daripada spesies-spesies ini sahaja yang telah diuji aktivitiya secara biologi. Di antara genus-genus famili Zingiberaceae yang sering digunakan sebagai tumbuhan ubatan ialah *Alpinia*, *Amomum*, *Curcuma*, *Kaempferia* dan *Zingiber*, di mana spesies-spesies daripada genus ini merupakan bahan utama dalam pembuatan tonik atau pun jamu secara tradisional. Tumbuhan yang sering digunakan oleh masyarakat Melayu di Malaysia sebagai penawar dan penghalang jangkitan yang disebabkan oleh mikroorganisma diringkaskan dalam jadual 5.

Walaupun terdapat beberapa laporan terhadap kandungan tumbuhan Zingiberaceae di Malaysia namun kebanyakan kajian yang dilakukan tidak melaporkan tentang kajian aktiviti biologi daripada ekstrak-ekstrak krud atau pun komponen-komponen yang dipencilkan (Sirat, 1994; Sirat dan Nordin, 1994; Sirat dan Liamen, 1995; Sirat dan Nordin, 1995; Sirat *et al.*, 1994; Jamil dan Sirat, 1996; Sirat *et al.*,

1996). Laporan yang biasa ditemui ialah mengenai cara-cara penyediaan ubatan tradisional ini telah dilaporkan lebih awal (Manandhar, 1985, 1986, 1987, 1989a,b,c, 1990a,b; Bhatteai, 1993; Shrestha and Joshi, 1993), walau hanya sedikit sahaja spesies yang telah dikaji tentang aktiviti biologinya (Bhakuni *et al.*, 1969).

Kemajuan teknologi dalam bidang fitokimia dan farmakologi telah menghasilkan banyak kajian tentang keberkesanan spesies-spesies *Curcuma* sebagai bahan ubat untuk penyakit-penyakit tertentu. Kehadiran metabolit-metabolit sekunder seperti alkaloid, fenolik dan saponin telah banyak dilaporkan. Spesies-spesies ini juga kaya dengan sineol, geraniol, sitral, kamfor dan lain-lain lagi. Kajian mengenai antibakteria, antifungal dan antiinflamasi juga telah dilaporkan untuk spesies *Curcuma domestica*.

Bakteria boleh mendatangkan penyakit kepada tumbuhan, haiwan dan manusia. Jadual 6 menunjukkan penyakit yang disebabkan oleh bakteria yang patogenik terhadap manusia (Singleton dan Sainsbury 1981). Bahan antibakteria ini merencat pembahagian sel dalam mikroorganisma dengan pelbagai cara, di antaranya ialah dengan mengganggu asid paminobenzoik yang merupakan kofaktor dalam sintesis asid folik, mengganggu sintesis protein dalam bakteria, menyerang membran sitoplasmik dengan mengubahsuai struktur lipoprotein dan menghalang pembentukan dinding sel baru semasa pembahagian sel dengan menyekat pengeluaran enzim transpeptidase yang mengawal sintesisnya (Oliver, 1986).

Jadual 5: Tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat Melayu sebagai ubatan tradisional untuk aktiviti antimikrob (Ahmad dan Raji, 1993; Goh *et al.*, 1994).

Spesies (Famili) & nama tempatan	Tujuan	Bahagian yang digunakan
<i>Acorus calamus</i> (Araceae) Jerangau, Jerangau, Dlingo, Dringo	Antibakteria Antiseptik	Batang
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae) Bawang putih	Antiseptik	Bawang / 'bulbs'
<i>Aloe vera</i> (Liliaceae) Lidah buaya	Antibiotik	Daun
<i>Andrographis paniculata</i> (Acanthaceae) Hempedu bumi	Antibakteria Antimikrob	Daun
<i>Areca catechu</i> (Palmae) Pinang	Antifungal	Buah
<i>Averrhoa bilimbi</i> (Oxalidaceae) Belimbing buluh	Antimikrob	Daun
<i>Averrhoa carambola</i> (Oxalidaceae) Belimbing besi	Antimikrob	Daun
<i>Brucea javanica</i> (Simarubaceae) Lada pahit	Antifungal	Daun
<i>Caesalpinia sappan</i> (Leguminosae) Sepang	Antibakteria	Kulit batang
<i>Capsicum frutescens</i> (Solanaceae) Cili padi	Antifungal	Buah masak
<i>Carica papaya</i> (Caricaceae) Betik	Antifungal Antibiotik	Getah
<i>Cassia alata</i> (Leguminosae) Gelengang besar	Antifungal	Daun
<i>Cassia tora</i> (Leguminosae) Gelengang kecil	Antifungal	Daun
<i>Centella asiatica</i> (Umbelliferae) Pegaga	Antifungal	Daun

Sambungan jadual 5: Tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat Melayu sebagai ubatan tradisional untuk aktiviti antimikrob (Ahmad dan Raji, 1993; Goh *et al.*, 1994).

Spesies (Famili) & nama tempatan	Tujuan	Bahagian yang digunakan
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Lauraceae) Kayu manis	Antiseptik	Kulit batang
<i>Cocos nucifera</i> (Palmae) Kelapa	Antiseptik	Air kelapa muda
<i>Coleus blumei</i> (Labiatae) Ati-ati	Antiseptik	Daun
<i>Curcuma domestica</i> (Zingiberaceae) Kunyit makan	Antibakteria	Rizom
<i>Elephantopus scaber</i> (Compositae) Tutup bumi, Tapak sulaiman	Antiseptik	Seluruh tumbuhan
<i>Eleusine indica</i> (Graminae) Rumput sambau	Antimikrob	Daun
<i>Euphorbia hirta</i> (Euphorbiaceae) Ara tanah	Antifungal	Getah
<i>Euphorbia neriifolia</i> (Euphorbiaceae) Sudu-sudu	Antifungal	Batang
<i>Impatiens balsamina</i> (Balsaminaceae) Keembung	Antiseptik	Seluruh tumbuhan
<i>Jatropha curcas</i> (Euphorbiaceae) Jarak belanda	Antifungal	Daun
<i>Kalanchoe pinnata</i> (Crassulaceae) Sedingin	Antibakteria	Daun
<i>Languas galanga</i> / <i>Alpinia galanga</i> (Zingiberaceae) Lengkuas	Antifungal	Rizom
<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae) Mangga	Antifungal	Getah
<i>Melastomata malabathricum</i> (Melastomataceae) Senduduk	Antiseptik	Seluruh tumbuhan

Sambungan jadual 5: Tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat Melayu sebagai ubatan tradisional untuk aktiviti antimikrob (Ahmad dan Raji, 1993; Goh *et al.*, 1994).

Spesies (Famili) & nama tempatan	Tujuan	Bahagian yang digunakan
<i>Mimosa pudica</i> (Leguminosae) Semalu	Antiseptik	Akar
<i>Momordica pudica</i> (Leguminosae) Peria	Antimikrob	Daun
<i>Morinda citrifolia</i> (Rubiaceae) Mengkudu	Antiseptik	Buah
<i>Musa paradisiaca</i> (Musaceae) Pisang	Antifungal	Akar
<i>Nelumbo nucifera</i> (Nymphaeaceae) Teratai	Antifungal	Biji benih & akar
<i>Ocimum basilicum</i> (Labiatae) Kemangi	Antifungal	Daun
<i>Oxalis corniculata</i> (Oxalidaceae) Aikap dada	Antibiotik	Daun
<i>Phyllanthus niruri</i> (Euphorbiaceae) Sirih	Antiseptik	Daun
<i>Plantago major</i> (Plantaginaceae) Ekor anjing	Antibakteria Antifungal	Seluruh tumbuhan
<i>Quisqualis indica</i> (Combretaceae) Akar dani	Antibakteria	Seluruh tumbuhan
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (Verbenaceae) Rumput ekor tikus	Antifungal	Seluruh tumbuhan

Kata kunci :

- Antibakteria = Bahan yang boleh memusnahkan bakteria tanpa merosakkan tisu hidup
 Antifungal = Bahan yang boleh memusnahkan fungi tanpa merosakkan tisu hidup
 Antimikrob = Bahan yang boleh memusnahkan patogen tanpa merosakkan tisu hidup
 Antiseptik = Agen kimia yang boleh digunakan untuk memusnahkan mikroorganisma tanpa merosakkan tisu hidup
 Antibiotik = Agen antimikrob

Jadual 6: Beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteria (Singleton dan Sainsbury 1981).

Penyakit	Bakteria
Taun (Kolera)	<i>Vibrio cholerae</i>
Disentri	<i>Shigella</i> sp.
Keracunan makanan	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>Bacillus coreus</i>
	<i>Clostridium</i> sp.
	<i>Salmonela typhimurium</i>
Siplis	<i>Treponema pallidum</i>
Trachoma	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Tuberkulosis (batuk kering)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Demam kepialu	<i>Salmonella typhi</i>
Gonorrhoea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>

2.2 BAHAN DAN KAEDAH

2.2.1 Pengumpulan sampel

Empat spesies tumbuhan yang digunakan dalam penyelidikan ini dikutip dari Rimba Ilmu, Universiti Malaya iaitu *C. aeruginosa*, *C. mangga*, *C. xanthorrhiza*, dan *C. zedoaria* manakala dua spesies lagi iaitu *C. rubescens* dan *C. inodora* aff. pula diperolehi daripada MARDI Hilir Perak. Kutipan spesimen kajian ini dibuat pada bulan Mei hingga Jun 200.00 dan bahagian yang digunakan ialah rizom. Material tumbuhan dipotong kecil dan dikeringkan di dalam oven pada 50.0⁰C selama 4 hari dan kemudiannya dikisar menjadi serbuk.

2.2.2 Penyediaan ekstrak dan disk

100.0 g sampel (serbuk) direndam dalam 50.0 ml metanol selama 24 jam. Sampel kemudian dituras menggunakan kertas turas Whatman no. 1 (langkah ini diulang dua kali). Hasil turasan dievaporasi menggunakan penyulingan berwap (BüCHI Rotavapour R-14). Hasil daripada penyulingan ini dilarutkan dalam 10.0 ml metanol. Kepekatan ekstrak ini bersamaan dengan 10.0 g material rizom kering/ml. Disk kertas kemudian dipipetkan dengan 20.0 μ l ekstrak (bersamaan dengan 200.0 mg material rizom kering) dan dikeringkan pada suhu bilik. Disk disediakan sebaik sahaja hendak memulakan eksperimen (Taylor *et al.*, 1995).

2.2.3 Bakteria kajian

Enam strain bakteria telah digunakan dalam kajian ini. Bakteria yang digunakan diperolehi daripada kultur tulen yang diambil dari Jabatan Mikrobiologi, Fakulti Perubatan, Universiti Malaya. Bakteria ini dibahagikan kepada dua kumpulan seperti dalam jadual 7.

Jadual 7: Pengenalan am kepada kumpulan bakteria yang digunakan dalam kajian.

Kumpulan bakteria	Spesies/ strain	Pengenalan
Bakteria gram positif (Cocci)	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 25.0922)	Bakteria ini hidup secara komensal didalam manusia dan juga boleh ditemui pada salur makanan haiwan. <i>E. faecalis</i> boleh menjangkiti pundi hempedu dan pundi kencing.
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>M. luteus</i> merupakan bakteria yang paling peka terhadap ekstrak-ekstrak kajian. Penggunaan bakteria ini adalah berdasarkan kebiasaan bakteria ini yang sering digunakan dalam kajian antibiotik dan farmaseutikal. <i>M. luteus</i> boleh ditemui pada manusia, hasil tenusu dan bir.
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 24213 dan ATCC 29213)	<i>S. aureus</i> merupakan bakteria gram positif yang boleh menyebabkan sakit kerongkong, bisul, kayap dan lain-lain. Ia juga boleh menyebabkan keracunan makanan apabila bakteria ini mengeluarkan toksin kepada makanan yang terdedah. <i>S. aureus</i> telah dilaporkan boleh menyebabkan ruam pada kulit (Duguid <i>et al.</i> , 1978)
Bakteria gram negatif (Bacilli)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25.0922 dan ATCC 35213)	<i>E.coli</i> merupakan bakteria gram negatif yang boleh menyebabkan pelbagai jenis penyakit. <i>E.coli</i> boleh ditemui pada usus usus lembu ternakan, ayam, biri-biri dan babi. Oleh itu kebanyakan penyakit yang disebabkan oleh bakteria ini ialah penyakit bawaan makanan. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteria ini ialah cirit- birit berdarah (bloody diarrhea/disentri).

2.2.4 Media untuk pertumbuhan bakteria

Media disediakan mengikut spesifikasi yang telah ditetapkan oleh pembekal dan di ubah kepada pH yang sesuai sebelum disteril menggunakan autoklaf pada 121⁰C selama 15 minit. 20 ml agar media steril dituang ke dalam piring petri dan dibiarkan beku. 'Broth' atau media cecair dimasukkan terlebih dahulu kedalam botol universal sebelum diautoklaf.

Jadual 8: Media kultur untuk pertumbuhan bakteria

Medium	Tujuan	Penyediaan
Meuller Hinton Agar (OXOID)	Ujian antibakteria semi kuantitatif	38.0 g agar dilarutkan kedalam 1L air suling dan perlu dididihkan untuk larut dengan sempurna dan pH sebelum diautoklaf ialah 7.4 ± 0.2 .
Meuller Hinton Broth (OXOID)	Ujian antibakteria kuantitatif dan kultivasi bakteria.	21.0 g broth dilarutkan ke dalam 1 L air suling dan dididihkan jika perlu. pH diubah kepada 5.6 ± 0.2 sebelum di autoklaf.

2.2.5 Inokulum untuk ujian antibakteria

Kultur bakteria yang dibiarkan didalam broth selama 24 jam diseragamkan kepada ketumpatan yang sama pada 600nm ($OD_{600} = 0.1$) menggunakan NOVASPEC II Spektrofotometer. Ketumpatan bakteria ini diubahsuai dengan menambahkan broth steril kepada kultur. Kepekatan bakteria pada bacaan ini ialah 10^8 sel/ml (Rahalison *et al.*, 1991). Kultur bakteria ini disediakan sebaik sahaja sebelum asai antibakteria dimulakan.

2.2.6 Ujian antibakteria semi kuantitatif

2.2.6.1 'Paper-disk Diffusion Assay' (Bauer *et al.*, 1966; Brown dan Blowers, 1978)

Ampaian bakteria dicairkan kepada kepekatan akhir yang bersamaan dengan 10^8 sel/ml dan disapu kepada Mueller Hinton Agar (MHA) (ketebalan 4 mm). Putik kapas steril digunakan untuk sapuan untuk menghasilkan pertumbuhan yang sekata pada agar. Ekstrak metanol 6 spesies *Curcuma* dilarutkan dalam MeOH dan dititis pada disk kertas turas (Whatman No. 1, 6 mm diameter) pada kepekatan 10g/ml untuk ujian pengskrinan antibakteria. Selepas pelarut (metanol) meruap, 'disk' ditempatkan dengan baik keatas agar. 'Streptomycin sulfate' (SIGMA F-7129) 10 unit digunakan sebagai kawalan positif. Kertas turas yang ditepukan dengan metanol dan kertas turas kosong digunakan sebagai kawalan negatif. Eraman dilakukan pada 37°C selama 24 jam. Setiap ekstrak dan kawalan dilakukan sebanyak tiga siri replikat untuk setiap organisma. Diameter zon yang direncatkan (cerah) pada sekeliling 'disk' (jika hadir) diukur selepas tempoh pengeraman.

2.2.7 Ujian aktiviti antibakteria secara kuantitatif

2.2.7.1 'Determination of Minimum Inhibitory Concentration' (MIC)

2.2.7.1.1 '2-Fold Broth Dilution Method' (Frost, 1994)

Kaedah ini digunakan untuk menilai secara kuantitatif aktiviti antibakteria terhadap ekstrak krud *C. inodora* aff. terhadap bakteria. Ekstrak dilarutkan dalam MeOH:H₂O pada nisbah 2:1. Pencairan berganda setiap ekstrak dibuat dalam isipadu 2.0 ml media cecair (broth). 2.0 ml 'broth' yang mengandungi ekstrak ujian pada 200.0 µg/ml disediakan. Dalam kajian ini 8.0 ml 'broth' per ekstrak ujian disediakan untuk mencari nilai MIC terhadap spesies bakteria *M. luteus* dan *S. aureus* ATCC 29213. Kesemua tiub dilabel dan eksperimen dijalankan. 1.0 ml larutan diletakkan kedalam tiub pada barisan pertama. Bakinya pula di dicairkan secara bersiri mengikut kaedah '2-fold diluted broth'. 1.0 ml 'broth' diletakkan pada akhir barisan dan dilabelkan dengan kawalan negatif. Penisilin 10 unit pula digunakan sebagai kawalan positif. (Rujuk gambarajah 1). Inokulum bakteria ini dicairkan pada kepekatan 10⁸ sel/ml. Setiap tiub dalam barisan yang sama diinokulat dengan inokulum yang sama. 10.0 µl inokulum ditambahkan kedalam setiap tiub. Setiap tiub dieram pada 37°C semalaman. Tiub digoncang dan dilihat kekeruhannya dan dibandingkan dengan tiub yang tidak diinokulasi pada barisan akhir. MIC merupakan nilai kepekatan yang terendah dimana pertumbuhan bakteria kelihatan. Tiga siri eksperimen dijalankan untuk menilai MIC ini. Hasil daripada eksperimen ini juga diaplikasikan pada plat 11-14 melalui kaedah 'Paper-disk Diffusion assay'.

2.3 KEPUTUSAN

2.3.1 Ekstrak tumbuhan

Ekstrak krud daripada rizom setiap spesies kajian telah diperolehi daripada 100.0 g serbuk spesies masing-masing. Ciri-ciri ekstrak krud yang diperolehi ditunjukkan dalam jadual 9.

Jadual 9: Ciri-ciri ekstrak krud spesies kajian

Spesies	Ciri-ciri ekstrak
<i>C. aeruginosa</i>	Ekstrak likat berwarna coklat gelap
<i>C. mangga</i>	Ekstrak likat berwarna coklat gelap
<i>C. rubescens</i>	Ekstrak likat berwarna coklat gelap
<i>C. xanthorrhiza</i>	Ekstrak likat berwarna coklat gelap
<i>C. zedoaria</i>	Ekstrak likat berwarna coklat gelap
<i>C. inodora</i> aff.	Ekstrak likat berwarna coklat gelap

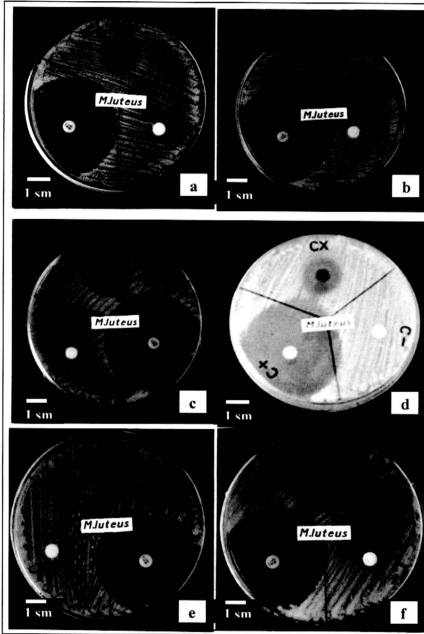
2.3.2 Kajian aktiviti antibakteria terhadap ekstrak spesies kajian

Ekstrak krud yang diperolehi daripada rizom telah diskrim untuk kajian aktiviti antibakteria terhadap bakteria yang patogen kepada manusia. Asai penyerapan disk (Disk Diffusion Assay) telah digunakan untuk kajian aktiviti ekstrak krud terhadap pertumbuhan bakteria. Bahan aktif yang terkandung di dalam ekstrak menghasilkan zon perencatan terhadap pertumbuhan bekteria dalam julat 8.0-23.5 mm diameter. Daripada ujian pengskrinan yang telah dilakukan, didapati kesemua ekstrak kajian menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap bakteria Gram-negatif (jadual 10). Ekstrak krud *C.*

inodora aff. menunjukkan nilai perencatan yang yang paling tinggi iaitu 23.5 mm terhadap *M. luteus*. Nilai perencatan bakteria yang paling rendah pula ialah 8.0 mm iaitu ekstrak *C. zedoaria* terhadap *S. aureus* ATCC 24213. Keputusan terperinci diameter zon perencatan terhadap organisma kajian di catatkan dalam jadual 10 dan plat 7-14.

Jadual 10: Ukuran (mm) diameter perencatan ekstrak spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria kajian

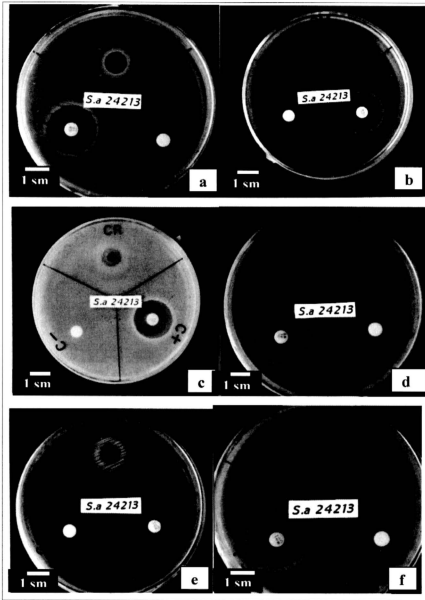
Spesies	Diameter zon perencatan (mm)					
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Enterococci faecalis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 24213	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> ATCC 35213
<i>C. aeruginosa</i>	15.4 ± 1.5	-	9.2 ± 1.5	9.0 ± 0.4	-	-
<i>C. mangga</i>	10.7 ± 0.4	-	8.8 ± 0.8	9.2 ± 0.8	-	-
<i>C. rubescens</i>	20.3 ± 1.2	13.0 ± 0.8	9.6 ± 0.4	11.2 ± 0.8	-	-
<i>C. xanthorrhiza</i>	15.6 ± 1.1	11.2 ± 0.8	10.2 ± 0.6	11.1 ± 1.3	-	-
<i>C. zedoaria</i>	11.9 ± 0.9	-	8.0 ± 0.4	8.3 ± 0.8	-	-
<i>C. inodora</i> aff.	23.5 ± 1.1	9.2 ± 0.8	10.2 ± 1.4	11.4 ± 1.1	-	-
Gentamisin (kawalan negatif)	44.7 ± 0.9	18.4 ± 0.7	21.7 ± 0.7	27.2 ± 1.0	19.6 ± 1.4	19.6 ± 1.4
MeOH (kawalan positif)	-	-	-	-	-	-



Plat 7: Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *M. luteus*

Kata kunci:

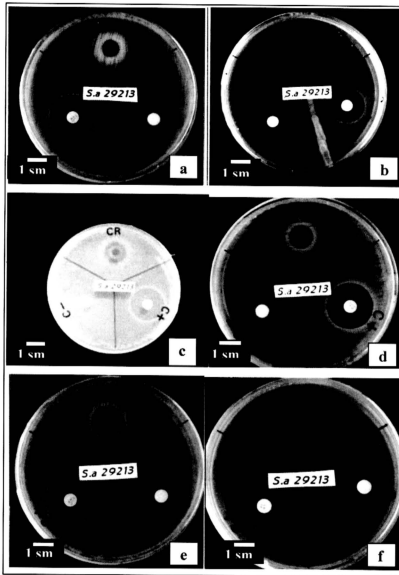
- | | | |
|----|--------------------------------|-------|
| a) | Ekstrak <i>C. aeruginosa</i> | (CA) |
| b) | Ekstrak <i>C. mangga</i> | (CM) |
| c) | Ekstrak <i>C. rubescens</i> | (CR) |
| d) | Ekstrak <i>C. xanthorrhiza</i> | (CX) |
| e) | Ekstrak <i>C. zedoaria</i> | (CZ) |
| f) | Ekstrak <i>C. inodora</i> aff. | (Csp) |
| | Metanol (kawalan negatif) | (C-) |
| | Gentamisin (kawalan positif) | (C+) |



Plat 8: Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *S. Aureus* 24213

Kata kunci:

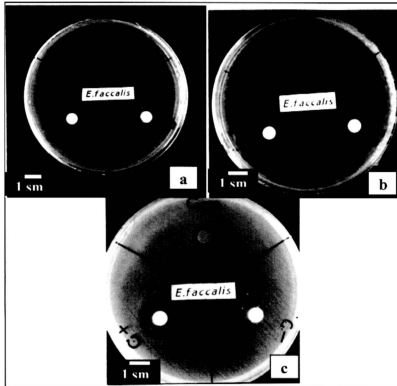
- | | | |
|----|--------------------------------|-------|
| a) | Ekstrak <i>C. aeruginosa</i> | (CA) |
| b) | Ekstrak <i>C. mangga</i> | (CM) |
| c) | Ekstrak <i>C. rubescens</i> | (CR) |
| d) | Ekstrak <i>C. xanthorrhiza</i> | (CX) |
| e) | Ekstrak <i>C. zedoaria</i> | (CZ) |
| f) | Ekstrak <i>C. inodora</i> aff. | (Csp) |
| | Metanol (kawalan negatif) | (C-) |
| | Gentamisin (kawalan positif) | (C+) |



Plat 9: Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *S. aureus* 29213

Kata kunci:

- | | | |
|----|--------------------------------|-------|
| a) | Ekstrak <i>C. aeruginosa</i> | (CA) |
| b) | Ekstrak <i>C. mangga</i> | (CM) |
| c) | Ekstrak <i>C. rubescens</i> | (CR) |
| d) | Ekstrak <i>C. xanthorrhiza</i> | (CX) |
| e) | Ekstrak <i>C. zedoaria</i> | (CZ) |
| f) | Ekstrak <i>C. inodora</i> aff. | (Csp) |
| | Metanol (kawalan negatif) | (C-) |
| | Gentamisin (kawalan positif) | (C+) |



Plat 10: Zon perencatan spesies-spesies *Curcuma* terhadap bakteria *E. faecalis*

Kata kunci:

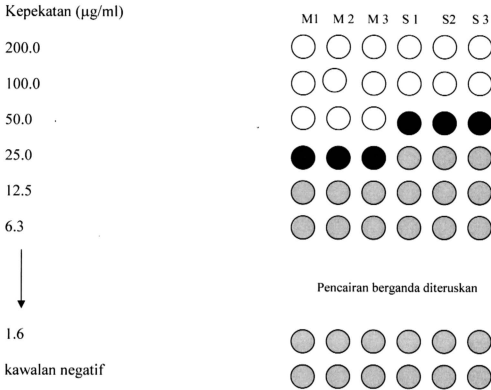
- a) Ekstrak *C. rubescens* (CR)
- b) Ekstrak *C. xanthorrhiza* (CX)
- c) Ekstrak *C. inodora* aff. (Csp)
- Metanol (kawalan negatif) (C-)
- Gentamisin (kawalan positif) (C+)

2.3.3 Ujian kuantitatif aktiviti antibakteria *C. inodora* aff.

Aktiviti antibakteria ekstrak krud *C. inodora* aff. ditentukan dengan lebih terperinci menggunakan '2-fold dilution method' untuk mendapatkan nilai MIC (Jadual 11). Organisma yang memberi respon yang paling kuat terhadap ekstrak dipilih untuk penentuan nilai MIC iaitu *Micrococcus luteus* dan *S. aureus* ATCC 24213. Penentuan ini dilakukan pada kepekatan ekstrak dalam julat 1.6 µg/ml hingga 200.0 µg/ml (Rajah 1).

Jadual 11: Nilai MIC ekstrak *C. inodora* aff. berbanding kawalan

Mikroorganisma	MIC (µg/µl)	Penicillin	Gentamisin
<i>M. luteus</i>	25.0	1.6	1.6
<i>S. aureus</i> ATCC 24213	50.0	1.6	1.6



Rajah 1: Ilustrasi tiub-tiub yang diatur untuk mendapatkan nilai MIC

kata kunci:

- Tiada pertumbuhan bakteria
- ◐ Pertumbuhan bakteria kelihatan
- Nilai MIC iaitu pencairan paling akhir dengan pertumbuhan bakteria yang kelihatan

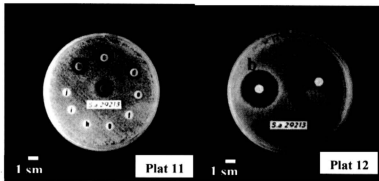
M1 *M. luteus* replikat 1
 M2 *M. luteus* replikat 2
 M3 *M. luteus* replikat 3

S1 *S. aureus* ATCC 29213 replikat 1
 S2 *S. aureus* ATCC 29213 replikat 2
 S3 *S. aureus* ATCC 29213 replikat 3

Kesemua ekstrak 6 spesies *Curcuma* yang dikaji menunjukkan aktiviti sekurang-kurangnya terhadap 3 spesies bakteria. Ekstrak-ekstrak ini cuma aktif kepada bakteria gram positif dan tidak aktif terhadap bakteria gram negatif. Keputusan yang diperolehi diringkaskan dalam jadual 11. Purata zon diameter perencatan pertumbuhan bakteria adalah daripada 8.0 mm hingga 23.5 mm. Gentamisin yang digunakan sebagai kawalan positif memberi purata diameter zon perencatan bakteria 19.6 mm hingga 44.7 mm. Ekstrak yang memberi spektrum perencatan bakteria yang paling tinggi ialah ekstrak *C. inodora* aff. terhadap *M. luteus*, ekstrak *C. rubescens* terhadap *E. faecalis* (ATCC 25922), ekstrak *C. xanthorrhiza* terhadap *S. aureus* ATCC 24213 dan ekstrak *C. inodora* aff. terhadap *S. aureus* ATCC 29213.

Daripada kajian didapati 100.0 % ekstrak 6 spesies *Curcuma* memberi aktiviti antibakteria terhadap *M. luteus*, 50.0 % ekstrak memberi perencatan terhadap pertumbuhan bakteria *E. faecalis* (ATCC 25922), 100.0 % ekstrak menunjukkan aktiviti kepada *S. aureus* ATCC 24213 dan *S. aureus* ATCC 29213. Tiada ekstrak memberi perencatan terhadap pertumbuhan bakteria gram negatif.

Nilai MIC ekstrak *C. inodora* aff. terhadap pertumbuhan bakteria *M. luteus* ialah 25.0 mg/l dan 50.0 mg/l untuk bakteria *S. aureus* ATCC 29213.

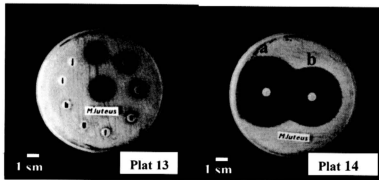


Plat 11: Nilai MIC untuk *C. inodora* aff. terhadap bakteria *Staphylococcus aureus* strain 29213.

- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 400.0 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 200.0 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 100.0 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 50.0 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 25.0 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 12.5 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 6.3 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 3.1 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 1.6 $\mu\text{g/ml}$
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 0.8 $\mu\text{g/ml}$

Plat 12: Disk kawalan terhadap bakteria *Staphylococcus aureus* strain 29213.

- Gentamisin
- Penicillin



- Plat 13: Nilai MIC untuk *C. inodora* aff. terhadap bakteria *Micrococcus luteus*.
- Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 400.0 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 200.0 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 100.0 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 50.0 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 25.0 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 12.5 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 6.3 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 3.1 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 1.6 $\mu\text{g/ml}$
 - Kajian menggunakan ekstrak dengan kepekatan 0.8 $\mu\text{g/ml}$
- Plat 14: Disk kawalan terhadap bakteria *Micrococcus luteus*.
- Gentamisin
 - Penicillin

2.4 PERBINCANGAN

2.4.1 Aktiviti antibakteria spesies-spesies *Curcuma* ubatan.

Salah satu daripada strategi untuk menyelidikan agen perubahan daripada tumbuhan termasuklah kajian penskrinan secara farmakologi ekstrak tumbuhan dan diikuti oleh pemecahan bioaktiviti komponen aktif ekstrak yang dipencilkan daripada jujuk tulen (Vlietinck *et al.*, 1991).

Ekstrak metanol daripada rizom 6 spesies kajian pada awalnya dijalankan terhadap ujian semi kuantitatif menggunakan kaedah 'Disk Diffusion Assay'. Ekstrak dikaji pada kepekatan 10.0 mg/μl. Ujian seterusnya merupakan ujian kuantitatif yang dilakukan hanya terhadap ekstrak tumbuhan yang memberikan spektrum perencatan yang paling besar terhadap organisma ujian. Ekstrak kajian akan meresap kedalam agar dan sekiranya terdapat sebatian antibakteria di dalam ekstrak, zon di mana bakteria tidak dapat tumbuh akan terbentuk di sekeliling disk kertas turas tersebut. Agen antibakteria akan meresap dalam medium agar dan membentuk satu zon di mana bakteria atau mikroorganisma tidak dapat tumbuh. Zon ini cerah berbanding dengan zon yang berlaku pertumbuhan bakteria. Zon cerah ini adalah zon perencatan atau zon inhibisi bakteria. Diameter zon cerah ini bergantung kepada bahan antibakteria dan kepekaan bakteria yang diuji. Lebih tinggi bahan antibakteria dalam sesuatu sample bakteria yang diuji maka lebih besar zon perencatan ini (diameter inhibisi meningkat). Semakin peka sesuatu bahan antibakteria, semakin besar zon yang terbentuk (Authur dan Clyde, 1985). Selepas tempoh inkubasi, diameter zon perencatan pertumbuhan (jika

ada) diukur. Ekstrak yang aktif merupakan ekstrak yang menghasilkan diameter zon perencatan yang melebihi 7.0 mm.

Daripada asai ini, telah di dapati setiap organisma ujian menunjukkan pelbagai darjah zon perencatan pertumbuhan bakteria terhadap ekstrak tumbuhan. *M. luteus* merupakan organisma yang paling mudah mengalami perencatan pertumbuhan. Kesemua ekstrak tumbuhan yang digunakan dalam kajian menunjukkan aktiviti yang aktif terhadap organisma ini. Semua ekstrak menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap sekurang kurangnya 3 daripada 4 bakteria gram positif yang digunakan dalam kajian tetapi sebaliknya semua ekstrak tidak menunjukkan aktiviti perencatan terhadap pertumbuhan bakteria *E. coli*.

Dalam pelakuan kajian aktiviti terhadap bakteria gram positif dan bakteria gram negatif, telah dapat dianggarkan aktiviti terhadap bakteria gram positif adalah melebihi aktiviti terhadap bakteria gram negatif (Mc Cutchen *et al.*, 1992). Keputusan yang negatif bagi kajian terhadap bakteria gram negatif ini telah dijangkakan, kerana pada amnya bakteria gram negatif ini lebih rintang terhadap agen antibakteria berbanding dengan bakteria gram positif (Batista *et al.*, Martin, 1995, Paz *et al.*, 1995, Vlietinck *et al.*, 1995). Keputusan yang sama juga telah diperolehi oleh penyelidik lain seperti M. Habsah *et al.* (200.00) terhadap ekstrak krud beberapa spesies tumbuhan famili Zingiberaceae di mana agen antibakteria yang terkandung di dalam sampel ekstrak krud kajian lebih mampu merencatkan pertumbuhan bakteria gram positif berbanding dengan bakteria gram negatif. Keputusan ini diperolehi mungkin kerana bakteria gram negatif seperti *E. coli* mempunyai 3 lapisan dinding sel berbanding dengan cuma 2 lapisan

dinding sel yang terdapat pada bakteria gram positif (Yaacob, 1988). Bakteria gram negatif juga berbeza dari segi struktur dinding selnya yang terdiri daripada struktur peptidoglikan sebagai heteropolimer dan polisakarida yang lebih tebal berbanding dengan bakteria lain. Oleh itu ekstrak tumbuhan kajian yang digunakan pada kepekatan ini tidak mampu menembusi dinding sel bakteria gram negatif serta merencatkan pertumbuhannya.

Aktiviti terhadap pertumbuhan bakteria *E. coli* mungkin mampu diperolehi jika kita cuba mendapatkan ekstrak menggunakan pelarut yang kurang polar berbanding dengan MeOH. Penggunaan pelarut lain yang kurang polar mungkin dapat meningkatkan kualiti pengekstrakan yang lebih baik daripada ekstrak yang terhasil menggunakan pelarut metanol (M. Habsah *et al.* 200.00). Sebahagian komposisi kimia yang kurang polar mungkin tidak larut dalam pelarut metanol. Kompaun yang kurang polar seperti kurkuminoid, kavapyrones dan gingerols yang diisolat daripada tumbuhan famili Zingiberaceae telah dilaporkan mempunyai aktiviti biologi seperti antifungal, antioksidan, antiserangga dan antiinflamatori (Kikuzaki dan Nakatani, 1993). Oleh itu kompaun-kompaun ini mungkin tidak terkandung di dalam ekstrak sample krud kajian yang hanya menggunakan pelarut metanol sebagai pelarut. Biasanya pelarut metanol hanya berjaya mengekstrak bahan yang polar yang hanya mampu memberi perencatan kepada pertumbuhan bakteria gram positif sahaja. Oleh itu penggunaan bahan pelarut lain yang mungkin berupaya untuk mengeluarkan komponen yang kurang polar yang boleh merencatkan pertumbuhan bakteria gram negatif harus dicuba untuk ujian yang akan datang. Contoh pelarut yang kurang polar ialah dichloromethane atau pun aseton. Penggunaan pelarut ini adalah di syorkan di dalam kajian akan datang kerana ia

mungkin akan menghasilkan ekstrak yang mampu memberikan kesan perencatan terhadap pertumbuhan bakteria *E. Coli* atau pun bakteria gram negatif yang lain.

Keputusan ini juga disokong oleh laporan yang mencadangkan keputusan yang diperolehi berkait rapat dengan struktur dan lapisan dinding bakteria gram positif yang lebih lemah berbanding dengan bakteria gram negatif (Yaacob, 1988). Aktiviti antibakteria yang didapati dalam keputusan berkait rapat dengan kandungan dalam ekstrak sampel kajian. Sesetengah ekstrak amat berguna untuk perencatan bakteria tertentu. Ekstrak sampel kajian menunjukkan aktiviti yang kuat terhadap bakteria gram positif. Ini mencadangkan bahawa ekstrak-ekstrak tumbuhan kajian ini mengandungi bahan aktif yang mampu merencatkan pertumbuhan bakteria.

Kepekatan ekstrak juga memainkan peranan yang penting, contohnya menggunakan ekstrak yang lebih tinggi kepekataannya daripada kajian yang telah dilakukan dalam ujian ini.

Bergantung kepada spesies tumbuhan yang dikaji, pemencilan kepada komponen-komponen tertentu boleh memberikan aktiviti yang lebih baik daripada penggunaan ekstrak krud. Namun begitu, ujian antibakteria yang dilakukan dalam kajian hanya melibatkan penggunaan krud ekstrak di mana penggunaan krud ekstrak kadang-kala lebih baik kerana ia merupakan kombinasi sebatian-sebatian yang mungkin memberi kesan sinergistik.

Laporan sebelum ini juga ada menyatakan bahawa lebih kurang 20 % daripada kajian tumbuhan yang memberi kesan antibakteria adalah kaya dengan tanin dan polifenolik. Bahan-bahan ini berkemungkinan terkandung dalam ekstrak krud tumbuhan kajian. Bahan-bahan ini bertindak dengan cara mengikat kepada bakteria yang menyebabkan reseptor permukaan sel bakteria terganggu (Anon, 1989) lalu menyebabkan pertumbuhan bakteria tertentu terencat. Ekstrak-ekstrak yang digunakan dalam kajian mungkin mengandungi sebatian-sebatian yang berupaya untuk merencatkan pertumbuhan bakteria gram positif.

Terdapat banyak laporan yang menyatakan bahawa *C. aeruginosa* mengandungi sebatian kamfena, pinena, limonena, isoborneol, borneol dan karifilena yang tinggi di mana sebatian-sebatian ini mampu memberikan kesan antibakteria. *C. mangga* yang telah dilaporkan dalam kajian sebelum ini juga mengandungi kandungan pinena, limonena, kamfena, pinena dan linalol didalam rizomnya yang memberikan kesan antibakteria (Rastogi; 1993).

Begitu juga *C. xanthorrhiza* yang mengandungi pinena, kamfena, limonena, linalol, isoborneol dan borneol yang mampu memberikan kesan antibakteria. Di antara komponen-komponen kimia yang terkandung dalam rizom *Curcuma* dan mampu memberi kesan antibakteria ialah 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione (1.11%) di kenali sebagai curcumin, feruloyl-(4-hydroxycinnamoyl)-methane (0.86%) di kenali sebagai desmethoxycurcumin, bis-(4-hydroxycinnamoyl)-methane (1.62%) di kenali sebagai bisdesmethoxycurcumin, 2-(hydroxymethyl)anthraquinone, 1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-heptene-3,5-dione di kenali sebagai

dihydrocurcumin, diferuloilmethane, feruloil-p-cumaroilmethane, di-p-desmethoxycurcumin, α -dan β -pinena, kamfena, limonena, terpinena, caryophyllene, curcumene, linalol, borneol, isoborneol, eugenol, sineol, curdione, curzerenone, curlone, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, kolesterol dan asid lemak (Kapoor, 1990a; Rastogi dan Mehrotra, 1993, 1995).

Kajian terdahulu menunjukkan komponen yang paling banyak terkandung dalam rizom *C. xanthorrhiza* ialah seskuiterpenoid di mana xanthorrhizol (44.5%) adalah komposisi utamanya (Jantan, 1999). Aktiviti yang tinggi didapati dalam ekstrak metanol untuk spesies *C. xanthorrhiza* mungkin berhubungkait dengan kandungan seskuiterpenoid di mana seskuiterpenoid telah dilaporkan mempunyai aktiviti antibakteria dan antifungal (Fukuyama *et al.*, 1982; Taniguchi dan Kubo, 1993).

Untuk ekstrak *C. inodora* aff. dan *C. rubescens*, masih belum ada kajian terperinci mengenai kandungan komponen yang terdapat didalam rizomnya. Laporan-laporan mengenai kandungan bahan aktif dalam rizom *Curcuma* ini mencadangkan wujudnya sebatian-sebatian yang mampu memberikan aktiviti terhadap bakteria gram positif yang digunakan di dalam kajian.

Ekstrak kajian juga menunjukkan aktiviti yang kuat terhadap *M. luteus*. Ini mencadangkan bahawa kemungkinan dinding sel bakteria ini lebih lemah berbanding daripada bakteria gram positif lain, atau pun kandungan sebatian-sebatian aktif dalam ekstrak ini mampu memberikan kesan yang kuat terhadap bakteria ini, atau pun

wujudnya kandungan bahan aktif yang tinggi didalam ekstrak kajian yang mampu merencatkan bakteria ini.

Dua organisma yang memberi respon yang paling tinggi dari segi diameter zon perencatan terhadap ekstrak menggunakan kajian semi kuantitatif dipilih untuk menjalani ujian untuk penentuan MIC. Organisma ini ialah *M. luteus* dan *S. aureus* ATCC 29213 dan ekstrak yang digunakan adalah ekstrak *C. inodora* aff. iaitu ekstrak yang paling kuat memberikan kesan aktiviti antibakteria berbanding dengan ekstrak lain yang digunakan dalam kajian ini. Aktiviti kuantitatif ini juga menggunakan antibiotik gentamisin dan penisilin sebagai kawalan positif. Penisilin digunakan sebagai kawalan kerana ia digunakan di hospital untuk merencatkan pertumbuhan bakteria *S.aureus*. Peningkatan kekeruhan 'broth' menunjukkan kehadiran pertumbuhan bakteria.

Ekstrak *C. inodora* aff. menunjukkan aktiviti terhadap *M. luteus* dan *S. aureus* ATCC 29213 namun begitu gentamisin serta penisilin memberikan nilai MIC yang lebih tinggi berbanding dengan *C. inodora* aff.. Jika dibandingkan keputusan yang diperolehi oleh kawalan positif dengan ekstrak *C. inodora* aff., didapati aktiviti gentamisin serta penisilin merupakan ganda dua lebih kuat daripada ekstrak kajian. Disini disimpulkan bahawa aktiviti antibakteria *C. inodora* aff. tidak setanding dengan gentamisin serta penicillin. *C. inodora* aff. merupakan sumber yang bernilai untuk kompaun antibakteria tetapi ekstrak krud tidak berupaya menandingi penisilin yang sedia di pasaran yang digunakan untuk merawat penyakit yang disebabkan oleh *S. aureus*. Walaubagaimana pun kajian yang lebih terperinci perlu dijalankan untuk mengesahkan keputusan ini. Kajian tersebut termasuklah perbandingan aktiviti dengan

antibiotik kawalan yang lain. Kompaun-kompaun antibakteria yang terdapat dalam rizom *Curcuma* juga boleh diisolatkan untuk mengetahui dengan lebih terperinci kompaun bioaktif yang menghasilkan aktiviti antibakteria yang positif ini. Hubungan serta modifikasi struktur adalah penting untuk menghasilkan komponen antibakteria yang lebih berkesan dan boleh dikomersilkan.

Salah satu faktor penghad bagi kaedah ini ialah kadar resapan pada media. Walaupun ia mempunyai bahan antibakteria yang aktif, zon perencatan pertumbuhan bakteria tidak akan ditunjukkan jika kadar resapan terhadap media adalah rendah. Diameter perencatan yang lebih tinggi menunjukkan ekstrak itu mempunyai lebih sebatian antibakteria. Mungkin sebatian antibakteria yang terdapat dalam ekstrak itu walaupun dalam kuantiti yang sedikit dapat merencat pertumbuhan bakteria dengan berkesan atau mungkin kadar resapan sebatian antibakteria dalam medium adalah tinggi. Plat 7-10 menunjukkan kesan antibakteria terhadap pertumbuhan bakteria gram positif.

Diameter zon perencatan pertumbuhan bakteria yang besar bagi ekstrak *C. inodora* aff. juga menunjukkan bahawa ekstrak itu mengandungi lebih sebatian antibakteria berbanding ekstrak lain atau mungkin sebatian antibakteria yang larut dalam ekstrak itu walaupun sedikit dapat merencat bakteria dengan berkesan. Dari segi kandungan bahan aktif dalam rizom, minyak pati merupakan salah satu sebatian aktif yang terkandung di dalam rizom *Curcuma* dan telah diketahui mempunyai aktiviti antibakteria dengan darjah keberkesanan yang berbeza-beza. Minyak pati atau

campuran minyak pati telah digunakan untuk rawatan luar dan dalam berbagai masalah penyakit (Karim, 1988).

Kebanyakan daripada kita sekarang amat bergantung kepada ubat-ubatan moden kerana keyakinan terhadap mutu dan kualitinya. Tetapi kita jangan memandang rendah terhadap khasiat ubatan tradisional yang ada sesetengahnya sudah dibuktikan secara klinikal mempunyai khasiat yang tinggi serta selamat digunakan.