

**SEBATIAN ANTIBIOTIK DARIPADA TANIN YANG DIEKSTRAK  
DARIPADA KULIT POKOK BAKAU MINYAK, *RHIZOPHORA APICULATA***

**BLUME**

oleh

**LIM SHEH HONG**

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi  
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains**

**September 2004**

## PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada penyelia saya, Profesor Madya Dr. Darah Ibrahim yang telah banyak memberi panduan, dorongan, nasihat dan tunjuk ajar yang bernaam sepanjang masa penyelidikan ini. Segala bantuan dan tunjuk ajar yang diberikan oleh beliau dengan penuh kesabaran amat saya sanjungi.

Rakaman ribuan terima kasih juga kepada Profesor Madya Dr. Jain Noordin Kassim, selaku penyelia bersama saya. Bantuan, sokongan dan bimbingan beliau telah membolehkan saya menjalankan bahagian pengekstrakan tanin dengan lancar selama kajian ini dijalankan.

Tidak lupa juga ucapan terima kasih saya kepada Profesor Madya Dr. Tengku Sifsizul Muhammad yang banyak membantu dalam bahagian ujian kesitotoksikan dalam kajian ini.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Kak Suraya dan Sasidharan yang banyak memberikan pertolongan dalam membantu menjayakan operasi penyelidikan ini. Tidak ketinggalan juga, Encik Muthu, Encik Johari dan Kak Jamilah dari Unit Mikroskop Elektron, Universiti Sains Malaysia yang telah banyak bersabar dan memberikan tunjuk ajar yang begitu baik kepada saya. Ucapan terima kasih juga tidak dilupakan kepada semua kakitangan Pusat Pengajian Sains Kajihayat, Universiti Sains Malaysia terutamanya Encik Rasid, Encik Teo, Kak Nurul, Encik Hamzah dan Kak Falizah.

Teristimewa buat kedua-dua orang ibu bapa dan dua orang adik tersayang yang telah banyak memberi galakan dan sokongan. Terima kasih yang tak terhingga nilainya ingin saya ucapkan kepada mereka.

Akhir sekali, penghargaan ini ditujukan kepada Pay Luan, Boon Keat dan Kar Hock yang banyak mengambil berat terhadap kemajuan dalam penyelidikan saya. Tidak ketinggalan juga kepada semua rakan-rakan saya iaitu Anuradha, Wendy, Chia Shian, Chong Boon, Phek Kheng, Goh, Sumathi, Yetty, Yee Soon, Chee Keat, Yan, Syaiful, Yuen Hwee, Chuin Yong, Hooi Huang, Ida, Ya Shien dan lain-lain yang saya kenali, diucapkan terima kasih atas segala pertolongan serta galakan dan hiburan yang telah diberikan.

**LIM SHEH HONG**

**SEPTEMBER 2004**

## KANDUNGAN

	Muka surat
PENGHARGAAN	ii
KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI GAMBAR FOTO	xiii
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvii
<b>BAB 1 PENGENALAN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Keperluan mendapatkan antibiotik baru</b>	<b>3</b>
1.1.1 Timbulnya penyakit baru dan mikroorganisma baru	4
1.1.2 Kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik	8
1.1.3 Pengkomersilan antibiotik	15
<b>1.2 Antibiotik dan mekanisme tindakannya</b>	<b>18</b>
1.2.1 Agen antibakteria	20
1.2.1.1 Pengelasan antibakteria	21
1.2.1.2 Mekanisme tindakan antibakteria	21
1.2.2 Agen antikulat	27
1.2.2.1 Pengelasan antikulat	28
1.2.2.2 Mekanisme tindakan antikulat	29
<b>1.3 Sumber sebatian antibiotik</b>	<b>32</b>
1.3.1 Mikroorganisma sebagai sumber antibiotik	33
1.3.1.1 Mikroorganisma daratan sebagai sumber antibiotik	33

1.3.1.2	Mikroorganisma marin sebagai sumber antibiotik	36
1.3.2	Haiwan marin sebagai sumber antibiotik	37
1.3.2.1	Timun laut	37
1.3.2.2	Span marin	40
1.3.3	Tumbuhan sebagai sumber sebatian antibiotik	40
<b>1.4</b>	<b>Kumpulan utama sebatian antimikrob daripada tumbuhan</b>	<b>45</b>
1.4.1	Alkaloid	46
1.4.2	Saponin	49
1.4.3	Fenol dan polifenol	51
1.4.3.1	Fenol ringkas dan asid fenolik	51
1.4.3.2	Kuinon	54
1.4.3.3	Flavonoid	55
1.4.3.4	Tanin	56
1.4.3.5	Koumarin	60
1.4.4	Terpenoid dan minyak pati	60
<b>1.5</b>	<b><i>Rhizophora apiculata</i> Blume</b>	<b>61</b>
1.5.1	Ciri-ciri <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	61
1.5.2	Etnofarmakologi <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	62
<b>1.6</b>	<b>Objektif penyelidikan</b>	<b>64</b>
 <b>BAB 2 BAHAN DAN KAEDAH</b>		<b>67</b>
<b>2.1</b>	<b>Penyampelan</b>	<b>67</b>
<b>2.2</b>	<b>Pengekstrakan</b>	<b>67</b>
2.2.1	Pengekstrakan tanin	67
2.2.2	Pengasingan tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi	73

<b>2.3</b>	<b>Penyediaan ekstrak dan mikroorganisma ujian</b>	74
2.3.1	Penyediaan ekstrak tanin ujian	74
2.3.2	Mikroorganisma ujian	76
2.3.2.1	Bakteria ujian	76
2.3.2.2	Kulat ujian	78
2.3.2.3	Yis ujian	78
2.3.3	Penyediaan inokulum	79
2.3.3.1	Bakteria	79
2.3.3.2	Kulat	79
2.3.3.3	Yis	80
<b>2.4</b>	<b>Penentuan aktiviti antimikrob tanin terhadap mikroorganisma ujian</b>	80
2.4.1	Penyaringan mikroorganisma ujian dengan tanin	80
2.4.2	Pengamatan zon perencatan dengan mikroskop elektron pensakanan (SEM)	81
<b>2.5</b>	<b>Penentuan ketulenan tanin terhidrolisis</b>	82
<b>2.6</b>	<b>Kesan kepekatan tanin terhidrolisis terhadap mikroorganisma ujian</b>	82
2.6.1	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) bagi mikroorganisma ujian	83
2.6.2	Penentuan Kepekatan Maut Minimum (MLC) bagi mikroorganisma ujian	84
<b>2.7</b>	<b>Kesan penambahan tanin terhidrolisis ke atas profil pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i></b>	85
2.7.1	Kesan pelbagai kepekatan tanin terhidrolisis ke atas pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i>	85
2.7.1.1	Penentuan corak pertumbuhan	86
2.7.1.2	Pengamatan perubahan morfologi <i>Candida albicans</i> di bawah mikroskop cahaya.	86

2.7.2	Kesan masa penambahan pelbagai kepekatan tanin terhidrolisis ke atas pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i>	86
<b>2.8</b>	<b>Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Candida albicans</i> selepas penindasan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume</b>	<b>87</b>
2.8.1	Pengamatan menggunakan mikroskop elektron pensakanan (SEM)	88
2.8.2	Pengamatan menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM)	88
<b>2.9</b>	<b>Kesan kesitotoksikan tanin terhidrolisis daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume</b>	<b>88</b>
2.9.1	Ujian kesitotoksikan tanin terhidrolisis menggunakan anak udang brin ( <i>Artemia salina</i> )	88
2.9.2	Ujian kesitotoksikan tanin terhidrolisis ke atas sel kanser HepG2	90
<b>2.10</b>	<b>Pemfraksian tanin terhidrolisis dan penentuan komponen yang bersifat antiyis</b>	<b>95</b>
2.10.1	Penyisihan tanin terhidrolisis dengan kromatografi lapisan nipis	95
2.10.2	Pemfraksian tanin terhidrolisis dengan kromatografi turus untuk menentukan aktiviti antiyis	97
2.10.3	Penentuan komponen dalam tanin terhidrolisis yang bersifat antiyis dengan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)	98
<b>BAB 3</b>	<b>KEPUTUSAN</b>	<b>101</b>
<b>3.1</b>	<b>Pengekstrakan</b>	<b>101</b>
3.1.1	Pengekstrakan tanin daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	101
<b>3.2</b>	<b>Penentuan aktiviti antimikrob tanin terhadap mikroorganisma ujian</b>	<b>101</b>
3.2.1	Penyaringan mikroorganisma ujian dengan tanin	101
3.2.2	Pengamatan zon perencatan di bawah mikroskop	110

	elektron pensakanan (SEM)	
3.2.2.1	Zon perencatan yang terbentuk ke atas pertumbuhan <i>B. cereus</i>	110
3.2.2.2	Zon perencatan yang terbentuk ke atas <i>Candida albicans</i>	113
3.3	<b>Penentuan ketulenan tanin terhidrolisis</b>	113
3.4	<b>Kesan kepekatan tanin terhidrolisis terhadap mikroorganisma ujian</b>	116
3.4.1	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)	116
3.4.2	Penentuan Kepekatan Maut Minimum (MLC)	119
3.5	<b>Kesan penambahan tanin terhidrolisis ke atas profil pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i></b>	122
3.5.1	Kesan pelbagai kepekatan tanin terhidrolisis ke atas pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i>	122
3.5.2	Pengamatan corak pertumbuhan sel yis	124
3.5.3	Kesan masa penambahan pelbagai kepekatan tanin terhidrolisis ke atas pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i>	126
3.6	<b>Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Candida albicans</i> selepas penindasan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume</b>	129
3.7	<b>Kesan kesitotoksikan tanin terhidrolisis daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume</b>	135
3.7.1	Ujian kesitotoksikan tanin terhidrolisis menggunakan anak udang brin ( <i>Artemia salina</i> )	135
3.7.2	Ujian kesitotoksikan tanin terhidrolisis ke atas sel kanser HepG2	138
3.8	<b>Pemfraksian tanin terhidrolisis dan penentuan komponen yang bersifat antiyis</b>	141
3.8.1	Hasil penyisihan tanin terhidrolisis dengan kromatografi lapisan nipis (TLC)	141
3.8.2	Pemfraksian tanin terhidrolisis dengan kromatografi turus untuk menentukan aktiviti antiyis.	144



3.8.3	Penentuan komponen dalam tanin terhidrolisis yang bersifat antiyis dengan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)	147
<b>BAB 4 PERBINCANGAN</b>		150
4.1	Pengekstrakan	150
4.2	Penentuan aktiviti antimikrob tanin terhadap mikroorganisma ujian	154
4.3	Kesan kepekatan tanin terhidrolisis terhadap mikroorganisma ujian	160
4.4	Kesan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume ke atas profil pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i>	165
4.5	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Candida albicans</i> selepas penindasan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	168
4.6	Kesan kesitotoksikan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	173
4.7	Pemfraksian tanin terhidrolisis dan penentuan komponen yang bersifat antiyis	176
<b>BAB 5 KESIMPULAN</b>		182
	<b>RUJUKAN</b>	185
	<b>LAMPIRAN</b>	220
	<b>PENERBITAN DARIPADA PENYELIDIKAN INI</b>	226

## SENARAI JADUAL

Jadual 1.1	Kerintangan <i>E. coli</i> terhadap antibiotik di Malaysia	13
1.2	Kerintangan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> terhadap antibiotik di Malaysia	14
1.3	Jumlah pengeluaran antibiotik di dunia	17
1.4	Pengelasan antibiotik	22
1.5	Kumpulan utama antikulat	30
1.6	Beberapa contoh antibiotik daripada mikroorganisma daratan	35
1.7	Mikroorganisma marin yang menghasilkan antibiotik	38
1.8	Tumbuhan yang mempunyai aktiviti antibakteria	42
1.9	Tumbuhan yang mempunyai aktiviti antikulat	43
1.10	Kelas utama antimikrob daripada tumbuhan	47
1.11	Kumpulan sebatian utama dalam kelas fenol dan polifenol	53
2.1	Penyediaan medium pertumbuhan sel kanser HepG2	92
2.2	Senarai pelarut dan nisbah yang digunakan dalam Kromatografi Lapisan Nipis	96
3.1	Peratus tanin yang dapat diekstrak daripada kulit batang <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	103
3.2	Penyaringan aktiviti antimikrob tanin (100 mg/ml) yang diekstrak daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume ke atas mikroorganisma ujian	105
3.3	Nilai Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) yang ditunjukkan oleh tanin terhidrolisis	118
3.4	Nilai Kepekatan Maut Minimum (MLC) dan peratusan yang ditunjukkan oleh tanin terhidrolisis terhadap mikroorganisma ujian	121
3.5	Keputusan ujian kesitotoksikan tanin terhidrolisis daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume menggunakan anak udang brin	136

3.6	Kesan perencatan tanin terhidrolisis terhadap sel kanser HepG2 pada kepekatan tertentu	139
3.7	Bilangan fraksi yang dapat dihitung di bawah cahaya ultra-ungu setelah dipisah melalui kromatografi lapisan nipis	142
3.8	Zon perencatan yang ditunjukkan oleh fraksi-fraksi tanin terhidrolisis terhadap <i>Candida albicans</i>	145

## SENARAI RAJAH

Rajah 1.1	Dinding sel bakteria	24
1.2	Struktur beberapa sebatian daripada kelas alkaloid	50
1.3	Struktur beberapa sebatian saponin	52
1.4	Struktur kimia tanin	58
1.5	<i>Rhizophora apiculata</i> Blume	63
2.1	Ringkasan carta aliran proses pengekstrakan tanin daripada kulit batang <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	72
3.1	OD pertumbuhan <i>Candida albicans</i> dalam tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume pada kepekatan 3.13 mg/ml (1/2MIC), 6.25 mg/ml (MIC) dan 12.5 mg/ml (2MIC)	123
3.2	Kesan penambahan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume pada MIC (6.25 mg/ml) ke atas pertumbuhan <i>Candida albicans</i> pada tempoh pengeraman tertentu	127
3.3	Kesan penambahan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume pada 2MIC (12.5 mg/ml) ke atas pertumbuhan <i>Candida albicans</i> pada tempoh pengeraman tertentu	128
3.4	Graf kesan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume terhadap sel kanser HepG2	140
3.5	Kromatogram HPLC tanin terhidrolisis yang diekstrak daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	148

## SENARAI GAMBAR FOTO

Gambar foto	2.1	Pokok bakau minyak ( <i>Rhizophora apiculata</i> Blume) di hutan paya bakau Kuala Sepetang, Daerah Larut Matang, Perak.	68
	2.2	Kulit batang pokok <i>Rhizophora apiculata</i> Blume di kilang arang, Kuala Sepetang, Perak.	69
	2.3	Kulit batang <i>Rhizophora apiculata</i> Blume yang telah dikeringkan di dalam oven	70
	2.4	Kulit batang <i>Rhizophora apiculata</i> Blume yang telah dikisar halus	71
	2.5	Ekstrak tanin <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	75
	2.6	Mikroorganisma ujian	77
	2.7	Telur udang brin, <i>Artemia salina</i>	89
	2.8	Anak udang brin, <i>Artemia salina</i> berumur 10 jam selepas menetas	91
	2.9	Fraksi-fraksi tanin terhidrolisis dipungut di bahagian bawah turus kromatografi turus	99
	3.1	Serbuk tanin yang diekstrak daripada <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	102
	3.2	Zon perencatan tanin ke atas pertumbuhan bakteria ujian	107
	3.3	Zon perencatan separa tanin ke atas pertumbuhan bakteria ujian, <i>Enterobacter aerogenes</i>	108
	3.4	Tiada zon perencatan tanin ke atas pertumbuhan kulat ujian	109
	3.5	Zon perencatan tanin ke atas pertumbuhan yis ujian, <i>Candida albicans</i>	111
	3.6	Mikrograf SEM zon perencatan yang terbentuk ke atas pertumbuhan <i>Bacillus cereus</i> akibat tindakan tanin terhidrolisis	112
	3.7	Mikrograf SEM zon perencatan yang terbentuk ke atas pertumbuhan <i>Candida albicans</i> akibat tindakan tanin terhidrolisis	114

3.8	Hasil penyisihan tanin terhidrolisis setelah dilakukan kromatografi lapisan nipis	115
3.9	Keputusan MYC dan MIC tanin terhidrolisis ke atas <i>Candida albicans</i> dengan menggunakan Teknik Kultur Tabung	117
3.10	Kesan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume ke atas pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	125
3.11	Mikrograf SEM <i>Candida albicans</i> yang telah diolah dengan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	130
3.12	Mikrograf TEM <i>Candida albicans</i> yang telah diolah dengan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	132
3.13	Mikrograf TEM (pembesaran 22,000x) menunjukkan keruntuhan dinding sel <i>Candida albicans</i> yang didedah dengan tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	134
3.14	Anak udang brin ( <i>Artemia salina</i> ) yang telah mati akibat ditindak oleh tanin terhidrolisis <i>Rhizophora apiculata</i> Blume	137
3.15	Hasil penyisihan tanin terhidrolisis dengan menggunakan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis	143

SEBATIAN ANTIBIOTIK DARIPADA TANIN YANG DIEKSTRAK  
DARIPADA KULIT POKOK BAKAU MINYAK, *RHIZOPHORA APICULATA*  
BLUME

ABSTRAK

Penyelidikan ini mengkaji kesan antimikrob ekstrak tanin daripada kulit pokok bakau minyak, *Rhizophora apiculata* Blume. Sebanyak tiga jenis tanin telah diperolehi daripada pengekstrakan kulit pokok *Rhizophora apiculata* Blume iaitu tanin campuran, tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Kajian penyaringan dengan kaedah pembauran cakera menunjukkan bahawa tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume memberikan kesan antimikrob yang lebih kuat berbanding dengan tanin campuran dan tanin terkondensasi.

Dalam kajian ini, ekstrak tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume telah diberi perhatian yang utama untuk mengkaji kesan aktiviti antimikrobnya terhadap mikroorganisma ujian. Keputusan kajian memaparkan tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume menunjukkan aktiviti antibakteria dan antiyis yang signifikan tetapi tidak ada aktiviti antikulat. Kesan kepekatan perencatan minimum (MIC) dan kesan kepekatan maut minimum (MLC) bagi tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume telah ditentukan bagi mikroorganisma ujian terpilih. Nilai MIC untuk tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume bagi *Candida albicans* ialah 6.25 mg/ml dan nilai kepekatan yistosid minimum (MYC) pula mencatat 12.5 mg/ml. Ekstrak tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume pada kepekatan separuh MIC, MIC dan dua kali MIC dapat merencat fasa log pertumbuhan yis, *Candida albicans*.

Pencerapan mikroskopi menunjukkan bahawa ekstrak tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume mengakibatkan beberapa perubahan morfologi terhadap sel *Candida albicans*. Tanin ini menyekat pertunasan normal dan bentuk dinding sel juga terubahsuai.

Kajian kesitotoksikan telah dilakukan ke atas anak udang brin dan sel kanser HepG2 dengan menggunakan tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume dan mendapati tanin ini memberi nilai kepekatan maut 50 % (LC<sub>50</sub>) yang signifikan. Ekstrak tanin terhidrolisis daripada *Rhizophora apiculata* Blume didapati menunjukkan kesan kesitotoksikan yang amat signifikan ke atas sel-sel kanser HepG2. Bilangan sel kanser HepG2 didapati semakin berkurangan apabila kepekatan tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume yang digunakan semakin meningkat.

Penyisihan komponen-komponen tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume telah dilakukan dengan menggunakan teknik Kromatografi Lapisan Nipis dan Kromatografi Turus dan seterusnya ujian antiyis dilakukan. Kesan antagonisme telah ditunjukkan oleh ekstrak tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume. Ini dibuktikan setelah penyisihan komponen-komponen tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume menunjukkan kesan antiyis yang lebih signifikan berbanding dengan tanin terhidrolisis. Kaedah Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi (HPLC) mengesahkan bahawa komponen utama tanin terhidrolisis *Rhizophora apiculata* Blume yang bersifat antiyis (*Candida albicans*) adalah terdiri daripada asid galik.



ANTIBIOTIC COMPOUND(S) FROM TANNIN EXTRACTED FROM BARKS  
OF BAKAU MINYAK, *RHIZOPHORA APICULATA* BLUME

ABSTRACT

A research was conducted to study the antimicrobial effects of tannin from barks of bakau minyak, *Rhizophora apiculata* Blume. Three types of tannin had been extracted from barks of *Rhizophora apiculata* Blume, namely mixed tannin, hydrolysable tannin and condensed tannin. Screening using with disc diffusion assay showed that the hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume was more effective in antimicrobial activity compared to mixed and condensed tannins.

In this study, special attention was given to hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume in order to find out its ability as antimicrobial agent on tested microorganisms. The results of the study revealed that hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume exhibited significant antibacterial and antiyeast activities but not antifungal activity. The minimum inhibitory concentration, (MIC) and the minimum lethal concentration (MLC), for hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume had been determined for the selected test microorganisms. The MIC value for hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume was 6.25 mg/ml and minimum yeastocidal concentration (MYC) value was 12.5 mg/ml for *Candida albicans*. The hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume at half MIC, MIC and two times MIC concentrations can inhibit the log phase of the yeast growth, *Candida albicans*.

Microscopic studies showed that hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume causes some morphology changes in the treated cells, *Candida albicans*. In *Candida albicans* cells, it causes abnormal budding and deformation of the cell wall.

The cytotoxicity test for hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume was carried out using brine shrimp lethality assay and HepG2 cancer cells. It was found that hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume showed significant values of lethality concentration of 50 % (LC<sub>50</sub>). The hydrolysable tannin which extracted from *Rhizophora apiculata* Blume also shows significant cytotoxicity effects on the HepG2 cancer cells. It was found that the number of survival HepG2 cancer cells became less as the concentration of the hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume increased.

The separation of the compounds of the hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume was done by using thin layer and column chromatography techniques. The antiyeast activity test was performed afterwards. The antagonism effects were shown by the hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume. This confirmed since the separating components of the hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume showed a significant effect compared to the hydrolysable tannin. Through the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the main component of the hydrolysable tannin of *Rhizophora apiculata* Blume which react as antiyeast (*Candida albicans*) was confirmed as gallic acid.

## BAB I PENGENALAN

Perkembangan kesihatan manusia amat memerlukan penemuan antibiotik-antibiotik baru bagi merawat pelbagai penyakit berjangkit yang disebabkan oleh mikroorganisma patogen. Kemunculan penyakit-penyakit baru mungkin juga disebabkan oleh perubahan cara hidup sosial manusia itu sendiri di samping faktor persekitaran yang berubah. Perubahan-perubahan ini akan mengaruhi berlakunya evolusi populasi mikroorganisma yang mana akhirnya mikroorganisma tertentu yang terpilih akan menjadi patogen. Evolusi populasi mikroorganisma terpilih ini ada kaitannya dengan tempoh penggunaan antibiotik yang panjang yang telah bermula sejak perang dunia kedua lagi. Penggunaan antibiotik yang telah melebihi 60 tahun ini telah menimbulkan banyak patogen yang sekarang ini telah mewujudkan strain yang rintang antibiotik (Krause, 2001).

Industri-industri farmaseutis juga sedang berusaha keras untuk mendapatkan sebatian-sebatian antibiotik baru yang dapat bertindak ke atas strain-strain yang rintang ini, di samping perusahaan untuk mendapatkan agen kemoterapeutis novel bagi merawat penyakit-penyakit berjangkit yang disebabkan oleh strain-strain berbilang rintang. Walaupun, terdapat banyak usaha telah dijalankan khususnya oleh World Health Organization (WHO) untuk mengurangkan atau melambatkan terjadinya proses kerintangan, namun penggunaan antibiotik yang tanpa kawalan telah memusnahkan usaha ini (Binyon & Cooke, 2000). Akibat daripada perkara-perkara ini, sekarang timbul pula strain-strain yang mempunyai sifat berbilang rintang. Di samping itu, penggunaan antibiotik yang tidak sesuai akan menyebabkan berlakunya alahan dan ketoksikan pada organ tubuh. Dewasa ini, para penyelidik telah mengemukakan suatu

pendekatan baru untuk merawat patogen-patogen iaitu dengan kaedah kimia gabungan, di samping pengenalan kepada terapi protein dan penyaringan oligonukleotida antideria (Waugh & Long, 2002). Dalam ketiga-tiga pendekatan ini, penggunaan hasil semula jadi masih lagi menjadi pilihan.

Kebanyakan organisma menghasilkan banyak tapak jalan metabolit sekunder yang mampu mengeluarkan sebatian-sebatian yang mempunyai pelbagai aktiviti biologi. Sesetengah daripada aktiviti-aktiviti ini mampu merencat atau membunuh organisma lain dan aktiviti seperti ini disebut antibiosis. Mikroorganisma dan tumbuhan telah terbukti dapat menghasilkan metabolit sekunder yang berguna dalam bidang perubatan, untuk merawat penyakit pada manusia. Penyaringan secara berterusan metabolit sekunder daripada mikroorganisma dan tumbuhan telah menghasilkan banyak sebatian-sebatian penting bersifat antibiotik (Fasihuddin & Hasmah, 1993).

Menurut sejarah, perubatan terawal yang menggunakan tumbuhan sebagai sumber ubatan telah dilaporkan oleh Hippocrates, yang dikenali sebagai Bapa Perubatan, pada sekitar tahun 400 BC. Hippocrates telah menulis atau menyenaraikan resepi untuk merawat kira-kira 400 jenis penyakit menggunakan tumbuhan, di dalam bukunya 'Materia Medica'. Theophrastus (300 BC) telah mengumpulkan banyak maklumat sistematik bagi berbagai tumbuhan, manakala Dioscorides (160 AC) dan Galen (200 AC) pula telah menerbitkan banyak majalah mengenai penggunaan tumbuhan sebagai ubatan (Fasihuddin & Hasmah, 1993). Pada abad ke 19, ahli sains Perancis, Caventou & Pelletier telah berjaya memencilkan sebatian aktif daripada tumbuhan iaitu sebatian kuinina daripada pokok Cincona (Phillipson, 2000). Sejak itu terdapat banyak penemuan sebatian-sebatian aktif berasal daripada tumbuhan yang dipencilkan dan

dikomersilkan untuk kegunaan perubatan. Laporan-laporan saintifik berkenaan perkara ini juga banyak dilaporkan. Antaranya ialah seperti oleh Cowan (1999). Dahanukar *et al.*, (2000), Waugh & Long (2002) dan Jassim & Naji (2003) yang telah membuat ulasan yang hampir lengkap.

Halatuju penyelidikan sekarang ini banyak tertumpu kepada penyaringan sebatian bioaktif daripada tumbuhan. Ini kerana terdapat banyak sebatian bioaktif tumbuhan ubatan tradisional yang telah terbukti berpotensi untuk digunakan sebagai sumber antibiotik baru. Tambahan pula jangka hayat sebatian-sebatian antibiotik daripada tumbuhan adalah lebih lama (Waugh & Long, 2002). Terdapat banyak tumbuhan yang berpotensi untuk diselidiki, terutamanya di hutan hujan tropika yang merupakan gedung farmasi semula jadi, di mana terdapat lebih daripada 200,000 spesies berpotensi. Daripada jumlah ini sekurang-kurangnya sebanyak 328 jenis ubatan telah dihasilkan (Fasihuddin & Hasmah, 1993). Sementara Dahanukar *et al.*, (2000) pula melaporkan lebih daripada 13,000 spesies tumbuhan telah didokumentasikan dan berpotensi untuk diketengahkan kerana mempunyai nilai ubatan.

## **1.1 KEPERLUAN MENDAPATKAN ANTIBIOTIK BARU**

Walaupun antibiotik adalah suatu drug yang telah ditemui secara kebetulan melalui kajian ke atas antagonisme di antara berbagai-bagai jenis mikroorganisma akan tetapi di sepanjang jangka masa 40 tahun yang lepas, kebanyakan antibiotik jenis baru yang telah ditemui adalah melalui usaha pencarian yang tekun dan teliti oleh para saintis perubatan. Ini adalah kerana terdapat permintaan antibiotik yang tinggi, baik daripada bidang perubatan atau pun bidang penternakan, pertanian dan sebagainya.

Dewasa ini, antibiotik merupakan suatu bahan terapeutik yang penting dalam bidang perubatan. Antibiotik-antibiotik jenis baru amat diperlukan kerana dunia kita masih menghadapi perkembangan masalah kerintangan terhadap antibiotik yang berada di pasaran. Di samping itu, timbul pula penyakit baru serta sebilangan penyakit berjangkit yang masih tidak dapat dikawal dengan berkesannya oleh antibiotik yang terdapat pada masa kini. Selain itu, permintaan antibiotik yang tinggi dalam bidang farmaseutis juga telah mendorong banyak kilang-kilang farmaseutis atau pengeluar antibiotik dibina untuk tujuan pengkomersilan. Oleh itu, penghasilan antibiotik dalam bidang perubatan merupakan satu sektor yang penting dalam bidang ekonomi di dunia kita sekarang, termasuk juga di Malaysia.

Secara umumnya keperluan untuk mendapatkan antibiotik baru boleh didasarkan kepada tiga faktor iaitu timbulnya penyakit dan mikroorganisma baru, kerintangan terhadap antibiotik dan pengkomersilan antibiotik.

### **1.1.1 Timbulnya penyakit baru dan mikroorganisma baru**

Kemunculan penyakit baru dan penemuan mikroorganisma patogen baru telah menimbulkan masalah yang rumit kepada masyarakat kita. Memandangkan antibiotik yang sedia ada di pasaran gagal untuk mengawal dan mengubati penyakit yang baru timbul ini. Di samping itu, kemunculan mikroorganisma patogen baru dan mikroorganisma yang telah mengalami kemutanan dengan lebih bersifat patogen telah merupakan satu cabaran kepada dunia sains perubatan. Misalnya, kewujudan strain bakteria *Vibrio cholerae* 'Ogawa' yang menggantikan strain lama *Vibrio cholerae*

'Inawa' dalam menyebabkan wabak taun di Malaysia pada tahun 1986 (Berita Mingguan, 6 May 1990).

Baru-baru ini, timbul pula penyakit baru 'sindrom respirasi akut yang teruk' (SARS) yang mengemparkan manusia di seluruh dunia akibat daripada jangkitan virus yang telah menjadi mutan. Strain virus ini membiak dengan pantas sehingga para ahli sains menghadapi masalah untuk menentukan strain-strain patogen virus tersebut. Ini telah mengakibatkan perebakan jangkitan SARS tidak dapat dikawal dengan cepat dan berkesan. Sehingga kini para ahli sains perubatan masih gagal untuk mendapatkan suatu agen terapi yang unggul bagi mencegah penyakit ini.

Menurut Doktor Dennis Lo, ahli kimia patologi di Chinese University of Hong Kong, kepantasan kemutanan virus tersebut merupakan satu evolusi seperti pembunuh yang cuba menyembunyikan diri daripada dikesan (The Star, 3 May 2003). Dalam seminar baru-baru ini, Doktor Dennis Lo juga mengatakan bahawa kemutanan 'coronavirus' bagi penyakit SARS telah berlaku dengan pantas dalam populasi kita. Ini dapat dibuktikan daripada kajian-kajian yang telah dilakukan di Chinese University of Hong Kong pada akhir bulan Mac 2003 lalu. Daripada 11 sampel virus yang diambil daripada pesakit SARS di Hong Kong didapati terdapat dua jenis penyakit yang berlainan, yang hadir pada sampel-sampel pesakit SARS yang diambil itu (The Star, 3 May 2003). Hal ini telah merumitkan lagi keadaan untuk para ahli sains perubatan mendapatkan agen terapi terhadapnya.

Kes penyakit SARS yang terawal bermula di daerah Guangdong, China pada pertengahan bulan November, 2002. Penyakit SARS telah mencapai keadaan yang

serius dan kemuncak jangkitannya di seluruh dunia pada 21 Februari 2003 (<http://www.who.int/features/2003/07/en/>, 2003). Dalam wabak ini, Negara China pula mencatatkan bilangan kes kematian paling tinggi iaitu sebanyak 230 kes pada 8 Mei, 2003 (The Star, 10 Mei 2003). Manakala negara kita, Malaysia pula mencatat 2 kes kematian akibat daripada serangan SARS ini (The Star, 10 Mei 2003).

World Health Organization (WHO), telah melaporkan sehingga 11 Julai 2003, SARS telah mengakibatkan seramai 813 nyawa terkorban di seluruh dunia (<http://www.who.int/features/2003/07/en/>, 2003). Jumlah bilangan kes kematian yang tinggi akibat daripada serangan SARS amat menakjubkan semua manusia di dunia ini. Tambahan pula, para ahli sains perubatan masih gagal untuk mendapatkan agen terapi yang boleh mencegah penyakit ini. Sehingga kini, walaupun penyakit ini telah dapat dikawal tetapi para ahli sains perubatan masih berusaha lagi untuk mencari sesuatu agen terapi yang dapat mengubati penyakit ini malah jika boleh untuk menghapuskan penyakit ini dengan sepenuhnya.

Dunia kita sering diserang oleh pelbagai jenis penyakit baru, pada tahun 1998 masyarakat kita telah diserang oleh penyakit Japanese Encephalitis (JE) yang disebabkan oleh virus Nipah. Epidemik virus Nipah telah membawa keadaan yang serius pada bulan Oktober, 1998. Epidemik ini yang berpunca daripada pembawa virus iaitu keluang buah dan seterusnya dijangkiti kepada babi, telah mengakibatkan sebanyak 104 nyawa terkorban di negara kita (<http://whyfiles.org/038badbugs/scope.html>, 2003).



Penyakit lain ialah penyakit tangan, kuku dan mulut yang juga merupakan salah satu penyakit yang sering menyerang kesihatan masyarakat kita. Penyakit ini biasanya menyerang di kalangan kanak-kanak yang berumur di bawah 10 tahun. Terdapat beberapa jenis virus yang telah mengakibatkan penyakit ini. Di antaranya, ialah virus 'coxsackie A 16', 'enterovirus 71', atau pun enterovirus yang mempunyai strain-strain yang berlainan. Penyakit ini telah merebak di negara kita pada tahun 1997 dan telah mencatat sebanyak 50 kes kematian (kebanyakannya terdiri daripada kalangan kanak-kanak) akibat serangan penyakit ini di negeri Sarawak. (<http://www.chemicon.com/Resource/newsletters/virusp4-9.paf>, 2004). Pada masa tersebut penyakit ini dikenali juga sebagai 'Penyakit Koksaki' kerana penyakit ini berpunca daripada virus 'coxsackie'. Jangkitan penyakit ini telah muncul semula sejak kebelakangan ini iaitu pada tahun 2000 di negara kita dan juga di negara Singapura (<http://www.expatriate.com/medical/handfootmouth.html>, 2003).

Wabak demam denggi yang disebabkan oleh nyamuk denggi pula merupakan salah satu wabak yang sering melanda masyarakat kita. Dianggarkan 50 juta hingga 100 juta penduduk dunia akan meninggal dunia akibat demam denggi pada setiap tahun (Berita Harian, 19 Februari 2004). Menurut Doktor Rita Kusriastuti, pegawai di Kementerian Kesihatan Indonesia, wabak demam denggi yang berpunca daripada virus telah mengakibatkan seramai 142 orang penduduk di Indonesia meninggal dunia pada awal tahun 2004. Menurut pegawai kesihatan Indonesia pula, wabak demam denggi yang agak serius berlaku di Indonesia baru-baru ini mungkin adalah berpunca dari sejenis virus yang berstrain baru (Berita Harian, 19 Februari 2004).

Baru-baru ini pula, banyak negara di benua Asia seperti China, Taiwan, Indonesia, Korea selatan, Jepun, Laos, Thailand dan Vietnam telah diserangi oleh wabak maut iaitu selesema burung yang disyaki berpunca daripada temakan seperti ayam, itik dan angsa (Berita Harian, 17 Februari 2004). Menurut Organisasi Makanan dan Pertanian dengan Bangsa-bangsa Bersatu (FAO), wabak selesema burung telah mengakibatkan sebanyak 80 juta temakan di negara Thailand, Vietnam dan Indonesia dibunuh dalam usaha mengekang sebaran penyakit ini (Berita Harian, 14 Februari 2004). Malah, wabak selesema burung yang dikatakan akibat daripada jangkitan virus H5N1 pula telah mencatat sebanyak 22 kes maut di Asia pada 18 Februari 2004 (The Star, 19 Februari 2004).

Pada 20 tahun yang lepas, terdapat sekurang-kurangnya 30 jenis penyakit baru yang telah muncul di dunia, misalnya sindrom kekurangan daya tahan penyakit (AIDS), 'Ebola', penyakit 'Legionnaires' dan sebagainya. Malah, di antara kebanyakan penyakit baru ini masih tidak ada ubatan atau vaksin untuk mencegah atau mengubatnya (Strohl, 1997). Masalah ini telah mendesakkan para ahli sains perubatan berusaha untuk mencari antibiotik yang baru bagi mengatasi masalah ini.

### **1.1.2 Kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik**

Penggunaan antibiotik yang berlebihan khasnya antibiotik bagi tujuan profilaksis boleh menimbulkan sifat kerintangan dalam bakteria. Selain daripada itu, penggunaan antibiotik secara tidak terkawal juga boleh meningkatkan masalah kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik, seterusnya membawa masalah yang

serius bagi mengubati penyakit-penyakit seperti tuberkulosis, malaria, kolera, disentri dan pneumonia (<http://www.twinside.org.sg/title/dise-cn.html>, 2003).

Kerintangan sesuatu strain mikroorganisma terhadap sesuatu antibiotik boleh disebabkan oleh beberapa faktor. Misalnya, keupayaan sesuatu strain mikroorganisma itu untuk memusnahkan antibiotik dengan cara menghasilkan enzim ekstrasel (Taber & Halfenger, 1976), mengurangkan penyerapan antibiotik ke dalam selnya (Sanglard, 2002), mengubahsuai tapak sasaran antibiotik sehingga tapak sasaran itu tidak dapat dikenali oleh antibiotik (Davis, 1987) dan seterusnya menghalang atau mengelakkan tindak balas metabolisme sasarannya (Holtje, 1979).

Kerintangan terhadap antibiotik boleh wujud secara semula jadi pada mikroorganisma atas sebab berlakunya mutasi atau pun penukaran genetik di dalam sel (Zahner & Mass, 1972). Dalam kes wujudnya rintangan semula jadi, adalah dipercayai yang kesemua spesies bakteria mungkin bersifat rintang terhadap sesuatu antibiotik tertentu, sebelum antibiotik itu ditemui lagi. Contohnya, *Pseudomonas aeruginosa* yang sentiasa rintang terhadap flukloksasilin. Sebaliknya kerintangan yang lebih serius adalah dari segi klinikal yang dikenali sebagai kerintangan perolehan. Ini merujuk kepada keadaan di mana sebaik sahaja sesuatu bakteria itu peka kepada suatu antibiotik, ia akan menjadi perintang. Mekanisme yang bertanggungjawab ke atas kerintangan terhadap sebatian atau drug antimikrob adalah seperti yang diulas oleh Neal, (1999):

- a. **Mentakaktifkan enzim dan memusnahkan drug.** Contohnya antibiotik  $\beta$ -laktamase yang dihasilkan oleh kebanyakan stafilokokus, yang mampu mentakaktifkan sebahagian besar antibiotik penisilin dan kebanyakan sefalosporin

- b. Mengurangkan pelonggokan drug. Keadaan ini menyebabkan membran sel bakteria tidak telap, dan menyebabkan peningkatan efluks berlaku.
- c. Penukaran tapak pengikatan. Pada mikroorganisma yang bersifat rintang, tapak pengikatan drug boleh diubahsuai supaya mikroorganisma tersebut tidak mempunyai afiniti terhadap drug tersebut.
- d. Pembentukan lintasan alternatif metabolit. Bakteria yang rintang dapat menghasilkan enzim yang terubahsuai, iaitu hanya mempunyai sedikit afiniti terhadap drug atau tidak ada langsung.

Kini, masalah kerintangan terhadap antibiotik merupakan satu masalah klinikal yang utama di dunia. Didapati kerintangan terhadap agen-agen baru semakin meningkat. Masalah ini adalah lebih serius lagi berlaku di negara-negara yang sedang membangun (O'Brien, 1987). Menurut Finland *et al.*, (1959), kadar kematian akibat bakterimia di hospital bandar Boston walaupun telah menurun di antara tahun 1935 sehingga 1947, tetapi kadar kematian meningkat semula selepas itu.

McGowan-Jr (1983) telah melaporkan terdapat beberapa kajian yang dapat membuktikan hubungan antara penggunaan antibiotik dengan prevalens kerintangan. Perhubungan ini adalah agak jelas terutamanya di hospital.

- a. Kerintangan bakteria lebih lazimnya berlaku pada bakteria yang menjangkiti nosokomium di hospital berbanding dengan bakteria yang menyebabkan jangkitan yang dijangkiti di luar hospital.
- b. Penggunaan antibiotik dapat dikaitkan dengan kadar kerintangan terhadap antibiotik, di mana kadar kerintangan akan meningkat sekiranya penggunaan antibiotik meningkat, dan sebaliknya. Terdapat kajian yang menunjukkan

masalah kerintangan di sebuah unit neurosurgery hanya dapat diatasi dengan menghentikan penggunaan antibiotik.

- c. Dalam wabak jangkitan nosokomium, didapati pesakit yang terlibat biasanya adalah terdiri daripada sesiapa yang pernah diberi antibiotik terlebih dahulu.
- d. Di hospital, unit yang banyak menggunakan antibiotik seperti unit rawatan rapi juga menghadapi masalah kadar kerintangan yang tinggi. Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa di nurseri neonat, bakteria Gram negatif telah menjadi rintang terhadap kanamisin setelah antibiotik digunakan secara berlebihan (Franco *et al.*, 1973; Cichon *et al.*, 1977).
- e. Pendedahan kepada antibiotik dalam jangka masa yang panjang boleh mengakibatkan peningkatan kadar kebarangkalian mendapat kolonisasi baru oleh bakteria yang rintang.
- f. Penggunaan dos antibiotik yang tinggi mungkin meningkatkan masalah seperti berlakunya pengkolonisasian bakteria.

Masalah kerintangan bakteria terhadap antibiotik menyebabkan bakteria yang rintang amat sukar untuk dirawat dan seterusnya telah meningkatkan kadar kematian pesakit nosokomium (Lim, 1992). Di samping itu, penyalahgunaan antibiotik juga merupakan sebab utama terjadinya peningkatan kerintangan antibiotik. Hal ini sering berlaku pada kanak-kanak yang sihat di negara-negara yang antibiotiknya tidak digunakan dengan sempurna (Lester *et al.*, 1990). Penggunaan antibiotik yang berleluasa telah mengakibatkan berlakunya perubahan ekologi jangkitan bakteria. Kini, dunia sains perubatan juga telah mengalami masalah seperti itu akibat daripada penggunaan antibiotik berspektrum luas secara tidak terkawal yang mana akhirnya

telah mengakibatkan jangkitan yang disebabkan oleh yis seperti *Candida albicans* (Lim, 1992).

Dewasa ini, dunia sains perubatan juga mendapati yis patogen seperti *Trichosporon beigeli*, *C. lusitaniae* atau *C. guilliermondii* adalah rintang terhadap drug Amfoterisin B (Canuto & Rodero, 2002). Selain itu, kerintangan terhadap flukonazol pula dijumpai pada *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida stellatoidea*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, dan *T. glabrata* (McGinnis & Rinaldi, 1996). Kerintangan silang juga berlaku pada yis seperti *Candida albicans* iaitu yis tersebut yang rintang terhadap ketokonazol juga turut rintang terhadap mikonazol dan trikonazol (Johnson *et al.*, 1984). Di samping itu, strain *T. glabrata* yang rintang terhadap flukonazol, ketokonazol dan itrakonazol juga telah ditemui (Bossche *et al.*, 1992). Menurut laporan Jeljaszewicz dan rakan-rakan (2000) tentang kerintangan antibiotik Gram positif kokus, didapati mikroorganisma ini menunjukkan kerintangan intrinsik yang tinggi dan secara semula jadi terhadap agen antimikrob. Mikroorganisma patogen ini mendapat kerintangan akibat daripada penggunaan antibiotik yang kerap dan berterusan di bawah tekanan tertentu di persekitaran dan juga melalui evolusi genetik sesuatu bakteria (Adnalizawati, 2003).

Di Malaysia, masalah kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik juga merupakan satu masalah yang rumit kepada masyarakat. Kajian-kajian tertentu telah menunjukkan bahawa kerintangan terhadap antibiotik seperti penisilin dan amfisilin telah mencatat kadar yang tinggi di negara kita dalam dua puluh tahun yang lepas. Manakala kerintangan terhadap antibiotik baru seperti sefalosporin generasi ketiga dan Aztreonam juga telah timbul di masyarakat kita (Lim, 1990). Jadual 1.1 dan 1.2,

Jadual 1.1: Kerintangan *E. coli* terhadap antibiotik di Malaysia (Lim, 1992)

Antibiotik	Bilangan strain diuji ( <i>E.coli</i> )	% kerintangan
Ampisilin	7468	58
Tetrasiklin	6478	32
Kotrimokasazol	5294	50
Sefaleksin	4669	19
Sefuroksim	7135	9
Sefoperazon	6831	12
Sefotaksim	4661	4
Seflazidim	5560	7
Seftriakson	142	13
Gentamisin	7663	11
Netilmisin	5398	9
Amikasin	6359	4
Nitrofurantoin	3001	5
Asid Nalidiksik	58	2
Norfloksasin	2466	0.5
Pefloksasin	3192	1

Jadual 1.2: Kerintangan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik di Malaysia (Lim, 1992)

Antibiotik	Bilangan strain diuji ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	% kerintangan
Gentamisin	3064	29
Netilmisin	2949	23
Amikasin	3167	5
Karbenisilin	2307	44
Piperasilin	1756	18
Sefoperazon	2279	18
Sefotaksim	2035	46
Seftazidim	3145	6
Pefloksasin	1405	15



masing-masing menunjukkan kadar kerintangan antibiotik bagi *E. coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang dilaporkan di Malaysia.

Oleh itu, untuk mengelakkan atau mengatasi proses pembentukan kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik, dan untuk mendapatkan kesan antimikroorganisma yang memuaskan, usaha untuk mendapatkan antibiotik baru adalah amat diperlukan.

### 1.1.3 Pengkomersilan antibiotik

Penghasilan antibiotik juga merupakan suatu bidang ekonomi yang baik. Oleh itu, industri farmaseutis berlumba-lumba untuk memasarkan produk-produk antibiotik terutamanya yang diperlukan untuk rawatan sesuatu penyakit. Antibiotik kini bukan sahaja digunakan dengan meluas dalam bidang perubatan, malah digunakan juga dalam bidang penternakan dan pertanian. Dalam bidang pertanian, antibiotik digunakan pada takat terhad untuk mengawal penyakit tumbuhan dan bertindak sebagai agen insektisid. Penggunaan antibiotik dalam bidang pertanian dan bidang penternakan telah membawa keuntungan yang besar (Smith, 1997).

Pada masa ini, dalam bidang perubatan beratus-ratus jenis antibiotik telah diperkenalkan untuk rawatan penyakit. Antibiotik merupakan suatu drug yang penting dan paling banyak digunakan di hospital. Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa sebanyak tiga puluh peratus pesakit yang dimasukkan ke hospital diberi antibiotik (Kass, 1976). Hal yang demikian telah mengakibatkan jumlah pengeluaran

antibiotik semakin meningkat. Jumlah antibiotik yang dikeluarkan di dunia antara tahun 1978-1980, ditunjukkan pada Jadual 1.3.

Kajian telah menunjukkan bahawa perbelanjaan untuk antibiotik adalah di antara 15 % - 30 % daripada perbelanjaan farmasi. Manakala, perbelanjaan untuk antibiotik di seluruh dunia pada tahun 1980 adalah sebanyak AS 8.25 bilion. Dianggarkan jumlah perbelanjaan ini akan meningkat kepada AS 18 bilion pada 1990 dan seterusnya kepada AS 40 bilion pada tahun 2000 (Lim,1992).

Pada tahun 1994 dan 1995 pasaran antibiotik untuk rawatan penyakit manusia sahaja masing-masing mencatat sebanyak AS 18 bilion dan AS 23 bilion, iaitu peningkatan sebanyak 28 % berbanding tahun sebelumnya. Di United Kingdom sahaja pada tahun 1995, pasaran antibiotiknya telah mencatat lebih daripada AS 8 bilion iaitu dengan sefalosporin (45 %), penisilin (15 %), kuinolon (11 %), tetrasiklin (6 %), dan makrolida (5 %) (Strohl, 1997). Permintaan yang tinggi telah meningkatkan perjualan antibiotik dengan jumlah yang begitu besar.

Pada tahun 1995 juga, pasaran antibiotik antivirus adalah sebanyak AS 1.8 bilion dan dianggarkan pada tahun 1998 akan mencatat AS 3 bilion. Di samping itu, dianggarkan bilangan pesakit AIDS akan mencapai sebanyak 30 hingga 40 juta pada tahun 2000 (Strohl, 1997). Oleh itu, jelaslah bahawa pasaran drug antivirus akan terus meningkat pada masa akan datang.

Jadual 1.3: Jumlah pengeluaran antibiotik di dunia (Lim, 1992)

Antibiotik	Jumlah (ribu tan)	Tahun
Penisilin	17.0	1978
Ampisilin	2.6	1977
Amoksisilin	0.5	1977
Sefalosporin	1.2	1980
Tetrasiklin	5.0	1980
Erithrom	0.8	1980

Sementara itu, pasaran dunia bagi drug antikulat pada tahun 1995 pula mencatat lebih kurang AS 3 bilion, iaitu mencatat peningkatan sebanyak 20 % setiap tahun. Peratus yang tinggi itu merupakan satu peningkatan yang amat jelas. Peningkatan ini dipercayai adalah disebabkan oleh epidemik AIDS iaitu jangkitan kulat yang patogen pada pesakit AIDS (Strohl, 1997).

Dijangkakan pasaran antibiotik akan menuju ke satu era yang cerah pada masa depan, terutamanya dalam bidang industri perubatan dan seterusnya kepada bidang komersil. Oleh itu, keperluan mendapatkan antibiotik baru tidak haruslah diragukan lagi memandangkan antibiotik sememangnya mempunyai pasaran komersil yang tinggi dalam masyarakat yang moden hari ini.

## 1.2 ANTIBIOTIK DAN MEKANISME TINDAKANNYA

Antibiotik pertama iaitu penisilin telah ditemui oleh Alexander Fleming pada tahun 1929 secara tidak sengaja daripada kultur yang dikontaminasi oleh *Penicillium notatum*, yang berkebolehan untuk menghasilkan sejenis sebatian bersifat antibiotik yang dipanggil penisilin. Penemuan antibiotik ini merupakan satu permulaan perkembangan yang amat penting dalam bidang perubatan. Sebelum era antibiotik, penyakit berjangkit yang disebabkan oleh mikroorganisma patogen sering kali membawa maut. Penggunaan antibiotik secara besar-besaran telah bermula semasa perang dunia kedua iaitu sekitar tahun 1945, kerana pada masa tersebut penggunaan penisilin merupakan satu ubatan yang penting.

Antibiotik adalah merujuk kepada sesuatu agen kimia yang dihasilkan oleh sesuatu organisma dan mampu membunuh atau mencegah pertumbuhan organisma lain pada kepekatan yang rendah. Antibiotik juga tergolong dalam satu kumpulan khas kemoterapeutik yang dibezakan secara nyata berdasarkan penghasilannya, iaitu bahan ini adalah hasil semula jadi dan bukannya bahan kimia buatan. Walau bagaimanapun, pada masa kini pelbagai jenis antibiotik boleh disintesis di makmal. Contoh antibiotik sintetik yang dihasilkan secara pensintesisan sebatian kimia di makmal adalah seperti sulfonamida. Selain itu, terdapat juga antibiotik separa sintetik seperti kloksasilin, benzal penisilin dan metisilin. Antibiotik semisintetik pula merujuk kepada bahan asli antibiotik itu yang didapati daripada mikroorganisma dan kemudian struktur molekulnya diubahsuai supaya menjadi lebih berkesan (Kucers & Bennett, 1979).

Walaupun sejumlah besar sebatian antibiotik telah ditemui, tetapi hanya sejumlah kecil sahaja yang mempunyai nilai praktis yang tinggi dalam bidang perubatan dan bidang pertanian. Manakala, sebilangan besarnya adalah tidak praktis untuk digunakan dalam bidang perubatan dan bidang pertanian, kerana ketoksikannya yang tinggi (Irobi *et al.*, 2000). Menurut Vaara (1994), sesuatu antibiotik yang unggul seharusnya mempunyai sifat memilih iaitu hanya berketoksikan yang tinggi kepada sel sasaran sahaja. Dalam perkataan lain, antibiotik tersebut hanya bersifat toksik kepada mikroorganisma patogen sahaja dan tidak membawa sebarang kesan negatif terhadap sel perumah. Antibiotik-antibiotik yang unggul juga harus tidak mengakibatkan tindak balas alahan. Sebaliknya, ia dapat mengekalkan ciri terapeutiknya pada satu jangka masa yang panjang. Di samping itu, kos yang murah dan kaedah penyimpanan yang mudah juga merupakan ciri-ciri yang harus ada pada antibiotik yang unggul.

Aktiviti antibiotik dapat dibahagikan kepada tiga spektrum iaitu spektrum luas, sempit dan khusus (Taber *et al.*, 1987). Antibiotik yang berspektrum luas ialah antibiotik yang berkesan terhadap banyak spesies bakteria iaitu seperti bakteria Gram positif dan bakteria Gram negatif, seperti tetrasiklin (Sud & Feingold, 1975). Antibiotik yang berspektrum sempit adalah antibiotik yang hanya mampu bertindak ke atas satu kumpulan organisma sahaja. Misalnya, penisilin yang berkesan terhadap streptokokus kumpulan A dan *Neisseria gonorrhoea* (Vaara & Vaara, 1983). Manakala, antibiotik khusus pula hanya dapat merawat bakteria patogen atau penyakit tertentu sahaja. Contohnya kloramfenikol yang digunakan untuk merawat demam selesema yang disebabkan oleh *Haemophilus influenzae* (Vaara & Viljanen, 1985).

Terdapat berbagai-bagai jenis antibiotik yang telah dipisah dan digunakan secara meluas dalam kehidupan harian kita. Antibiotik yang digunakan secara meluas dalam bidang perubatan pula dapat dikelaskan kepada beberapa kumpulan utama iaitu antibakteria, antikulat dan antivirus, bergantung kepada mikroorganisma sasaran. Di samping itu, sebatian antiparasit, antiprotozoa dan antikanser juga tergolong dalam antibiotik.

### **1.2.1 Ajen antibakteria**

Antibiotik antibakteria ditakrifkan sebagai sebatian-sebatian yang dihasilkan oleh sesuatu mikroorganisma yang dapat merencat atau membunuh pertumbuhan sel-sel bakteria. Terdapat 2000 jenis antibiotik yang dikenalpasti, namun hanya 50 jenis sahaja yang disahkan penggunaannya sebagai drug terapeutis oleh WHO. Kebanyakan antibakteria adalah berasal daripada alam semula jadi. Sekitar 75 %

antibakteria yang dikenal pasti dihasilkan oleh aktinomiset terutamanya *Streptomyces* spp. dan *Nocardia* spp., 20 % dihasilkan oleh kulat dan yis, sementara 5 % lagi dihasilkan oleh bakteria *Bacillus* spp.. Oleh itu, setiap antibakteria yang dikaji dan dikenal pasti terdiri daripada sebatian-sebatian yang berlainan dengan formula kimia yang berlainan.

#### **1.2.1.1 Pengelasan antibakteria**

Secara umumnya, antibakteria dapat dikelaskan berdasarkan kepada struktur kimianya dan juga tapak sasarannya. Jadual 1.4 menunjukkan pengelasan antibiotik yang berdasarkan kepada struktur kimianya. Antaranya, kumpulan antibakteria yang utama ialah  $\beta$ -laktam (misalnya penisilin dan sefalosporin), makrolida (misalnya eritromisin), aminoglikosida (misalnya gentamisin), tetrasiklin (misalnya tetrasiklin), polipeptida (misalnya vankomisin), sulfonamida (misalnya sulfadiazin dan trimetoprim), linkosamida (linkomisin), fluorokuinon (contohnya enrofloksasin) dan kumpulan-kumpulan lain seperti kloramfenikol, nitrofurantoin dan isoniazid.

#### **1.2.1.2 Mekanisme tindakan antibakteria**

Antibiotik antibakteria adalah suatu perencat yang dapat menghalang pertumbuhan atau membunuh mikroorganisma prokariot iaitu bakteria. Sasaran tindakan antibakteria yang penting adalah dinding sel, membran sel, proses biosintesis protein, dan sintesis asid nukleik. Beberapa antibakteria pula dapat bertindak kerana agen ini menyamai faktor yang penting bagi pertumbuhan, yang diperlukan dalam

**Jadual 1.4: Pengelasan antibiotik**

Kumpulan	Contoh
Antibiotik antibakteria $\beta$ -laktam	penisilin; kloksasilin; ampisilin; sefalosporin
Makrolida	erithromisin
Aminoglikosida	gentamisin; kanamisin; amikasin
Tetrasiklin	tetrasiklin; deoksisiklin; minosiklin
Polipeptida	vankomisin
Sulfonamida	sulfadiazin; trimetoprim
Linkosamida	linkomisin; klindamisin
Fluorokuinolon	enrofloksasin
Lain-lain	kloramfenikol nitrofurantoin isoniazid



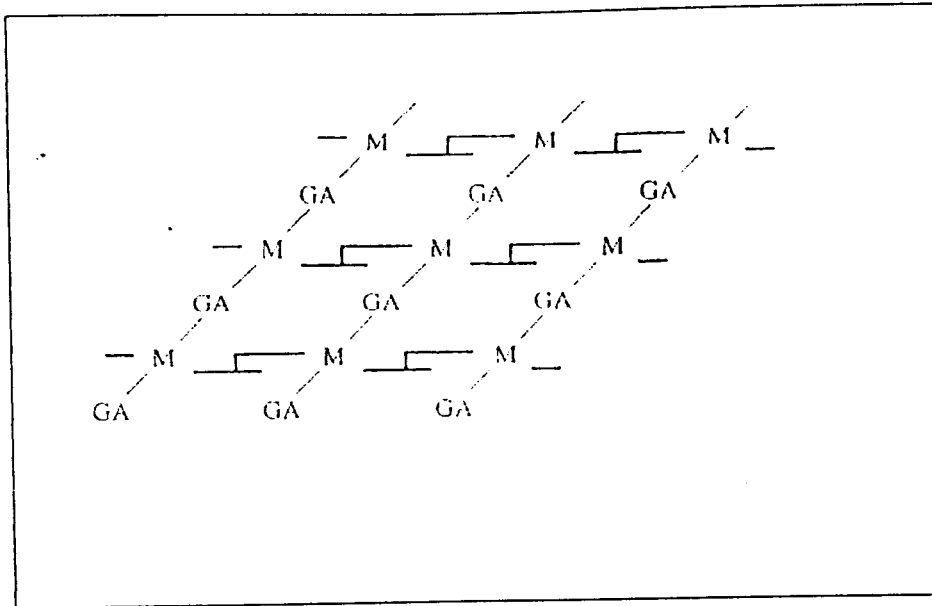
metabolisme sel bakteria tersebut (Garrod *et al.*, 1981). Oleh itu, terdapat beberapa cara atau mekanisme tindakan antibiotik antibakteria.

#### **a) Perencatan sintesis dinding sel**

Satu-satunya perbezaan antara sel mamalia (eukariot) dengan sel bakteria (prokariot) ialah kehadiran dinding sel pada sel bakteria yang tidak terdapat pada sel mamalia (Tariq, 1985). Struktur peptidoglikan pada dinding sel bakteria ditunjukkan dalam Rajah 1.1. Didapati bahawa lapisan dinding sel bakteria yang tegar terdiri daripada rantai polisakarida yang dirangkai bersilang dengan peptida dalam satu konfigurasi yang disebut peptidoglikan. Manakala sel manusia pula tidak mempunyai peptidoglikan pada dinding selnya (Brock *et al.*, 1989). Oleh itu, agen-agen yang bertindak pada dinding sel mempunyai sifat keracunan selektif yang tinggi. Ini kerana agen-agen tersebut dapat mencegah tindakan enzim transpeptidase yang diperlukan untuk tindak balas sambungan bersilang dari rantai-rantai polipeptida, yang berlaku pada lapisan peptidoglikan. Agen-agen dalam kumpulan ini umumnya amat berkesan ke atas bakteria yang sensitif terhadapnya. Contoh antibiotik yang bertindak secara ini adalah kumpulan  $\beta$ -laktam seperti penisilin, sefalosporin dan sikloserin (Lim, 1984).

#### **b) Perencatan membran sel**

Kesemua sel dikelilingi oleh suatu membran yang mempunyai struktur yang sama pada sel mikroorganisma (prokariot) dan sel mamalia (eukariot). Oleh itu, amat sukar untuk mendapatkan antibiotik yang dapat memusnahkan membran sel mikroorganisma secara pilihan. Hal ini mengakibatkan agen-agen yang bertindak



**Rajah 1.1:** Dinding sel bakteria terdiri daripada dua gula berselang-seli, iaitu N-asetil glukosamina (GA) dan asid muramik (M). Rantai-rantai gula dirangkai silang oleh segmen-segmen peptida (protein) pendek, menghasilkan pembentukan suatu polimer kompleks yang disebut peptidoglikan.

(sumber: Brock *et al.*, 1989)