

BAB DUA

BAHAN DAN KAEDAH

2.1 Sumber sampel

Sampel tumbuhan yang dikaji dalam penyelidikan ini adalah *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. Kesemua sampel tersebut dikutip di sekitar Felda Lawin Selatan, Gerik, Perak. Bahagian tumbuhan yang digunakan adalah bahagian daun. Sampel dikeringkan di dalam oven pada suhu 40⁰C selama 4 hari.

2.2 Pengekstrakan sampel

Sampel yang telah dikeringkan dikisar dengan alat pengisar. Kemudian, setiap sampel diekstrak secara refluks dengan menggunakan soxhlet. Pengekstrakan untuk sampel *Cassia alata* L. dimulakan dengan pelarut petroleum eter (40-60⁰C), diklorometana, etil asetat dan etanol 96%.

Sampel *Cassia tora* L. pula diekstrak dengan menggunakan pelarut petroleum eter (40-60⁰C), kloroform dan aseton. Kesemua hasil ekstrak dikeringkan dengan menggunakan rotowap (Büchi) pada suhu 50⁰C untuk menghasilkan ekstrak mentah. Ekstrak ini disimpan di dalam peti sejuk sehingga diperlukan.

2.3 Instrumentasi

Takat lebur dirakamkan dengan alatan takat lebur Fisher John. Spektrum ultralembayung (UL) diperolehi dengan melarutkan sampel dalam MeOH atau EtOH dan diukur dengan Spektrofotometer Shimadzu Model 160-A. Spektrum inframerah dirakamkan dengan menggunakan alat Spektrofotometer Inframerah Transformasi Fourier Model Perkim Elmer 2000 dengan cakera KBR. Spektrum resonans magnet nukleus (RMN¹H dan ¹³C) dirakamkan pada 400 MHz oleh Spektrometer RMN (JEOL). Data RMN dinyatakan dalam δ ppm dan pemalar gandingan, *J* diberikan dalam Hz. Spektrum jisim (SJ) dirakamkan dengan Spektrometer Jisim Hewlett–Packard Model 6890 bergabung dengan Kromatografi Gas Hewlett-Packard Model 6890.

2.4 Keterangan Am Eksperimen

2.4.1 Kromatografi Lapisan Nipis (KLN)

Plat silika gel pra-lapisan (Kieselgel 60 PF₂₅₄, Merck) yang telah dititiskan dengan sampel dimasukkan ke dalam tangki kromatografi yang telah ditepukan dengan sistem pelarut yang sesuai terlebih dahulu selama 30 minit. Tiga jenis sistem pelarut digunakan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.1.

Jadual 2.1: Sistem pelarut

Sistem	Pelarut	Kuantiti
I	Toluena : Etil asetat : Asid asetik	50 : 48 : 2
II	Toluena : Etil asetat : Asid asetik	75 : 20 : 5
III	Petroleum eter : Etil asetat : Asid formik	75 : 25 : 1

Kedudukan komponen-komponen yang terpisah dikesan di bawah cahaya nampak, didedahkan pada wap iodin dan disembur dengan reagen Dragendoff, reagen Kalium hidroksida, reagen Vanillin-asid sulfurik dan reagen Anisaldehyd-asid sulfurik.

Nilai R_f (faktor penahanan) bagi setiap komponen diukur berdasarkan hubungan berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak komponen bergerak}}{\text{Jarak muka pelarut}}$$

2.4.1.1 Reagen penyembur KLN

a) Reagen Dragendorff

Reagen ini boleh mengesan sebatian alkaloid. Penyediaan reagen dilakukan seperti berikut:

Larutan A : 0.85 g Bismut nitrat basik (BiNO_3) dilarutkan dalam 100 ml campuran

asid asetik dan 40 ml air suling.

Larutan B : 8 g Potassium iodida dilarutkan dalam 20 ml air suling.

Reagen penyembur disediakan dengan mencampurkan 5 ml larutan A dan 5 ml larutan B dalam campuran 20 ml asid asetik dan 70 ml air suling.

b) Reagen 10% Metanolik Kalium Hidroksida (KOH)

Reagen ini digunakan untuk mengesan sebatian kuinon dan kuomarin. Reagen ini disediakan dengan melarutkan 10 g Kalium hidroksida dalam 100 ml metanol.

c) Reagen Vanillin-Asid Sulfurik

Reagen Vanillin-asid sulfurik digunakan untuk menentukan kehadiran sebatian terpenoid. Ia disediakan seperti berikut:

Larutan A : 5% etanolik asid sulfurik

Larutan B : 1% etanolik vanillin

Plat KLN disemur dengan Larutan A dan kemudian dengan Larutan B pula. Selepas itu plat dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 minit sehingga terbentuk bintik-bintik berwarna ungu.

d) Reagen Anisaldehyd-Asid Sulfurik

Reagen ini digunakan untuk mengesan sebatian flavanoid dan minyak meruap yang hadir dalam sampel. Penyediaan reagen ini adalah dengan mencampurkan 0.5 ml anisaldehyd dengan 10 ml asid asetik glasial diikuti dengan 85 ml metanol dan 5 ml asid sulfurik pekat. Reagen ini mempunyai kestabilan yang terhad, apabila ia bertukar warna menjadi merah-ungu ia sudah tidak boleh digunakan lagi.

2.4.2 Kromatografi turus (KT)

Kaedah kromatografi turus digunakan untuk menyisahkan sebatian kimia yang terdapat di dalam ekstrak mentah. Turus yang digunakan ialah 75 sm panjang dan bergaris pusat 3 sm. Turus dibersihkan dan dikeringkan. Turus ditegakkan dengan pemegangnya dan disumbatkan dengan kapas kaca di bahagian hujung turus. Sedikit pelarut dimasukkan dan dipastikan tiada gelembung.

Silika gel 60 (0.063-0.200 mm) dikacau dengan kloroform sehingga homogen dan kemudian dituangkan ke dalam turus. Turus diketuk perlahan-lahan supaya silika padat dan tiada gelembung. Turus dibiarkan semalaman.

Sampel dilarutkan dengan sedikit pelarut dan dimasukkan di bahagian atas silika dengan penitis dan pastikan sampel telah meresap ke dalam silika. Sedikit pasir dimasukkan sehingga meliputi bahagian atas sampel untuk melindungi sampel daripada sebarang gangguan semasa penambahan pelarut.

Kemudian barulah pelarut dimasukkan sehingga memenuhi turus dan pengelusian dimulakan. Kekutuban sistem pelarut ditingkatkan perlahan-lahan supaya pemisahan komponen berlaku dengan sempurna. Eluen sebanyak 5 ml dikumpulkan dalam bekas vial dan diuji dengan KLN. Hasil eluen yang mempunyai nilai R_f yang sama dicampurkan bersama.

2.5 Ujian antimikrob

2.5.1 Mikroorganisma ujian

Sebanyak 10 strain bakteria, 4 strain kulat dan 1 strain yis digunakan dalam ujian antimikrob ini. Kesemua strain bakteria dan kulat diperolehi dari Bahagian Bioteknologi, Institut Penyelidikan Perhutanan Malaysia (FRIM) dan Jabatan Mikrobiologi Perubatan, Fakulti Perubatan, Universiti Malaya. Jenis-jenis bakteria dan kulat yang digunakan disenaraikan seperti dalam Jadual 2.2.

Jadual 2.2 : Senarai mikroorganisma ujian

Jenis	Strain
1) Bakteria Gram Positif	a) <i>Bacillus subtilis</i> b) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 c) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 d) <i>Micrococcus luteus</i>
2) Bakteria Gram Negatif	a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> b) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 c) <i>Escherichia coli</i> ATCC 35213 d) <i>Klasiella pneumonia</i> e) <i>Proteus vulgaris</i> f) <i>Proteus mirabilis</i>
3) Yis	a) <i>Candida albicans</i>

4) Kulat	a) <i>Microsporum canis</i> b) <i>Trichophyton rubrum</i> c) <i>Trichophyton mentagrophytes</i> d) <i>Aspergillus niger</i>
----------	--

2.5.2 Media untuk pengkulturan mikrob

Empat jenis media kultur digunakan untuk pengkulturan mikrob seperti yang disenaraikan dalam Jadual 2.3. Media-media kultur tersebut disediakan mengikut spesifikasi yang diberikan oleh pengilang dan disterilkan secara autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 minit. Media agar yang steril dituangkan ke dalam piring petri sebanyak 20 ml dan dibiarkan ia membeku. Media kaldu pula dituangkan ke dalam botol universal yang hendak digunakan.

Jadual 2.3: Senarai media untuk pengkulturan mikrob

Media	Kegunaan
Agar Mueller-Hinton (OXOID)	Pengkulturan bakteria dan ujian antibakteria secara kuantitatif.
Kaldu Mueller-Hinton (OXOID)	Pengkulturan bakteria.
Agar Sabouraud Dekstrosa (OXOID)	Pengkulturan kulat dan ujian antikulat secara kuantitatif.
Kaldu Sabouraud Dekstrosa (OXOID)	Pengkulturan kulat.

2.5.3 Penyediaan inokulum piawai

Suspensi bakteria dan yis disediakan dengan menyelaraskan kepadatan kultur sama dengan kekeruhan 0.5 Piawai Mc Farland yang dianggarkan mengandungi 10^8 unit pembentuk koloni (UPK)/ml dari kultur kaldu yang telah diinkubasikan semalaman pada suhu 37°C . Ia juga boleh ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan bacaan absorbans 0.08- 0.1 ($\text{OD } 625 = 0.08\text{-}0.1$) seperti yang telah dijelaskan oleh Dani *et al.*, (1999). Bakteria dikulturkan di dalam Kaldu Mueller-Hinton dan yis pula dikulturkan di dalam Kaldu Sabouraud Dekstrosa.

Penyediaan suspensi konidia disediakan dengan menuangkan 20 ml kaldu yang telah dicampurkan dengan 1 titik Tween 80 (Sigma P-8074) ke atas kultur *Aspergillus niger* yang telah dikulturkan selama 3 hari dan kultur *Trichophyton mentagrophytes* yang berusia 2 minggu. Kultur *Aspergillus niger* dan *Trichophyton mentagrophytes* dibiakkan pada media agar condong Sabouraud Dekstrosa pada suhu 37°C dan 27°C masing-masing.

Selepas dihomogenkan dengan manik kaca, kepekatan suspensi konidia ditentukan pada 10^6 konidia/ml dan 10^8 konidia/ml masing-masing dengan menggunakan hemositometer. Suspensi bakteria, yis dan konidia kulat disediakan setiap kali sebelum ujian antimikrob dijalankan.

2.5.4 Ujian Antimikrob Secara Kualitatif

2.5.4.1 Ujian Resapan Disk

Ujian resapan disk ini dijalankan mengikut kaedah yang telah diterangkan oleh Bauer *et. al.*, (1966). Suspensi bakteria dan yis yang telah disediakan tadi dicairkan kepada kepekatan 10^6 sel/ml dan 10^5 sel/ml, masing-masing. Suspensi bakteria disapukan di atas permukaan agar Mueller-Hinton dan suspensi yis pula pada agar Sabouraud Dekstrosa. Putik kapas yang steril digunakan untuk mensapukan suspensi bakteria dan yis.

Ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. digunakan sebagai ekstrak ujian. Ekstrak-ekstrak ini dilarutkan dalam pelarut metanol pada kepekatan 50, 100, 200 dan 400 mg/ml dan 10 μ l ekstrak dipipetkan ke atas disk yang steril (diameter 6 mm) dan dibiarkan kering. Kemudian disk-disk ini diletakkan pada permukaan agar.

Antibiotik kloramfenikol dan 5-florositosina pada kepekatan 1 mg/ml digunakan sebagai rujukan positif untuk bakteria dan kulat. Disk kosong dan disk yang mengandungi pelarut metanol dijadikan rujukan negatif. Pengeraman dilakukan pada suhu 37°C selama 18 jam. Diameter zon rencatan yang terbentuk diukur selepas pengeraman. Ujian dijalankan sebanyak tiga kali.

2.5.4.2 Ujian Resapan Agar

Ujian resapan agar ini dijalankan mengikut kaedah yang telah diterangkan oleh Arnone *et al.*, (1994). Suspensi konidia kulat yang telah disediakan dicairkan 10 kali dengan agar cair Sabouraud Dekstrosa pada suhu 40⁰C dan dituangkan sebanyak 20 ml pada setiap piring petri. Ekstrak ujian pada kepekatan 100, 200, 400 dan 800 mg/ml dipipetkan pada disk-disk kosong yang steril. Disk yang kering diletakkan di atas agar yang telah mengeras.

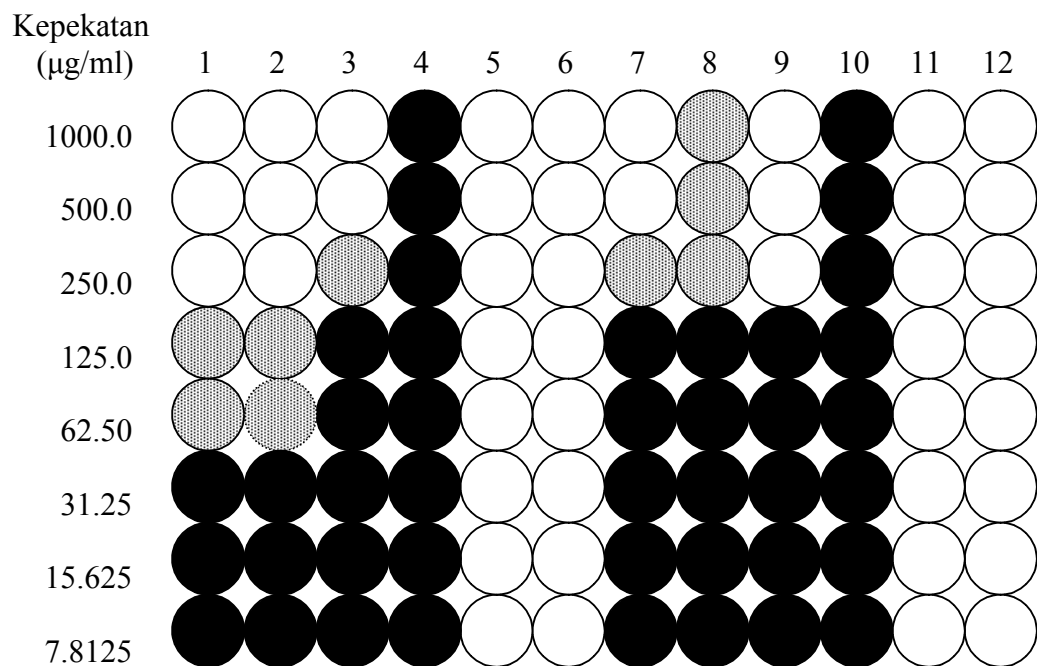
Antibiotik 5-florositosina pada kepekatan 1 mg/ml, disk kosong dan disk yang mengandungi pelarut metanol digunakan sebagai rujukan. *Aspergillus niger* dieram dalam inkubator pada suhu 37⁰C manakala *Trichophyton mentagrophytes* pula dieram pada suhu bilik (27⁰C) selama 3 hari. Setiap ujian diulang sebanyak tiga kali.

2.5.5 Ujian Antimikrob Secara Kuantitatif

2.5.5.1 Kepekatan Rencatan Minimum (MIC)

Ujian penentuan kepekatan rencatan minimum ini dijalankan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Eloff (1998), Frost (1994), Dickson *et al.*, (2007) dan Magee *et al.*, (2007) dengan sedikit pengubahsuaian. Ujian ini dijalankan untuk menentukan aktiviti antimikrob sebatian tulen dari *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. secara kuantitatif.

Sebatian tulen disediakan pada kepekatan 2 mg/ml dengan pelarut DMSO di dalam botol yang steril. Larutan stok dituras dengan 0.2 μm penapis pirogenik untuk pensterilan dan kemudian ia dicairkan secara bersiri pada kepekatan 1000 $\mu\text{g/ml}$ hingga 7.8 $\mu\text{g/ml}$. Plat mikrotiter 96-telaga digunakan dalam ujikaji ini. 100 μl larutan stok diisikan pada setiap telaga mengikut kepekatan seperti yang ditunjukkan pada Rajah 2.1.



Rajah 2.1 : Susun atur MIC pada plat mikrotiter 96-telaga

Petunjuk :

- = tiada pertumbuhan bakteria
- = ada pertumbuhan bakteria
- ◐ = nilai MIC (kepekatan paling rendah yang menunjukkan tiada pertumbuhan bakteria)

Antibiotik kloramfenikol pada kepekatan 200 µg/ml digunakan sebagai kawalan positif dan stok larutan yang mengandungi DMSO, medium dan inokulum merupakan kawalan negatif. Sebanyak 100 µl antibiotik kloramfenikol diisikan pada telaga di baris 5 dan 11 manakala stok larutan kawalan negatif pula diisikan pada telaga di baris 4 dan 10 (lihat Rajah 2.1). Kultur piawai mikrob (lihat 2.5.3) dicairkan 10 kali iaitu kepekatan akhir bakteria dianggarkan 10^5 unit pembentuk koloni (UPK)/ml. 20 µl inokulum piawai mikrob diisikan pada setiap telaga. 100 µl medium ditambahkan pada setiap telaga kecuali telaga yang mengandungi antibiotik. Kepekatan akhir sebatian tulen yang diuji adalah pada 500 µg/ml hingga 3.91 µg/ml. Kesemua plat diinkubasi semalaman pada suhu 37 °C.

Pertumbuhan bakteria dikesan dengan penambahan 20 µl larutan garam tetrazolium 5% (MTT) pada setiap telaga dan diinkubasikan sekali lagi selama 30 minit. Telaga yang terdapat perubahan warna menunjukkan ada pertumbuhan bakteria manakala telaga yang tiada berlaku sebarang perubahan warna menandakan pertumbuhan bakteria telah direncat oleh sebatian tulen yang diuji.

2.5.5.2 Kepekatan Bakterisidal Minimum (MBC)

Ujian ini adalah untuk menentukan kepekatan minimum yang diperlukan untuk membunuh kesemua bacteria. Ujian ini dijalankan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Waterworth (1978). Dipipetkan sedikit kandungan dari telaga yang menunjukkan kesan rencatan minimum (MIC) ke atas plat agar Mueller-Hinton yang telah disediakan. Plat-plat agar ini diinkubasikan semalaman pada suhu 37°C. Plat yang menunjukkan tiada sebarang pertumbuhan bakteria merupakan kepekatan bakterisidal minimum (MBC).

2.6 Ujian Penskrinan Antioksidan

2.6.1 Asai Pelupusan Radikal Bebas DPPH

Aktiviti antioksidan bagi kedua-dua sampel ekstrak diuji dengan menggunakan kaedah pelupusan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) seperti yang telah dijelaskan oleh Sanchez *et al.*, (1998) dan Cheung *et al.*, (2003) dengan sedikit pengubahsuaian.

2.6.1.1 Penyediaan stok larutan

Stok larutan setiap ekstrak disediakan pada kepekatan 20 mg/ml. Ekstrak dilarutkan dalam metanol dan disediakan dalam tiub pengempar mikro 1.5 ml.

2.6.1.2 Penyediaan Asid Askorbik (AA) dan Butil Hidroksianisol (BHA)

Stok asid askorbik dalam metanol disediakan pada kepekatan 400 µg/ml. Larutan stok disimpan di dalam kelalang kon yang dibalut dengan kertas aluminium.

2.6.1.3 Penyediaan DPPH

Stok DPPH dalam metanol disediakan pada kepekatan 8 mg/ml. Larutan stok disimpan di dalam kelalang kon yang dibalut dengan kertas aluminium.

2.6.1.4 Asid Askorbik (AA) dan Butil Hidroksianisol (BHA) sebagai Rujukan Kawalan Positif

Campuran tindakbalas antara asid askorbik, DPPH dan metanol disediakan mengikut Jadual 2.4

Jadual 2.4: Penyediaan campuran tindakbalas antara AA/BHA, DPPH dan metanol

Kepekatan AA/ BHA ($\mu\text{g/ml}$)	Isipadu Metanol (μl)	Isipadu Asid Askorbik (μl)	Isipadu larutan DPPH (μl)
200.00	475.00	500.00	25.0
100.00	725.00	250.00	25.0
50.00	850.00	125.00	25.0
25.00	912.50	62.50	25.0
12.50	943.75	31.25	25.0
6.25	959.38	15.63	25.0
3.12	967.19	7.81	25.0
1.56	971.09	3.91	25.0
Kawalan negatif	975.00	-	25.0

Campuran tindakbalas ini diinkubasikan dalam bilik gelap pada suhu bilik selama 30 minit untuk ia bertindakbalas. Ketumpatan optik (OD) setiap campuran diukur pada panjang gelombang 520 nm. Metanol digunakan sebagai larutan blank. Radikal DPPH tanpa antioksidan dijadikan sebagai kawalan negatif.

2.6.1.5 Penyingkapan/Penskrinan Kesan Pelupusan Radikal Bebas DPPH pada ekstrak

Campuran tindakbalas antara ekstrak (20 mg/ml), DPPH (8 mg/ml) dan metanol disediakan mengikut Jadual 2.5.

Jadual 2.5: Penyediaan campuran tindakbalas antara ekstrak, DPPH dan metanol.

Kepekatan Ekstrak (mg/ml)	Isipadu Metanol (µl)	Isipadu Ekstrak (µl)	Isipadu larutan DPPH (µl)
5	725.00	250	25.0
Kawalan	975.00	-	25.00

2.6.1.6 Penentuan Peratus Rencatan

Peratus perencatan setiap sampel yang telah diuji akan ditentukan secara pengiraan mengikut formula berikut:

$$\% \text{ perencatan} = \frac{\text{OD kawalan} - \text{OD sampel}}{\text{OD kawalan}} \times 100\%$$

Ekstrak yang memberikan kesan perencatan sebanyak 50 % atau lebih pada kepekatan 5 mg/ml adalah positif dan diuji dengan lebih lanjut pada kepekatan 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml dan 1 mg/ml untuk menentukan nilai IC_{50} (Kepekatan Rencatan 50) seperti yang ditunjukkan pada Jadual 2.6. Nilai IC_{50} ialah kepekatan ekstrak yang merencat sebanyak 50% (Chiang *et al.*,2003) dan nilai IC_{50} bagi setiap ekstrak diperolehi dari graf dengan bacaan absorbans pada panjang gelombang 520 nm melawan kepekatan ekstrak.

Jadual 2.6: Penyediaan campuran tindakbalas antara ekstrak positif, larutan DPPH dan metanol

Kepekatan Ekstrak (mg/ml)	Isipadu Metanol (μ l)	Isipadu Ekstrak (μ l)	Isipadu larutan DPPH (μ l)
5	725	250	25.0
4	775	200	25.0
3	825	150	25.0
2	875	100	25.0
1	925	50	25.0
Kawalan	975	-	25.0

Setiap ujian diulang sebanyak tiga kali. Kaedah yang sama digunakan untuk mencari nilai IC_{50} bagi asid askorbik dan BHA sebagai rujukan positif.

2.6.2 Asai Pengurangan Kuasa

Keupayaan pengurangan/penurunan kuasa pada setiap ekstrak ditentukan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Oyaizu, 1986. Setiap ekstrak disediakan pada kepekatan 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml dan 20 mg/ml dalam metanol dan 2.5 ml (0.2 M) larutan penimbal fosfat (pH 6.6) dan 2.5 ml 1% larutan potassium ferik sianida ditambahkan.

Campuran larutan tersebut diinkubasikan dalam pengukus air pada suhu 50°C selama 20 minit. Selepas itu, 2.5 ml 10% larutan asid trikloroasetik (TCA) ditambahkan dan campuran diempar pada kelajuan 1,000 rpm selama 10 minit. Sebanyak 2.5 ml lapisan atas larutan supernatan (lapisan atas) diambil dan ditambahkan dengan 2.5 ml air suling serta 0.5 ml 0.1% larutan ferik klorida. Absorbans setiap campuran diambil secara spektrofotometri pada panjang gelombang 700 nm.

Peningkatan dalam bacaan absorbans menunjukkan keupayaan pengurangan kuasa yang lebih baik. Nilai min bagi setiap bacaan dikira. Graf diplotkan dengan bacaan absorbans pada panjang gelombang 700nm melawan kepekatan ekstrak. Asid askorbik (AA) dan Butil Hidroksianisol (BHA) digunakan sebagai kawalan positif.

2.6.3 Asai Pelunturan β -karotena

Aktiviti antioksidan ekstrak mentah metanol kedua-dua sampel tumbuhan ditentukan dengan mengikut asai pelunturan β -karotena seperti yang telah dijelaskan oleh Cheung *et al.*, (2003); Suja *et al.*, (2005) dan Amarowicz *et al.*, (2004) dengan sedikit pengubahsuaian.

1ml larutan β -karotena (0.2 mg/ml dilarutkan dalam kloroform) dicampurkan dengan 0.02 ml asid linoleik (Sigma) dan 0.2 ml Tween 80 (Sigma). Campuran larutan ini dipipetkan ke dalam kelalang bulat dan kloroform disingkirkan secara rotowap. Ditambahkan 50 ml air suling yang teroksigen ke dalam kelalang bulat dan kemudian ia digoncangkan kuat sehingga terbentuk larutan berbentuk liposom.

5 ml larutan liposom dipindahkan ke dalam beberapa siri tabung uji yang mengandungi 0.2 ml ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dengan kepekatan 4 – 20 mg/ml. 0.2 ml metanol digunakan sebagai kawalan dan blank pula terdiri daripada campuran asid linoleik, Tween 80 dan air suling teroksigen.

Selepas itu tabung uji tersebut direndamkan dalam rendaman air pada suhu 50⁰C selama 2 jam. Bacaan absorbans setiap sampel diambil dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 470 nm dengan selang masa setiap 20 minit. Setiap sampel diuji secara triplikat. Butil Hidrosianisol (BHA) digunakan sebagai kawalan positif.

2.6.4 Penentuan Jumlah Fenolik

Jumlah kandungan sebatian kimia fenolik di dalam ekstrak mentah metanol kedua-dua sampel diukur dengan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Taga *et al.*, (1984) dengan sedikit pengubahsuaian. Asid gallik digunakan sebagai piawai.

2.6.4.1 Penyediaan Larutan

2.6.4.1.1 Stok Larutan Asid Gallik

0.5 g asid galik dilarutkan dengan 100 ml etanol didalam kelalang volumetrik 100 mL. Air suling ditambahkan sehingga isipadu menjadi 100 ml. Stok larutan disimpan di dalam peti ais tidak lebih daripada dua minggu.

2.6.4.1.2 Larutan Sodium Karbonat

200 g sodium karbonat (Sigma) dilarutkan dengan 800 mL air suling dan dipanaskan sehingga mendidih. Apabila ia sejuk, ditambahkan beberapa kristal sodium karbonat dan dibiarkan selama 24 jam. Kemudian ia ditapis dan ditambahkan air suling sehingga isipadu menjadi 1 L.

2.6.4.2 Asai

Bagi penyediaan keluk piawai, 0, 1, 2, 3, 4, 5 dan 10 mL diambil dari stok larutan fenol dan dimasukkan ke dalam kelalang volumetrik 100 mL. Kemudian air suling ditambahkan sehingga mencapai isipadu 100 mL. Larutan-larutan ini mengandungi fenol pada kepekatan 0, 50, 100, 150, 250 dan 500 mg/L asid galik.

20 µl larutan dari setiap larutan, sampel dan larutan blank dipipetkan ke dalam kuvet yang berasingan. Ditambahkan 1.58 ml air suling pada setiap kuvet, dan kemudian ditambahkan pula 100 µl reagen Folin-Ciocalteu (Sigma). Dalam masa antara 30 saat sehingga 8 minit, ditambahkan larutan sodium karbonat dan digoncang supaya ia terlarutcampur dengan sekata.

Kemudian ia dibiarkan dalam rendaman air pada suhu 40⁰C selama 30 minit. Bacaan absorbans setiap larutan diambil pada panjang gelombang 765 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Shimadzu UV-160A). Asai ini diulang sebanyak tiga kali. Untuk ekstrak pula diuji pada kepekatan 20 mg/ml setiap ekstrak dan asai dijalankan dengan kaedah yang sama dan diulang sebanyak tiga kali.

2.7 Ujian Ketoksikan Akut Secara Oral

Ujian ini dijalankan dengan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Chan *et al.*, (1982) dengan sedikit pengubahsuaian. Tikus putih jantan dan betina *Sprague dawley* yang berusia 3 bulan diperolehi dari Unit Bekalan Haiwan Makmal, Institut Penyelidikan Perubatan, Kuala Lumpur diadaptasi selama 2 minggu sehingga mencapai berat 200 – 300 gram. Tikus-tikus ini diberi makan secara *ad libitum*.

2.7.1 Penyediaan sampel

Ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dilarutkan dalam air suling dan dipanaskan dalam rendaman air pada suhu 60⁰C selama 2 jam. Kemudian ekstrak dituras dan dipekatkan dengan rotowap. Ekstrak tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 50⁰C. Ekstrak disediakan pada kepekatan 2000 mg/kg berat tubuh (BT) dan larutan salin 0.9 % digunakan sebagai kawalan.

2.7.2 Ujian Dos Maut 50 (LD₅₀)

Tikus kajian dibahagi kepada 3 kumpulan (n=6 setiap kumpulan) iaitu kawalan (tikus yang diberikan larutan salin) dan tikus yang diberikan dos 2000 mg/kg BT ekstrak air *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. Tikus diberi perlakuan 1 ml ekstrak secara suapan paksa (force feeding) pada hari pertama dan kemortalan diperhatikan. Dalam masa 24 jam sebarang perubahan pada tingkahlaku seperti ataksia, keterujaan, kegelisahan, kewaspadaan dan kematian direkodkan. Kemortalan diperhatikan dalam tempoh 10 hari dan LD₅₀ ditentukan mengikut kaedah yang dijelaskan oleh Weil (1952).

2.8 Ujian Iritasi Pada Telinga Tikus

Ujian iritasi ini dijalankan dengan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Martin (1982) dan Ilham *et al.*, (1995). Tikus putih betina *Sprague dawley* yang berusia 3 bulan diperolehi dari Unit Bekalan Haiwan Makmal, Institut Penyelidikan Perubatan, Kuala Lumpur diadaptasi selama 2 minggu sehingga mencapai berat 200 – 300 gram. Setiap sangkar ditempatkan tiga ekor tikus. Tikus-tikus ini diberi makan secara *ad libitum*.

2.8.1 Ujian Iritasi

Sebanyak 10 µl ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. pada kepekatan 2000 mg/kg berat tubuh (BT) disapukan pada permukaan dorsal telinga sebelah kanan setiap tikus selama 4 hari berturut-turut. Telinga kiri dibiarkan tanpa sebarang rawatan dan digunakan sebagai rujukan kawalan untuk mengukur darjah kemerahan pada telinga tikus.

Telinga tikus diperiksa secara makroskopikal selepas 24 jam ujian dijalankan. Darjah kemerahan dikategorikan secara nombor iaitu 0 (normal), 1 (sedikit kemerahan pada kawasan yang diuji, iritasi berlaku sebanyak 25%), 2 (warna kemerahan kelihatan sedikit pada salur darah, iritasi berlaku sebanyak 50%), 3 (warna kemerahan kelihatan jelas pada keseluruhan telinga dan hiperplasia kelihatan, iritasi berlaku sebanyak 75%) dan 4 (kerosakan sel/nekrosis berlaku, iritasi sebanyak 100%).

2.9 Ujian Anti-inflammasi

Ujian ini dijalankan mengikut kaedah yang telah dijelaskan oleh Halis *et al.*, (2002) dan Dharmasiri *et al.*, (2003) dengan sedikit pengubahsuaian.

2.9.1 Penyediaan sampel

Ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dilarutkan dalam air suling dan dibiarkan dalam rendaman air pada suhu 60⁰C selama 2 jam. Kemudian ekstrak tersebut dituras dan dipekatkan dengan rotowap. Ekstrak tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 50⁰C.

Ekstrak disediakan pada kepekatan 250, 500 dan 1000 mg/kg berat tubuh (BT) dengan 2% Tween 80 sebagai agen pengangkut (vehicle) untuk melarutkan ekstrak. Indometasin pada kepekatan 10 mg/kg BT digunakan sebagai kawalan positif dan air suling yang mengandungi 2% Tween 80 sebagai kawalan negatif.

2.9.2 Pengendalian haiwan

Tikus putih jantan *Sprague dawley* yang berusia 3 bulan diperolehi dari Unit Bekalan Haiwan Makmal, Institut Penyelidikan Perubatan, Kuala Lumpur bulan, diadaptasi selama 2 minggu sehingga mencapai berat 200 – 300 gram. Tikus-tikus ini diberi makan secara *ad libitum*.

2.9.3 Ujian Anti-inflammasi Subakut

2.9.3.1 Ujian Edema Tapak Kaki Tikus Teraruh Formaldehid

Tikus dibahagikan kepada empat kumpulan iaitu kawalan positif (tikus yang diberikan larutan indometasin), kawalan negatif (tikus yang diberi air suling) dan tikus yang diberi ekstrak air *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dengan 3 ekor setiap kumpulan. Edema pada tikus diaruhkan dengan menyuntik 0.2 ml formaldehid 1% pada tapak kaki belakang tikus sebelah kanan. Tapak kaki diukur sebelum ia disuntik dengan formaldehid.

Ekstrak sampel, indometasin dan air suling diberikan pada tikus secara suapan paksa (force feeding) sekali sehari selama dua hari. Satu jam selepas dos yang terakhir, tapak kaki tikus disuntik. Tapak kaki setiap tikus diukur dengan angkup (Model 2061, Mututoyo Caliper, Japan). Ketebalan tapak kaki (sm) diukur setiap hari sehingga bengkak hilang.

Edema (ΔT) dikira dengan formula berikut:-

$$\Delta T = T_d - T_0$$

T_d = Ukuran ketebalan tapak kaki (sm) pada hari (1,2,3....)

T_0 = Ukuran ketebalan tapak kaki (sm) sebelum suntikan subplantar