

BAB 3

AKTIVITI ANTIBAKTERIA

BAB 3

AKTIVITI ANTIBAKTERIA

BAB 3 AKTIVITI ANTIBAKTERIA

3.1 PENGENALAN

Tumbuhan dan hasilnya telah digunakan semenjak dahulu lagi untuk mengubati pelbagai penyakit sebelum kajian saintifik dilakukan. Terdapat banyak rujukan yang berkenaan dengan tindakan tumbuhan terhadap mikroorganisma patogen kepada tumbuhan dan haiwan. Antaranya ialah kajian aktiviti antibakteria oleh beberapa penyelidik seperti Fabry *et al.* (1998), Hewage *et al.* (1998) dan Arambewela *et al.* (1999).

Dalam kajian ini, pengskrinan awal antibakteria di lakukan ke atas sampel ekstrak krud spesies-spesies daripada famili halia ubatan terpilih untuk melihat aktiviti antibakteria ke atas dua strain bakteria *Staphylococcus aureus* dan dua strain bakteria *Escherichia coli*. Pemilihan bakteria tersebut berdasarkan kepada sensitiviti terhadap pelbagai antibiotik sintetik (Hewage *et al.*,1998) dan yang bukan dari sumber semulajadi. Bakteria-bakteria yang dipilih juga adalah patogenik kepada manusia.

Ekstrak krud disediakan daripada bahagian-bahagian tertentu tumbuhan seperti daun, batang, akar, buah, bunga atau keseluruhan bahagian pokok. Bahagian-bahagian tersebut dikeringkan terlebih dahulu dan dilarutkan di dalam pelarut

tertentu untuk memperoleh sampel ekstrak yang akan diuji untuk aktiviti antibakteria.

Untuk mengetahui sama ada spesies-spesies kajian mempunyai aktiviti antibakteria atau tidak, ujian antimikrobial digunakan. Disk kromatografi kecil yang dititiskan dengan sampel ekstrak krud spesies kajian diletakkan terus ke atas agar nutrien yang mengandungi bakteria yang telah diinokulat. Selepas semalaman, bakteria akan tumbuh dan zon perencatan seharusnya dapat dilihat. Semakin besar zon perencatan yang dihasilkan, maka semakin kuat kesan antibakteria daripada sampel yang digunakan.

Secara amnya, dalam menguji kesan antibakteria, eksperimen perlu dilakukan di dalam keadaan yang steril untuk memastikan ketulenan bakteria yang diuji. Cara ini amat berkesan untuk mengelakkan kontaminasi dan keputusan positif yang didapati daripada ujian mengesahkan kesan daripada sampel ekstrak yang digunakan ke atas bakteria yang diuji tidak dipengaruhi oleh faktor-faktor luar.

3.2 BAHAN DAN KAEDAH

3.2.1 Sumber sampel kajian

Tujuh sampel ekstrak kerd daripada semua spesies dalam kajian ini telah digunakan untuk aktiviti antibakteria. Spesies-spesies tersebut diperolehi dari Rimba Ilmu, Universiti Malaya kecuali *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi) yang diperolehi dari Muar, Johor.

Bahagian tumbuhan yang digunakan ialah bahagian rizom. Rizom dipotong kecil-kecil dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan dengan menjemur rizom tersebut di bawah cahaya matahari selama tiga hingga empat hari. Rizom yang sudah dikeringkan dihancurkan ke bentuk serbuk untuk digunakan dalam eksperimen seterusnya.

3.2.2 Penyediaan sampel ekstrak kerd

Sampel diperolehi daripada satu kilogram berat basah rizom yang kemudiannya dikeringkan sebelum direndamkan ke dalam pelarut metanol (500 ml) selama 3 hari. Penurasan dilakukan dengan kertas turas (Whatman No.1; berdiameter 15 sm). Ulangan penurasan dilakukan dua atau tiga kali sehingga habis hasil turasan sampel diperolehi berpandukan kepada keputaran warna sampel yang direndam dalam pelarut metanol tersebut.

Hasil turasan yang diperolehi dikeringkan di bawah tekanan rendah dengan menggunakan 'rotary evaporator' (BüCHI Rotavapour R-14). Seterusnya sampel ekstrak krud tersebut dibiarkan kering di dalam suhu bilik hingga menjadi hampir pekat. Sampel ditimbang untuk pengiraan peratusan berat ekstrak krud dan kemudiannya dilarutkan semula dengan metanol sebanyak 10 ml untuk pengiraan kepekatan sampel ekstrak krud untuk ujian antibakteria (Taylor *et al.*, 1995). Sampel kemudiannya disimpan di dalam suhu 4°C.

3.2.3 Bakteria ujian dan penyediaan media

Bakteria yang digunakan di dalam kajian ini terdiri daripada dua kumpulan iaitu bakteria gram-positif dan gram-negatif. Bakteria gram-positif yang digunakan berbentuk 'cocci' iaitu *Staphylococcus aureus* (strain ATCC 24213 dan ATCC 29213), manakala bakteria gram-negatif yang digunakan berbentuk 'bacilli' iaitu *Escherichia coli* (strain ATCC 35213 dan ATCC 25922). Kesemua strain bakteria tersebut diperolehi dari makmal Jabatan Mikrobiologi Perubatan, Fakulti Perubatan, Universiti Malaya. Bakteria tersebut disimpan di dalam media Mueller Hinton Agar (MHA) (OXOID) untuk pemeliharaannya.

Terdapat dua jenis media yang digunakan seperti yang ditunjukkan di dalam jadual 3.1. Media-media tersebut disediakan mengikut spesifikasi pengeluar dan ditentukan pHnya terlebih dahulu sebelum disterilkan dengan mengautoklafkannya pada suhu 121°C selama 15 minit pada tekanan 1.2 kg/m². Media agar yang telah

disterilkan dituang sebanyak 20 ml ke dalam piring petri berdiameter 9.0 sm.

Manakala media cecair dimasukkan ke dalam botol “Universal”.

Jadual 3.1 : Media kultur untuk tumbesaran bakteria dan penyediaannya.

Media	Kegunaan/Tujuan	Penyediaan
Meuller Hinton Agar/MHA (OXOID)	Ujian antibakteria semi-kuantitatif	38 g MHA dilarutkan dalam 1 L air suling dan dipanaskan sehingga larut sepenuhnya. pH media adalah 7.4 ± 0.2
Meuller Hinton Broth/MHB (OXOID)	Pemeliharaan bakteria dan pengiraan kepekatan bakteria	21 g MHB dilarutkan ke dalam 1 L air suling dan dipanaskan sehingga larut sepenuhnya. pH media adalah 7.4 ± 0.2

3.2.4 Penyediaan 'assay' bakteria

Kaedah yang digunakan untuk penyediaan 'assay' bakteria adalah mengikut Rahalison *et al.* (1991). Beberapa koloni bakteria yang telah dikultur di atas media MHA diambil dan dimasukkan ke dalam MHB (dalam botol "Universal") untuk pembiakannya dan pengiraan kepekatan sel dibaca selepas 18 jam. Bacaan kepekatan sel pada ketumpatan optik ($OD_{600}=0.1$) diambil menggunakan NOVASPEC II 'Visible Spectrophotometer'. Kepekatan dicairkan dengan menambah media cecair (MHB) yang steril ke dalam kultur. Kepekatan sel bakteria yang diperolehi adalah kira-kira 10^8 sel/ml. Ampaian sel bakteria disediakan dengan segera untuk ujian aktiviti antibakteria.

3.2.5 Ujian semi-kuantitatif aktiviti antibakteria

Ujian semi-kuantitatif antimikrobial dengan kaedah "Paper-disc Diffusion Assay" (Bauer *et al.*, 1966 ; Brown dan Blowers, 1978) telah digunakan. Ampaian sel bakteria yang diperolehi dicairkan kepada kepekatan terakhir iaitu kira-kira 10^8 sel/ml. Kaedah inokulat bakteria ke atas plat agar yang digunakan ialah kaedah penyapuan (Felmingham dan Stokes, 1972). Putik kapas yang steril digunakan untuk menyapu ampaian sel bakteria ke atas plat MHA. Penyapuan dalam tiga arah dibuat dengan teliti untuk mendapatkan satu tumbesaran bakteria yang seragam di atas MHA (Brown dan Blowers, 1978).

Sampel ekstrak krud yang diperoleh dari spesies-spesies kajian digunakan sebagai bahan ujian. Ekstrak-ekstrak ini yang telah dilarutkan dengan metanol dititikkan sebanyak 20 μ l ke atas disk kertas turas (Whatman No. 1, berdiameter 6 mm) dan dibiarkan kering. Selepas pengeringan ekstrak, disk tersebut diletakkan di atas plat agar untuk ujian.

Disk antibiotik komersil iaitu Gentamisin (10 μ g) berdiameter 6 mm digunakan sebagai kawalan positif untuk ujian antibakteria. Disk yang diletakkan metanol yang dibiarkan meruap dijadikan sebagai kawalan negatif. Inkubasi dijalankan pada suhu 37°C untuk semalaman. Eksperimen telah diulang sebanyak lima kali. Diameter zon yang kelihatan pada sekeliling disk untuk keputusan yang positif dikira selepas tempoh inkubasi.

3.3 KEPUTUSAN

3.3.1 Penentuan berat sampel ekstrak

Berat basah bagi bahagian rizom yang digunakan di dalam eksperimen ini adalah sebanyak 1 kg bagi setiap spesies kajian. Daripada berat basah tersebut, hanya sebanyak 8 hingga 13% sahaja berat kering diperolehi selepas bahagian rizom tersebut dikeringkan. Berat kering yang diperolehi bagi *K. galanga* adalah yang terendah iaitu 88.94 g (8.81%). Peratus berat kering bagi spesies-spesies lain ialah 9.61% (*Z. ottensii*), 10.85% (*Z. zerumbet*), 11.16% (*Z. montanum*), 11.73% (*Z. officinale* var. *officinale*/halia), 12.48% (*Z. officinale* var. *rubrum*/halia bara) dan 12.87% (*Z. officinale* var. *rubrum*/halia padi) (Jadual 3.2).

Berat kering diperolehi setelah tiada perubahan berat didapati. Bahagian rizom kering ini dikisar untuk mendapatkan serbuk dan dilakukan kaedah yang seterusnya untuk mendapatkan sampel ekstrak krud. Sampel ekstrak krud yang didapati ditimbang sekali lagi dan keputusan menunjukkan bahawa *K. galanga* mempunyai peratus berat yang paling rendah iaitu 9.31%. Spesies-spesies lain menunjukkan peratusan berat yang melebihi 10% dan *Z. zerumbet* adalah tertinggi iaitu 18.33%.

Kesimpulan daripada keputusan yang diperolehi, hanya 0.8% hingga 2.0% sahaja sampel ekstrak krud diperolehi daripada 1 kg berat basah bahagian rizom setiap spesies kajian (Jadual 3.2). Sampel ekstrak krud yang diperolehi tidak dibiarkan terlalu kering untuk mengelakkan daripada kesukaran apabila dilarutkan kembali di dalam 10 ml metanol bagi pengiraan kepekatan.

Berat sampel ekstrak krud yang digunakan bagi setiap spesies kajian ialah seperti yang ditunjukkan di dalam Jadual 3.3. Berat sampel ini adalah dikira daripada kepekatan yang diperolehi daripada pengiraan berat kering sampel. Berat kering sampel (g) dibahagikan dengan 10 ml metanol untuk mendapatkan kepekatan di dalam unit g/ml dan ini bermaksud setiap 1ml larutan mengandungi berat kering rizom yang dilarutkan. Apabila 20 μ l sampel ekstrak krud diambil untuk ujian maka pengiraan untuk berat ekstrak yang digunakan bagi setiap spesies kajian tersebut boleh dikira seperti didalam Jadual 3.3.

Jadual 3.2 : Berat ekstrak yang diperolehi dari berat asal sumber.

Spesies	Berat basah (g)	Berat kering (g)	Berat ekstrak (g) /peratus daripada berat kering (%)
<i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> (halia)	1000	117.26	11.80 / (10.1%)
<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia bara)	1000	124.83	19.72 / (15.8%)
<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia padi)	1000	128.70	17.88 / (13.9%)
<i>Z. zerumbet</i>	1000	108.53	19.90 / (18.3%)
<i>Z. ottensii</i>	1000	96.10	14.22 / (14.8%)
<i>Z. montanum</i>	1000	111.59	12.15 / (10.9%)
<i>K. galanga</i>	1000	88.94	8.20 / (9.3%)

Jadual 3.3 : Kepekatan sampel ekstrak berdasarkan berat kering (dalam 10 ml pelarut metanol) yang digunakan.

Spesies	Kepekatan (g/ml)	Berat ekstrak krud (g) di dalam 20 μ l larutan yang diuji
<i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> (halia)	11.73	0.24
<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia bara)	12.48	0.25
<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia padi)	12.87	0.26
<i>Z. zerumbet</i>	10.85	0.22
<i>Z. ottensii</i>	9.61	0.20
<i>Z. montanum</i>	11.16	0.22
<i>K. galanga</i>	8.89	0.18

3.3.2 Penentuan diameter zon perencatan tumbesaran bakteria

Pengiraan diameter zon perencatan dilakukan setelah media diinkubatkan di dalam suhu 37°C semalaman. Daripada bacaan yang diperolehi, hampir kesemua spesies menunjukkan keputusan positif ke atas bakteria gram-positif tetapi memberikan keputusan negatif terhadap bakteria gram-negatif. Purata zon perencatan ke atas *S. aureus* (ATCC29213) ialah antara 8.1±0.4 mm hingga 11.2±0.9 mm (Jadual 3.4). Manakala bagi bakteria *S. aureus* (ATCC24213) pula, purata zon-zon perencatan ialah antara 7.0±0.4 mm hingga 8.1±0.7 mm (Jadual 3.4).

Z. officinale var. *officinale* (halia) dan *Z. ottensii* menunjukkan penghasilan purata zon perencatan yang paling besar ke atas bakteria *S. aureus* (ATCC29213) (melebihi 10.0 mm) (Plat 2.1a dan 2.5a) dan *K. galanga* menghasilkan purata zon perencatan paling kecil (8.14±0.38 mm) (Plat 2.7a). Bagi *S. aureus* (ATCC24213), purata zon perencatan paling tinggi didapati pada *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi) (Plat 2.3b). Hanya *Z. officinale* var. *officinale* (halia) menunjukkan keputusan negatif terhadap bakteria tersebut (Plat 2.1b). Spesies-spesies lain seperti *Z. zerumbet*, *Z. ottensii*, *Z. montanum*, *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara) dan *K. galanga* menunjukkan penghasilan diameter zon perencatan yang sangat rendah (kurang daripada 8.0 mm), berbanding dengan aktiviti sampel spesies-spesies ke atas *S. aureus* (ATCC29213) di mana diameternya adalah di antara 8.0-10.0 mm (Plat 2.2b, 2.4b, 2.5b, 2.6b dan 2.7b).

Jadual 3.4 : Diameter zon perencatan ekstrak krud spesies kajian ke atas 4 strain
bakteria.

	<i>S. aureus</i> (ATCC29213) (mm)	<i>S. aureus</i> (ATCC24213) (mm)	<i>E. coli</i> (ATCC35213) (mm)	<i>E. coli</i> (ATCC25922) (mm)
<i>Z. officinale</i> var. <i>officinale</i> (halia)	11.21±0.86	-	-	-
<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia bara)	9.43±1.02	7.33±0.52	-	-
<i>Z. officinale</i> var. <i>rubrum</i> (halia padi)	8.93±0.67	8.13±0.74	-	-
<i>Z. zerumbet</i>	9.29±1.29	7.10±0.42	-	-
<i>Z. ottensii</i>	10.07±0.98	7.50±0.46	-	-
<i>Z. montanum</i>	8.50±1.00	7.03±0.42	-	-
<i>K. galanga</i>	8.14±0.38	7.69±0.37	-	-
Gentamisin (10µg)	26.65±1.46	24.71±2.28	17.07±0.74	20.09±1.19
Metanol	-	-	-	-

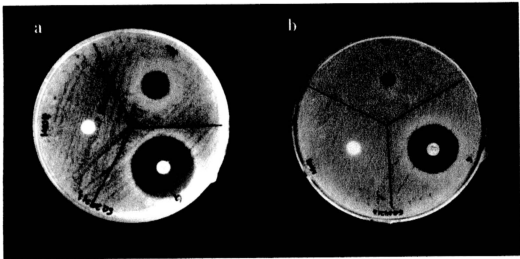
Petunjuk :

- (Tiada aktiviti)
- + (< 8.0 mm)
- ++ (8.0-10.0 mm)
- +++ (10.0-15.0 mm)
- ++++ (>15.0 mm)

Plat 3.1 : Zon perencatan spesies *Z. officinale* var. *officinale* (halia) ke atas

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).

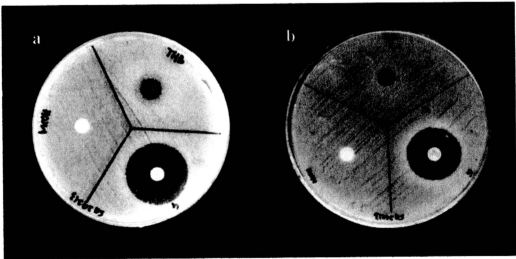


TH = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

Plat 3.2 : Zon perencatan spesies *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara) ke atas

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).

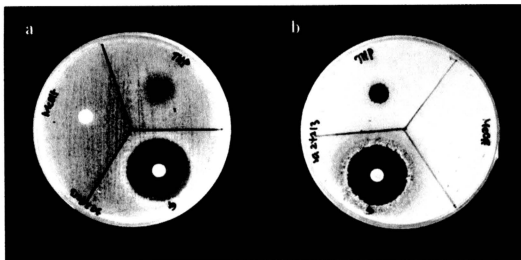


THB = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

Plat 3.3 : Zon perencatan spesies *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi) ke atas :

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).

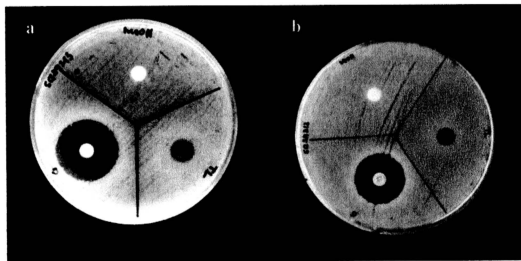


THP = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

Plat 3.4 : Zon perencatan spesies *Z. zerumbet* ke atas :

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).

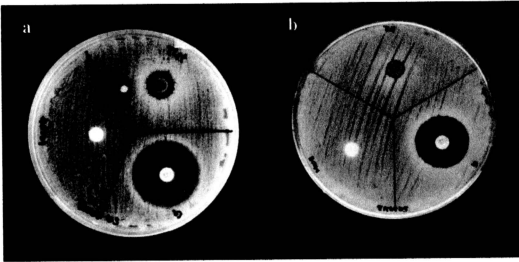


TL = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

Plat 3.5 : Zon perencatan spesies *Z. ottensii* ke atas :

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).

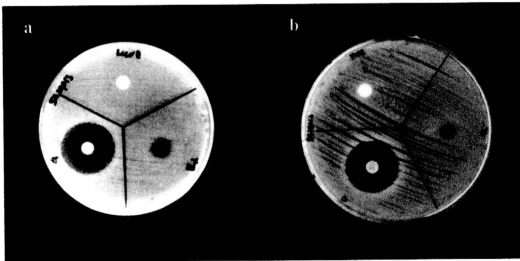


TLH = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

Plat 3.6 : Zon perencatan spesies *Z. montanum* ke atas :

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).

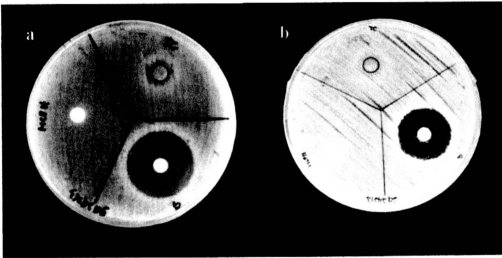


TB = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

Plat 3.7 : Zon perencatan spesies *K. galanga* ke atas :

a) *S. aureus* (ATCC29213) dan

b) *S. aureus* (ATCC24213).



TC = Sampel ekstrak; G = Gentamisin (kawalan positif); MeOH=metanol (kawalan negatif)

3.4 PERBINCANGAN

Kajian aktiviti antibakteria telah dilakukan ke atas spesies-spesies kajian memandangkan spesies-spesies daripada famili Zingiberaceae mempunyai banyak kegunaan dalam perubatan tradisional samada yang telah diuji secara *in vitro* ataupun secara amalan. Daripada kajian *in vitro* yang telah dilakukan, spesies daripada famili halia mempunyai kesan-kesan antimikrob seperti kesan antivirus (Denyer *et al.*, 1994), antibakteria (Mascolo *et al.*, 1989; Bone *et al.*, 1990) dan antikulat (Ejechi *et al.*, 1998). Terdapat juga laporan yang mengatakan terdapat beberapa sebatian yang jarang ditemui di dalam halia iaitu pinin, bisabolol dan kamfor yang terdapat dalam minyak pati tumbuhan ini. Sebatian-sebatian tersebut sebelum ini telah dikenalpasti sebagai sebatian antibakteria, antikulat dan antivirus (Lis-Balchin *et al.*, 1998). Dengan itu kemungkinan halia juga mempunyai kesan antibakteria dan antikulat dengan kehadiran sebatian-sebatian tersebut. Mascolo *et al.* (1989) pula telah melaporkan bahawa spesies halia boleh memberi kesan ke atas kedua-dua bakteria gram-positif dan gram-negatif seperti spesies *Clostridium*, *Listeria*, *Enterococcus* dan *Staphylococcus* tetapi kesan ini boleh dimusnahkan melalui pemanasan.

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi diameter zon yang dihasilkan seperti faktor kelembapan, saiz inokulum, kadar tumbesaran organisma, pengeraman bakteria di atas agar sebelum perletakan disk (pra-pengeraman) dan penyerapan ekstrak daripada disk sebelum pengeraman (pra-penyerapan) (Brown dan Blowers,

1978). Dalam kajian ini, faktor-faktor tersebut cuba diseragamkan bagi semua ujian yang dilakukan. Ini adalah untuk memastikan diameter zon perencatan yang dihasilkan adalah dipengaruhi oleh faktor yang sama pada setiap ujian.

Kaedah pra-pengeraman dilakukan untuk semua ujian. Daripada keputusan yang didapati, zon-zon perencatan kelihatan sangat kecil terutamanya pada bakteria gram positif iaitu *S. aureus* (ATCC24213) dan tiada kesan ke atas bakteria gram-negatif (*E. coli*). Berdasarkan Brown dan Blowers (1978), kaedah pra-pengeraman yang digunakan ini boleh mengurangkan saiz diameter zon perencatan berbanding dengan kaedah pra-penyerapan. Ini adalah kerana kaedah pra-pengeraman menggalakkan pertumbuhan bakteria terlebih dahulu sebelum disk diletakkan. Maka pertumbuhan bakteria telah menghampiri satu tahap dipanggil kepadatan kritikal (critical density of organism). Jika inokulum melebihi kepadatan kritikal ini, diameter zon tidak akan berlaku. Manakala apabila inokulum di bawah tahap kepadatan kritikal, maka zon perencatan dapat dihasilkan. Untuk mengelakkan perkara ini berlaku, perletakan disk ke atas plat agar bakteria dilakukan secepat yang mungkin sebelum pertumbuhan bakteria menghampiri kepadatan kritikal.

Selain daripada faktor di atas, ketebalan medium agar juga mempengaruhi diameter zon perencatan. Zon perencatan akan meningkat jika ketebalan agar dikurangkan (Baeur, 1964; Davis dan Stout, 1971; Barry dan Fay, 1973). Kesan ini lebih ketara jika medium agar yang disediakan adalah terlalu nipis dan perkara ini perlu dielakkan sama sekali. Ketebalan yang dicadangkan ialah kira-kira 4 mm.

Pada keseluruhannya sampel ekstrak krud spesies-spesies yang dikaji menunjukkan aktiviti antibakteria hanya ke atas bakteria gram-positif. Daripada bacaan diameter zon perencatan bakteria, didapati kesemuanya mempunyai kesan aktiviti ke atas bakteria *S. aureus* (ATCC29213). Dalam kajian ini walaupun halia, halia bara dan halia padi merupakan spesies yang sama tetapi berlainan ras, kesan perencatan yang dihasilkan adalah berbeza.

Dari jadual 3.4, *Z. officinale* var. *officinale* (halia) dan *Z. ottensii* menunjukkan diameter zon perencatan yang paling tinggi iaitu 11.21 ± 0.86 mm dan 10.07 ± 0.98 mm. Manakala halia bara dan halia padi memberi nilai bacaan 9.43 ± 1.02 dan 8.93 ± 0.67 mm iaitu kurang daripada *Z. ottensii*. Nilai-nilai yang berlainan juga diperolehi bagi lain-lain spesies iaitu *Z. zerumbet* (9.29 ± 1.29 mm), *Z. montanum* (8.50 ± 1.00) dan *K. galanga* (8.14 ± 0.38 mm). Diameter zon perencatan adalah paling rendah pada *K. galanga* di mana kemungkinan besar ianya adalah daripada genus yang lain dan kandungan bahan aktif juga berbeza kalau dibandingkan dengan genus *Zingiber*.

Bagi ujian ke atas bakteria *S. aureus* (ATCC24213), *Z. officinale* var. *rubrum* (halia padi) menghasilkan diameter zon yang paling tinggi iaitu 8.13 ± 0.74 mm, manakala *Z. officinale* var. *officinale* (halia) memberikan keputusan yang negatif dan *Z. officinale* var. *rubrum* (halia bara) pula hanya menghasilkan diameter zon yang sangat rendah iaitu 7.33 ± 0.52 mm. Keputusan yang berlainan untuk ujian kedua-dua strain bakteria gram-positif ke atas halia, halia bara dan halia padi ini mencadangkan

bahawa kemungkin terdapat perbezaan sebatian di antara ke tiga-tiga varieti tersebut. Spesies-spesies yang lain memberikan bacaan berbeza-beza iaitu *Z. zerumbet* (7.10 ± 0.40 mm), *Z. ottensii* (7.50 ± 0.46 mm), *Z. montanum* (7.03 ± 0.42 mm) dan *K. galanga* (7.69 ± 0.37 mm). Manakala gentamisin memberikan bacaan 24.71 ± 2.28 mm. Daripada bacaan-bacaan bagi diameter zon di atas, hampir kesemua spesies kajian menunjukkan zon perencatan di bawah 8.0 mm. Ini menunjukkan bahawa kesemua spesies kajian tidak memberi kesan antibakteria yang begitu kuat terhadap bakteria *S. aureus* (ATCC24213) berbanding dengan *S. aureus* (ATCC29213). Di sini boleh dikatakan bahawa bakteria *S. aureus* (ATCC24213) adalah lebih rintang terhadap sampel ekstrak krud dan gentamisin (kawalan positif) yang digunakan. Keadaan ini boleh dilihat daripada diameter zon perencatan pada kawalan positif tersebut iaitu 24.71 ± 2.28 mm berbanding dengan *S. aureus* (ATCC29213) yang lebih besar iaitu 26.65 ± 1.46 mm.

Kesemua ekstrak spesies kajian didapati tidak menunjukkan kesan ke atas bakteria gram-negatif. Keputusan ini mencadangkan bahawa ekstrak yang dihasilkan daripada spesies-spesies kajian adalah tidak sesuai untuk menjalani rawatan ke atas jangkitan bakteria gram-negatif yang diuji. Keputusan yang negatif ini adalah sudah diramalkan pada awal kajian memandangkan secara amnya, bakteria ini adalah lebih rintang berbanding dengan bakteria gram-positif (Martin, 1995; Paz *et al.*, 1995; Vlietinck *et al.*, 1995). Ia juga boleh dibuktikan daripada keputusan zon perencatan yang sangat kecil pada sekeliling disk gentamisin, iaitu pada bakteria *E.coli* (ATCC35213 dan ATCC25922), zon perencatan yang dihasilkan oleh

gentamisin hanyalah 17.07 ± 0.74 mm dan 20.09 ± 1.19 mm masing-masing. Diameter ini adalah lebih kecil daripada bakteri gram-positif yang diuji.

Keputusan-keputusan di atas mungkin berbeza jika spesies-spesies yang sama diambil dari kawasan yang berlainan. Oleh itu sampel kajian yang diambil adalah dipastikan bahawa ianya datang dari sumber penanaman yang sama. Seperti yang diketahui, kandungan bahan aktif di dalam tumbuhan boleh berubah bergantung kepada kawasan geografi, iklim dan persekitaran pertumbuhan dan juga masa atau waktu sampel diambil.