

#### 4.4 Aktiviti Antimikrob

Peningkatan kes-kes yang melibatkan mikroorganisma resistans kepada agen antimikrobial dikalangan pesakit yang dirawat menjadi kerunsingan dikalangan pakar perubatan (Struelens, 1998). Strain *Staphylococcus aureus* dan juga beberapa strain bakteria gram negatif merupakan antara mikroorganisma yang cenderung menjadi resistans kepada agen antimikrobial (Greenwood, 1998). Walaupun tiada sebarang kesukaran untuk merawat jangkitan bakteria pada masa kini, namun keupayaan mikroorganisma untuk berubah menjadi resistans terhadap agen antimikrobial merupakan satu ancaman kepada keberkesanan agen antimikrobial yang sedia ada (Ronald dan Jones, 1996). Maka, pencarian agen antimikrobial yang baru, selamat dan efektif dari sumber semulajadi seperti tumbuhan adalah perlu.

Dalam kajian ini, aktiviti antimikrob ekstrak *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dikaji. Ujian dijalankan ke atas beberapa strain bakteria dan kulat yang patogenik kepada manusia seperti *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35213, *Klasiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* dan *Aspergillus niger*.

#### 4.4.1 Penskrinan aktiviti antimikrob

Penskrinan aktiviti antimikrob ekstrak sampel dijalankan ke atas bakteria dan yis dengan menggunakan kaedah Ujian resapan disk manakala Ujian resapan agar digunakan ke atas kulat dermatofit. Ekstrak sampel diuji pada kepekatan 50, 100, 200 dan 400 mg/ml pada bakteria manakala untuk kulat, ekstrak diuji pada kepekatan 100, 200, 400 dan 800 mg/ml. Disk-disk yang mengandungi ekstrak sampel pada kepekatan berbeza diletakkan pada permukaan agar yang terlebih dahulu telah diinokulasikan dengan mikrob. Diameter zon rencatan yang melebihi 7 mm menandakan ekstrak adalah aktif.

Keputusan yang diperolehi menunjukkan ekstrak sampel *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. merencat pertumbuhan enam strain daripada sepuluh strain bakteria yang dikaji dan tiada sebarang perencatan ke atas strain yis dan kulat. Strain-strain bakteria yang direncat oleh ekstrak sampel terdiri daripada bakteria gram positif dan gram negatif iaitu *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Proteus vulgaris* (lihat Jadual 3.9 hingga Jadual 3.12).

Hanya dua strain bakteria gram negatif yang direncat mungkin disebabkan keadaan semula jadi bakteria gram negatif yang mempunyai membran fosfolipik luaran pada dinding sel menjadikan ia lebih resistans kepada sebatian lipofilik berbanding bakteria gram positif (Nikaido dan Vaara, 1985; Tomas-Barberan *et al.*, 1988).

Hasil yang diperolehi ini berbeza dengan kajian yang telah dijalankan oleh Darah dan Halim (1995), dimana ekstrak etanol 95% daun *Cassia alata* L. merencat strain kulat dermatofit tetapi tiada sebarang perencatan ke atas strain bakteria. Kajian yang dijalankan oleh Somchit *et al.*, (2003) pula mendapati bahawa ekstrak air dan etanol daun *Cassia alata* L. merencat strain bakteria *Staphylococcus aureus* tetapi tidak merencat strain yis *Candida albicans* berbanding ekstrak air dan etanol batang *Cassia alata* L. yang hanya merencat strain yis *Candida albicans*.

Mastura dan Khozirah (2000), melaporkan ekstrak metanol daun *Senna alata* L. merencat strain bakteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermis* tetapi tiada rancangan terhadap strain yis dan kulat dermatofit. Kajian yang dijalankan oleh Ogunti *et al.*, (1991) juga mendapati ekstrak metanol daun *Cassia alata* L. merencat strain bakteria yang dikaji tetapi tiada rancangan ke atas strain kulat, sama dengan penemuan yang diperolehi dalam kajian ini.

Menurut Acharya dan Chaterjee (1975), komponen kimia utama yang bersifat antikulat dipencilkan dari biji *Cassia tora* L. adalah asid krisofanik-9-antron. Pongpaichit *et al.*, (2004) pula melaporkan ekstrak metanol daun *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. dan *Cassia tora* L. menunjukkan aktiviti antikulat ke atas strain kulat *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* dan *Penicillium marneffeii*. Perbezaan pada hasil yang diperolehi dengan kajian-kajian terdahulu mungkin disebabkan oleh faktor-faktor lain yang boleh mempengaruhi hasil keputusan seperti keadaan persekitaran dan cuaca di mana sampel diperolehi, jenis ekstrak yang diuji, jenis pengekstrakan yang dijalankan, jenis ujian antimikrob dan juga jenis mikroorganisma yang diuji (Ncube *et al.*, 2008).

#### 4.4.2 Aktiviti antimikrob secara kuantitatif

Kajian antimikrob secara kuantitatif dijalankan dengan asai Kepekatan Rencatan Minimum (MIC) dan Kepekatan Bakterisidal Minimum (MBC) menggunakan sebatian kimia yang telah berjaya dipencilkan dari ekstrak *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. MIC adalah kepekatan paling minimum yang diperlukan untuk merencat pertumbuhan mikroorganisma manakala MBC pula adalah kepekatan paling minima yang berkeupayaan untuk membunuh mikroorganisma 99.9% (Frost, 1994). Kaedah yang digunakan untuk menjalankan asai MIC dalam kajian ini melibatkan penggunaan plat mikrotiter 96-telaga. Ini adalah kerana kuantiti sebatian kimia yang dipencilkan dari ekstrak sampel adalah sangat sedikit maka kaedah yang memerlukan kuantiti yang agak besar seperti asai pencairan bersiri kaldu menggunakan tabung uji adalah tidak sesuai (Eloff, 1998).

Sebatian kimia yang diuji adalah sebatian kimia CA-10 dari ekstrak etil asetat *Cassia alata* L. dan sebatian kimia CT-16 pula dari ekstrak kloroform *Cassia tora* L. Strain-strain bakteria yang diuji adalah strain yang menunjukkan perencatan semasa diuji dengan Ujian resapan disk iaitu *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Proteus vulgaris*. Ujian secara kuantitatif ini juga dijalankan menggunakan antibiotik kloramfenikol sebagai kawalan positif.

Nilai MIC diambil pada kepekatan paling rendah yang menunjukkan tiada pertumbuhan bakteria berdasarkan kekeruhan yang boleh dilihat. Dalam kajian ini, garam tetrazolium digunakan untuk melihat kekeruhan pada telaga-96 plat mikrotiter dengan lebih jelas. Garam tetrazolium merupakan sebatian yang tidak berwarna berubah

menjadi derivatif formazan berwarna ungu melalui tindakbalas enzim oleh mikroorganisma (Eloff, 1998). Warna ungu yang terhasil menandakan kewujudan bakteria. Nilai MBC pula ditentukan dengan mensubkulturkan inokulum dari telaga yang memberikan nilai MIC pada plat agar dan tiada sebarang pertumbuhan bakteria dikesan. Nilai MIC dan MBC bagi sebatian kimia CA-10 dan CT-16 ditunjukkan pada Jadual 3.15 dan 3.16.

Berdasarkan keputusan yang diperolehi, didapati sebatian kimia CA-10 menunjukkan aktiviti antimikrob yang kuat ke atas strain *Bacillus subtilis* dan *Proteus vulgaris* dengan memberikan nilai MIC 31.25 µg/ml dan 3.91 µg/ml. Ia menunjukkan kesan yang sederhana ke atas strain *Pseudomonas aeruginosa* dengan nilai MIC 62.50 µg/ml. Manakala kedua-dua strain *Staphylococcus aureus* agak resistans ke atas sebatian kimia CA-10 dengan nilai MIC yang sama iaitu 250 µg/ml dan tiada rencatan ke atas strain *Micrococcus luteus* pada kepekatan yang lebih rendah daripada 500 µg/ml.

Sebatian kimia CT-16 pula menunjukkan kesan antibakteria yang lebih luas dimana ia menunjukkan rencatan kuat ke atas strain-strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dan *Proteus vulgaris* dengan nilai MIC 31.25 µg/ml dan juga ke atas strain *Pseudomonas aeruginosa* dengan nilai MIC 15.63 µg/ml. Rencatan ke atas strain *Bacillus subtilis* pula agak lemah dengan nilai MIC 250 µg/ml dan ia tidak aktif ke atas strain *Micrococcus luteus* pada kepekatan kurang dari 500 µg/ml.

Nilai MBC sebatian kimia CA-10 ke atas strain *Proteus vulgaris* dan kedua-dua strain *Staphylococcus aureus* adalah sama dengan nilai MIC yang diperolehi iaitu 3.91 µg/ml dan 250 µg/ml. Ia menunjukkan kesan bakterisidal ke atas strain *Bacillus subtilis* pada 62.50 µg/ml manakala nilai MBC pada strain *Pseudomonas aeruginosa* pula ialah 125 µg/ml. Sebatian kimia CT-16 pula memberikan nilai MBC ke atas strain *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Proteus vulgaris* sama dengan nilai MIC iaitu 250 µg/ml, 15.63 µg/ml dan 31.25 µg/ml masing-masing. Kesan bakterisidal sebatian kimia CT-16 ke atas kedua-dua strain *Staphylococcus aureus* adalah 62.50 µg/ml. Oleh disebabkan nilai MIC kedua-dua sebatian kimia menunjukkan ia tidak aktif ke atas strain *Micrococcus luteus* maka nilai MBC ke atas strain tersebut tidak ditentukan.

Antibiotik kloramfenikol juga digunakan dalam ujian antimikrob ini sebagai kawalan positif. Kesan antimikrob kloramfenikol ke atas strain *Bacillus subtilis* dan *Micrococcus luteus* adalah lebih kuat berbanding sebatian kimia CA-10 dan CT-16 dengan nilai MIC pada 6.25 µg/ml. Namun begitu aktiviti antimikrob kloramfenikol sama dengan sebatian kimia CA-10 pada 62.50 µg/ml ke atas strain *Pseudomonas aeruginosa* tetapi lebih rendah daripada sebatian kimia CT-16. Kloramfenikol merencat strain *Proteus vulgaris* dengan nilai MIC 15.63 µg/ml iaitu tinggi daripada nilai MIC sebatian kimia CA-10 dan rendah sedikit daripada sebatian kimia CT-16.

Berdasarkan analisis spektrum dan perbandingan dengan data dari kajian terdahulu, sebatian kimia CA-10 dikenalpasti sebagai emodin (**9**) dan sebatian kimia CT-16 pula ialah kaempferol (**3**). Kedua-dua sebatian tersebut merupakan sebatian dari kumpulan fenolik. Kebanyakan sebatian fenolik yang disintesis oleh tumbuhan merupakan tindakbalas kepada jangkitan mikrobial. Ini juga merupakan faktor mengapa sebatian fenolik mempunyai ciri-ciri antimikrob (Ncube *et al.*, 2008).

Perencatan mikrob oleh sebatian fenolik dipercayai melalui beberapa jenis mekanisma seperti perencatan ke atas enzim hidrolitik seperti protease dan karbohidrolase, pentakaktifan pelekatan mikrob, pentakaktifan protein sampul sel dan sebagainya (Cowan, 1999). Scalbert (1991), menyatakan sebatian fenolik merencat mikroorganisma melalui deprivasi zat besi atau melalui pengikatan hidrogen dengan enzim mikrob.

Hasil kajian ini adalah sama dengan yang dilaporkan oleh Ayo *et al.*, (2007), dimana emodin (**9**) yang dipencilkan dari ekstrak etil asetat daun *Cassia nigricans* Vahl merencat beberapa strain bakteria gram positif dan negatif iaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Kajian yang dijalankan oleh Hatano *et al.*, (1999), mendapati emodin (**9**) yang diasingkan dari biji benih *Cassia tora* berkeupayaan merencat empat strain *Staphylococcus aureus* Resistans-Metisilin (MRSA) dan sejenis strain *Staphylococcus aureus* Sensitif-Metisilin (MSSA). Manakala, Chukwujekwu (2006) pula melaporkan sebatian kimia emodin (**9**) yang dipencilkan dari ekstrak etanol akar *Cassia occidentalis* hanya merencat strain bakteria gram positif.

Keputusan dari kajian oleh Adeloye *et al.*, (2007), mendapati kaempferol (**3**) yang diasingkan dari daun *Urena lobata* L. merencat strain bakteria gram positif, gram negatif dan yis. Manakala, kaempferol (**3**) dari bunga *Linum capitatum* Kit. pula berkeupayaan merencat *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* tetapi tidak merencat *Pseudomonas aeruginosa* (Slavica *et al.*, 2004). Kaempferol (**3**) yang berjaya dipencil dalam kajian ini merencat kesemua strain bakteria gram positif yang diuji dan dua strain bakteria gram negatif iaitu *Proteus vulgaris* dan *Pseudomonas aeruginosa* kecuali *Micrococcus luteus* yang resistans pada kepekatan kurang daripada 500 µg/ml.

Daripada keputusan yang diperolehi dalam kajian ini, dicadangkan *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. berpotensi untuk dibangunkan sebagai sumber agen antimikrobial yang baru. Kajian lanjutan perlu dilakukan untuk mengenalpasti mekanisma perencatan oleh sebatian kimia dari bahagian lain tumbuhan tersebut.