

**PENGEKSTRAKAN ALGA *Gracilaria changii*,
PENCIRIAN AKTIVITI ANTIOKSIDAN, ANTIKANSER
DAN ANTIMIKROB SERTA POTENSI SEBAGAI AGEN
ANTIKANDIDA**

SASIDHARAN A/L SREENIVASAN

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2007

**PENGEKSTRAKAN ALGA *Gracilaria changii*,
PENCIRIAN AKTIVITI ANTIOKSIDAN, ANTIKANSER
DAN ANTIMIKROB SERTA POTENSI SEBAGAI AGEN
ANTIKANDIDA**

oleh

SASIDHARAN A/L SREENIVASAN

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan
bagi Ijazah Doktor Falsafah
Julai 2007**

PENGHARGAAN

Syukur kepada TUHAN yang mencipta alam ini dan yang MAHA PENYAYANG kerana dengan limpah kurniaNYA dapat saya menyiapkan projek penyelidikan ini.

Saya mengambil kesempatan ini untuk merakamkan jutaan terima kasih dan setinggi-tinggi penghargaan buat penyelia saya yang amat saya hormati dan sanjungi, **PROFESOR DR. HAJAH DARAH IBRAHIM** yang telah memberikan tunjuk ajar, bantuan, dorongan, motivasi dan sokongan beliau kepada saya sepanjang tempoh penyelidikan ini dijalankan. Beliau juga merupakan seorang IDOLA bagi seseorang pelajar yang ingin berjaya dalam hidup dan saya sentiasa bangga menjadi salah seorang pelajar beliau. Saya juga ingin berdoa kepada TUHAN YANG MAHA PENYAYANG supaya melanjutkan usia beliau, memberikan beliau kesihatan baik, kejayaan yang cemerlang dan gemilang dalam semua perkara yang beliau lakukan dan sentiasa ceria bersama keluarga tercinta. Semua pertolongan beliau hanya TUHAN yang dapat balaskan.

Saya juga ingin merakamkan ribuan terima kasih kepada Profesor Madya Dr. Jain Noordin Kassim kerana banyak berkongsi pengetahuan dan tunjuk ajar beliau semasa proses pengekstrakan dan pemencilan sebatian bioaktif dilakukan.

Saya juga merakamkan ribuan terima kasih kepada Profesor Madya Dr. Tengku Sifizul Muhamad kerana banyak berkongsi pengetahuan dan tunjuk ajar beliau semasa ujian kesitotoksikan dilakukan dengan menggunakan sel kanser.

Tidak lupa juga ucapan ribuan terima kasih kepada Cik Lim Sheh Hong dan Puan Suraya yang telah banyak membantu semasa perjalanan projek ini. Saya berdoa untuk kejayaan anda.

Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada semua staf Pusat Pengajian Sains Kajihayat, Institut Penyelidikan Siswazah yang memberi banyak pertolongan kepada saya sebagai seorang pelajar.

Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada En. Muthu dari Unit Elektron Mikroskop yang memberi banyak pertolongan dan tunjuk ajar tentang perisian komputer terkini yang berkaitan dengan Mikroskop Elektron. Tidak lupa juga Hajah Jamilah dan Encik Johari yang turut membantu. Jutaan terima kasih saya ucapkan untuk jasa anda.

Rakaman ribuan terima kasih juga diucapkan kepada Encik Bakar dan Cik Shantini dari bahagian histologi sel haiwan yang membantu semasa kajian histologi haiwan dilakukan.

Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih dan sekalung penghargaan kepada Saudari Yoga Latha yang telah membantu semasa projek ini berjalan dan sudi menaip sebahagian daripada Tesis ini. Saya juga merakamkan ribuan terima kasih kepada Saudari Devaki yang sentiasa berkongsi suka dan duka serta sentiasa memberi sokongan moral dan motivasi.

Penghargaan dan ribuan terima kasih juga diucapkan kepada semua kakitangan Pusat Pengajian Sains Kajihayat terutamanya Puan Nurul, Encik Hamzah, Puan Falizah, En Khairul, dan En Rashid.

Tidak ketinggalan juga Prof. Ibarahim Cheh Omar, Prof. Suresh Narayanan, Siva Sri Muthukumara Gurukul, Cikgu Ruthirapaty Devar, Dr

Kadeer Ibrahim, Dr. Surash, Dr. Loganathan, Dr. Karthigesu, Sree Shalini, Pn. Ruzaina, Sumathi, Lim Kok Weng, Shikin, Leong, Najihah, Mardiana, Nithianantham, Wendy, Bing, Yetty, Pei Kheng, Encik Parthiban, Encik D. Saravanan, En Kiru (Perpustakaan), Encik Letchu, Encik Dass, Encik Bala, Sangetha, Mei Mei dan yang lain-lain yang saya kenali, diucapkan ribuan terima kasih diatas sokongan moral, motivasi dan galakan anda semua.

Jasa baik kalian tidak dapat dilupakan. Semoga Tuhan memberkati anda semua.

SASIDHARAN SREENIVASAN

2006

**TESIS INI ADALAH BUAT KEBANGGAN AYAH EN.
SREENIVASAN, IBU PN. KALYANI, KAKAK SARASANGI BALA
KRISHNAN, ABANG GENGADHARAN, ADIK SUTHAKARAN
DAN YOGA LATHA YANG TERSAYANG
I DEDICATED THIS THESIS TO MY BELOVED MASTER
PARAMAHANSA YOGANANDA**

KANDUNGAN	MUKA SURAT
PENGHARGAAN	ii
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xvi
SENARAI RAJAH	xviii
PENERBITAN DARIPADA PENYELIDIKAN INI	xxiii
RINGKASAN YANG DIGUNAKAN	xxv
ABSTRAK	xxvi
ABSTRACT	xxviii
BAB 1 PENGENALAN	1
1.1 Tumpuan Dan Objektif Penyelidikan	7
BAB 2 TINJAUAN BAHAN BACAAN	9
2.1 Bahan semula jadi dan kajian aktiviti antimikrob dahulu kini dan pada masa hadapan	9
2.1.1 Kajian aktiviti antimikrob: Masalah dan penyelesaian	12
2.2 Keperluan untuk mendapat antibiotik baru	15
2.2.1 Timbulnya penyakit baru dan mikroorganisma baru	17
2.2.2 Kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik	21
2.2.2.1 Mekanisme genetik	23
2.2.2.2 Mekanisme biologi	25
2.2.3 Pengkomersilan antibiotik	29
2.3 Antibiotik dan mekanisme tindakannya	34
2.3.1 Antibiotik antibakteria	34
2.3.1.1 Pengelasan antibiotik antibakteria	35

2.3.1.2 Mekanisme tindakan antibiotik antibakteria	35
2.3.2 Antibiotik antikulat	40
2.3.2.1 Pengelasan antibiotik antikulat	42
2.3.2.2 Mekanisme tindakan antibiotik antikulat	42
2.4 Organisma marin sebagai sumber sebatian antibiotik	46
2.4.1 Organisma marin yang berpotensi sebagai sumber bahan semula jadi	49
2.4.1.1 Timun laut	49
2.4.1.2 Span marin	50
2.4.1.3 Tunikat	50
2.4.1.4 Briozoa	51
2.4.1.5 Moluska	52
2.4.1.6 Alga	52
2.4.2. Agen anti-jangkitan daripada sumber marin	56
2.4.2.1 Sumber marin sebagai agen antikulat	56
2.4.2.2 Sumber marin sebagai agen antibakteria	59
2.4.2.3 Sumber marin sebagai agen antivirus	61
2.4.2.4 Sumber marin sebagai agen antimalaria	62
2.5 Kandidiasis	63
2.5.1 Ciri-ciri mikrobiologi <i>Candida albicans</i>	69
2.5.2 Patofisiologi dan faktor kevirulenan	70
2.6 Radikal Bebas	73
2.6.1 Antioksidan	74
2.6.2 Antioksidan semula jadi	75
2.6.2.1 Flavonoid	75

2.6.2.2	Karotenoid	76
2.6.2.3	Vitamin	77
2.7	GRACILARIA CHANGII	78
Bab 3.0	PEMPROFILAN KOMPONEN BIOAKTIF EKSTRAK G. CHANGII MENGIKUT MASA PERSAMPELAN	81
3.1	PENGENALAN	81
3.2	BAHAN DAN KAEDAH	82
3.2.1	Penyampelan alga <i>Gracilaria changii</i>	82
3.2.1.1	Pembasuhan dan pengeringan	82
3.2.2	Pengekstrakan	84
3.2.2.1	Kaedah pengekstrakan dengan menggunakan metanol : kloroform	84
3.2.2.2	Kaedah pengekstrakan menggunakan metanol dan pengekstrakan berperingkat menggunakan pelarut yang berlainan	84
3.2.3	Penyisihan pelbagai ekstrak dengan kaedah kromatografi lapisan nipis untuk menentukan profil komponen bioaktif ekstrak <i>G. changii</i>	88
3.2.4	Pengesanan kumpulan berfungsi ekstrak metanol <i>G. changii</i> dengan kaedah Spektroskopi Fourier Transform Infra Red (FTIR)	89
3.3	KEPUTUSAN	89
3.3.1	Pelbagai penyediaan ekstrak daripada <i>G. changii</i>	89
3.3.2	Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> dengan kaedah TLC	91
3.3.3	Hasil pengesanan kumpulan berfungsi dengan kaedah FTIR	100
3.4	PERBINCANGAN	108
3.5	KESIMPULAN	118

BAB 4.0 KAJIAN AKTIVITI ANTIOKSIDAN EKSTRAK <i>G. CHANGII</i> SECARA <i>IN VITRO</i>	119
4.1 PENGENALAN	119
4.2 BAHAN DAN KAEDAH	120
4.2.1 Bahan Kimia	120
4.2.2 Sampel <i>G. changii</i> dan penyediaan ekstrak alga	120
4.2.3 Aktiviti Penjerapan Radikal Bebas	121
4.2.4 Penyisihan TLC-DPPH dan penentuan aktiviti penjerapan radikal bebas	122
4.2.5 Ujian penentuan kandungan jumlah sebatian fenol	122
4.2.6 Analisis statistik	123
4.3 KEPUTUSAN	123
4.4 PERBINCANGAN	128
4.5 KESIMPULAN	133
BAB 5.0 AKTIVITI ANTIMIKROB PELBAGAI EKSTRAK <i>G. CHANGII</i>	134
5.1 PENGENALAN	134
5.2 BAHAN DAN KAEDAH	135
5.2.1 Mikroorganisma ujian	135
5.2.1.1 Bakteria ujian	135
5.2.1.2 Kulat ujian	135
5.2.1.3 Yis ujian	136
5.2.2 Penyediaan inokulum	136
5.2.2.1 Bakteria	136
5.2.2.2 Kulat	137

5.2.2.3. Yis	137
5.2.3 Ekstrak <i>G. changii</i>	137
5.2.4 Penentuan aktiviti antimikrob pelbagai ekstrak <i>G. changii</i> terhadap mikroorganisma ujian	137
5.2.4.1 Penyaringan mikroorganisma ujian dengan pelbagai ekstrak <i>G. changii</i>	137
5.2.5 Kesan kepekatan pelbagai ekstrak <i>G. changii</i> terhadap mikroorganisma ujian	139
5.2.5.1 Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) bagi mikroorganisma ujian	139
5.2.5.2 Penentuan Kepekatan Maut Minimum (MLC) bagi mikroorganisma ujian	140
5.2.6 Kesan ekstrak metanol <i>G. changii</i> terhadap profil pertumbuhan mikroorganisma	141
5.2.6.1 Kesan pelbagai kepekatan ekstrak metanol <i>G. changii</i> ke atas pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	141
5.2.6.1.1 Penentuan corak pertumbuhan	142
5.2.7 Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selepas penindasan oleh ekstrak metanol <i>G. changii</i>	142
5.2.7.1 Pengamatan menggunakan mikroskop elektron imbasan (SEM)	143
5.2.7.2 Pengamatan menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM)	143
5.3 KEPUTUSAN	143
5.3.1 Penentuan aktiviti antimikrob pelbagai penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> terhadap mikroorganisma ujian	143

5.3.2	Kesan kepekatan pelbagai penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> terhadap mikroorganisma ujian	144
5.3.2.1	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)	147
5.3.2.2	Penentuan Kepekatan Maut Minimum (MLC)	150
5.3.3	Kesan penambahan ekstrak metanol <i>G. changii</i> ke atas profil pertumbuhan mikroorganisma ujian	152
5.3.3.1	Kesan pelbagai kepekatan ekstrak metanol <i>G. changii</i> ke atas pertumbuhan sel <i>Candida albicans</i>	152
5.3.4	Kesan pelbagai kepekatan ekstrak metanol <i>G. changii</i> ke atas pertumbuhan sel <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	154
5.3.5	Kesan pelbagai kepekatan ekstrak metanol <i>G. changii</i> ke atas pertumbuhan sel <i>Bacillus subtilis</i>	156
5.3.6	Kesan perubahan struktur dan morfologi mikroorganisma ujian selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i> .	158
5.3.6.1	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Candida albicans</i> selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i>	158
5.3.6.2	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i>	162
5.3.6.3	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Bacillus subtilis</i> selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i>	166
5.4	PERBINCANGAN	170
5.4.1	Penentuan aktiviti antimikrob pelbagai ekstrak <i>G. changii</i> terhadap mikroorganisma ujian	170

5.4.2	Kesan kepekatan pelbagai ekstrak <i>G. changii</i> terhadap mikroorganisma ujian	179
5.4.3	Kesan ekstrak <i>G. changii</i> ke atas profil pertumbuhan <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> dan <i>B. subtilis</i>	184
5.4.4	Kesan perubahan struktur dan morfologi mikroorganisma ujian selepas penindasan oleh ekstrak metanol <i>G. changii</i>	187
5.4.4.1	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Candida albicans</i> selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i>	187
5.4.4.2	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i>	192
5.4.4.3	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel <i>Bacillus subtilis</i> selepas penindasan ekstrak metanol <i>G. changii</i>	194
5.5	KESIMPULAN	196
BAB 6.0	KAJIAN KESITOTOKSIKAN EKSTRAK <i>GRACILARIA CHANGII</i> SECARA <i>IN VIVO</i> DAN <i>IN VITRO</i>	197
6.1	PENGENALAN	197
6.2	BAHAN DAN KAEDAH	197
6.2.1.	Sampel <i>G. changii</i> dan penyediaan ekstrak	197
6.2.2	Penyediaan haiwan makmal untuk kajian kesitotoksikan	198
6.2.3	Ujian kesitotoksikan dengan menggunakan anak udang brin (<i>Artemia salina</i>)	198
6.2.4	Ujian kesitotoksikan ekstrak kasar <i>G. changii</i> ke atas sel kanser HepG2	199
6.2.5	Kajian kesitotoksikan akut dengan menggunakan mencit	202
6.2.5.1	Statistik	203

6.3 KEPUTUSAN	204
6.4 PERBINCANGAN	214
6.5 KESIMPULAN	217
BAB 7.0 PEMFRAKSIAN, PEMENCILAN DAN PENGECEMAN SEBATIAN BERSIFAT ANTIKANDIDA DARIPADA EKSTRAK METANOL <i>G. CHANGII</i>	219
7.1 PENGENALAN	219
7.2 BAHAN DAN KAEDAH	220
7.2.1 Pemilihan fasa bergerak dengan kromatografi lapisan nipis	220
7.2.2 Pemfraksian ekstrak kasar metanol <i>G. changii</i> dengan kromatografi turus untuk menentukan aktiviti antiyis	221
7.2.3 Bioautograf pada agar dekstrosa Sabouraud (SDA) dengan kaedah TLC	222
7.2.4 Pemencilan sebatian bioaktif dengan kaedah kromatografi lapisan nipis TLC	223
7.2.5 Penentuan ketulenan sebatian bioaktif yang dipencilkan daripada ekstrak <i>G. changii</i>	224
7.2.6 Penentuan aktiviti antikandida dan kesan perubahan morfologi sel <i>C. albicans</i> selepas penindasan oleh sebatian bersifat antimikrob daripada <i>G. changii</i>	225
7.3 KEPUTUSAN	225
7.3.1 Pemilihan fasa bergerak dengan Kromatografi Lapisan Nipis	225
7.3.2 Pemfraksian ekstrak kasar metanol <i>G. changii</i> dengan kromatografi turus untuk menentukan aktiviti antiyis	225
7.3.3 Bioautograf pada agar dekstrosa Sabouraud (SDA) dengan kaedah TLC	227
7.3.4 Penentuan ketulenan dan mengesan bilangan komponen dalam sebatian bersifat antimikrob ekstrak <i>G.changii</i>	227

7.3.5 Penentuan aktiviti antikandida dan kesan perubahan morfologi sel <i>C. albicans</i> selepas penindasan oleh sebatian bersifat antimikrob daripada <i>G. changii</i>	231
7.4 PERBINCANGAN	235
7.5 KESIMPULAN	241
BAB 8.0 PENGGUNAAN EKSTRAK <i>G. CHANGII</i> SEBAGAI AGEN RAWATAN KE ATAS MENCIT YANG DIARUHKAN JANGKITAN PENYAKIT	242
8.1 PENGENALAN	242
8.2 BAHAN DAN KAEDAH	243
8.2.1 Penyediaan <i>Candida albicans</i>	243
8.2.2 Penyediaan haiwan kajian	243
8.2.3 Penentuan Kepekatan Membunuh 50% (LD ₅₀ ; 50% Lethal Dose)	244
8.2.4 Penentuan kestabilan ekstrak <i>G. changii</i> (GCM) di dalam cecair gastrik dan usus tiruan secara <i>in vitro</i>	245
8.2.5 Jangkitan kandidiasis sistemik dan rawatan	246
8.2.5.1 Penyediaan haiwan	246
8.2.5.2 Penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> dan ketokonazol	246
8.2.5.3 Rawatan sistemik kandidiasis secara oral	247
8.2.5.4 Pemeriksaan histologi	247
8.2.5.5 Pengiraan unit pembentukan koloni (CFU)	248
8.2.6 Jangkitan kandidiasis kulit dan rawatan	249
8.2.6.1 Penyediaan agen antiyis daripada ekstrak <i>G. changii</i>	249
8.2.6.2 Pengaruh jangkitan penyakit pada	

kulit mencit	249
8.2.6.3 Pengiraan unit pembentukan koloni (CFU)	250
8.2.6.4 Pemeriksaan histologi	250
8.3 KEPUTUSAN	251
3.3.1 Penentuan Kepekatan Membunuh 50% (LD ₅₀ , 50% Lethal Dose)	251
8.3.2 Penentuan kestabilan ekstrak kasar <i>G. changii</i> di dalam cecair gastrik dan usus tiruan secara <i>in vitro</i> .	259
8.3.3 Jangkitan kandidiasis sistemik dan rawatan	261
8.3.4 Jangkitan kandidiasis kulit dan rawatan	265
8.3.4.1 Pengaruh penyakit pada mencit dan rawatan terhadap penyakit	265
8.3.4.2 Pengiraan unit pembentukan koloni (CFU)	265
8.3.4.3 Pemeriksaan histologi	270
8.4 PERBINCANGAN	274
8.5 KESIMPULAN	282
BAB 9.0 PERBINCANGAN UMUM DAN CADANGAN KAJIAN LANJUTAN	284
RUJUKAN	289
LAMPIRAN	329

SENARAI JADUAL	MUKA SURAT
Jadual 2.1 Penyakit utama yang menjadi pembunuh manusia di peringkat dunia	18
Jadual 2.2: Kerintangan <i>E. coli</i> terhadap antibiotik di Malaysia (Lim, 1992)	30
Jadual 2.3: Kerintangan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> terhadap antibiotik di Malaysia (Lim, 1992)	31
Jadual 2.4: Pengelasan antibiotik	36
Jadual 2.5: Kumpulan utama antikulat (Gupte <i>et al.</i> , 2002)	43
Jadual 2.6: Aktiviti biologi daripada alga marin	57
Jadual 3.1: Peratusan pelbagai penyediaan ekstrak yang diekstrak daripada <i>G. changii</i>	92
Jadual 3.2 : Jumlah jalur yang hadir dan keamatannya mengikut bulan	93
Jadual 3.3 : Puncak utama yang hadir dan luas permukaannya mengikut bulan	107
Jadual 5.1: Penyaringan aktiviti antimikrob pelbagai penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> (100 mg/ml) ke atas mikroorganisma ujian	145
Jadual 5.2: Nilai Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) yang ditunjukkan oleh pelbagai penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> .	149
Jadual 5.3: Nilai Kepekatan Maut Minimum (MLC) yang ditunjukkan oleh pelbagai penyediaan ekstrak <i>G. changii</i> .	151
Jadual 6.1: Penyediaan medium pertumbuhan sel kanser HepG2	200
Jadual 6.2: Kesan ekstrak <i>G. changii</i> terhadap indeks berat organ terhadap berat badan (%) mencit	213
Jadual 8.1 : Rekod bilangan kematian pada saiz inokulum <i>C. albicans</i> yang berlainan untuk penentuan nilai LD 50 %	252

Jadual 8.2: Rekod bilangan kematian mencit yang dijangkiti untuk rawatan yang berlainan	262
Jadual 8.3: Rekod unit pembentukan koloni (CFU) untuk sampel darah dan homogenat ginjal mencit	263

SENARAI RAJAH	MUKA SURAT
Rajah 2.1: Mekanisme tindakan antibiotik yang umum	38
Rajah 2.2: Struktur beberapa sebatian daripada sumber marin	48
Rajah 2.3: Patofisiologi penyerangan kandidiasis	72
Rajah 3.1 : <i>Gracilaria changii</i> di kawasan paya bakau Pantai Morib, Selangor	83
Rajah 3.2: Carta alir pengekstrakan <i>G. changii</i> menggunakan pelarut metanol : kloroform	85
Rajah 3.3: Carta alir pengekstrakan berperingkat <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelbagai pelarut	87
Rajah 3.4 : Pelbagai penyediaan ekstrak yang diperolehi daripada <i>G. changii</i>	90
Rajah 3.5: Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak kasar <i>G. changii</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis dibawah (A) cahaya biasa dan (B) cahaya ultra lembayung bagi bulan Februari.	94
Rajah 3.6: Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak kasar <i>G. changii</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis dibawah (A) cahaya biasa dan (B) cahaya ultra lembayung bagi bulan April.	95
Rajah 3.7: Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak kasar <i>G. changii</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis dibawah (A) cahaya biasa dan (B) cahaya ultralembayung bagi bulan Jun.	96
Rajah 3.8: Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak kasar <i>G. changii</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis dibawah (A) cahaya biasa dan (B) cahaya ultra lembayung bagi bulan Ogos.	97
Rajah 3.9: Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak kasar <i>G. changii</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis dibawah (A) cahaya biasa dan (B) cahaya ultra lembayung bagi bulan Oktober.	98
Rajah 3.10: Hasil penyisihan pelbagai penyediaan ekstrak kasar <i>G. changii</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis dibawah (A) cahaya biasa dan (B) cahaya ultra lembayung bagi bulan Disember	99

Rajah 3.11: Spektrum FTIR bagi ekstrak <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelarut metanol yang disampelkan pada bulan Februari.	101
Rajah 3.12: Spektrum FTIR bagi ekstrak <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelarut metanol yang disampelkan pada bulan April.	102
Rajah 3.13: Spektrum FTIR bagi ekstrak <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelarut metanol yang disampelkan pada bulan Jun.	103
Rajah 3.14: Spektrum FTIR bagi ekstrak <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelarut metanol yang disampelkan pada bulan Ogos.	104
Rajah 3.15: Spektrum FTIR bagi ekstrak <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelarut metanol yang disampelkan pada bulan Oktober.	105
Rajah 3.16: Spektrum FTIR bagi ekstrak <i>G. changii</i> dengan menggunakan pelarut metanol yang disampelkan pada bulan Disember.	106
Rajah 4.1: Peratusan penjerapan ekstrak <i>G. changii</i> berbanding dengan antioksidan sintetik	120
Rajah 4.2: Kelok perencatan mengikut dos dan nilai IC ₅₀ bagi ekstrak <i>G. changii</i>	122
Rajah 4.3: Penyisihan TLC-DPPH dan penentuan jalur kuning dengan aktiviti penjerapan pada nilai R _f 0.63 (A) berbanding dengan plat TLC kawalan (B)	123
Rajah 5.1: Zon perencatan ekstrak metanol daripada <i>G. changii</i> ke atas pertumbuhan yis ujian, <i>Candida albicans</i> strain 2	146
Rajah 5.2: Keputusan MYC dan MIC ekstrak metanol <i>G. changii</i> ke atas <i>Candida albicans</i> strain 2 dengan menggunakan Teknik Kultur Tabung. Nilai MIC adalah 3.125 mg/ml dan nilai MYC pula adalah 6.25 mg/ml	148
Rajah 5.3: Profil pertumbuhan <i>Candida albicans</i> dalam ekstrak metanol <i>G. changii</i> pada kepekatan 1.56 mg/ml (1/2 MIC), 3.13 mg/ml (MIC) dan 6.25 mg/ml (2MIC)	153
Rajah 5.4: Profil pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dalam	

ekstrak metanol <i>G. changii</i> pada kepekatan 3.13 mg/ml (1/2 MIC), 6.25 mg/ml (MIC) dan 12.5 mg/ml (2MIC)	155
Rajah 5.5: Profil pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i> dalam ekstrak metanol <i>G. changii</i> pada kepekatan 1.56 mg/ml (1/2 MIC), 3.13 mg/ml (MIC) dan 6.25 mg/ml (2MIC)	157
Rajah 5.6: Mikrograf SEM <i>Candida albicans</i> yang telah diolah dengan ekstrak metanol <i>G. changii</i> berkepekatan 100 mg/ml	159
Rajah 5.7: Mikrograf TEM <i>Candida albicans</i> yang telah diolah dengan ekstrak metanol <i>G. changii</i> berkepekatan 100 mg/ml.	161
Rajah 5.8: Mikrograf SEM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> yang telah diolah dengan ekstrak metanol <i>G. changii</i> berkepekatan 100 mg/ml	163
Rajah 5.9: Mikrograf TEM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> yang telah diolah dengan ekstrak metanol <i>G. changii</i> berkepekatan 100 mg/ml	165
Rajah 5.10: Mikrograf SEM <i>Bacillus subtilis</i> yang telah diolah dengan ekstrak metanol <i>G. changii</i> berkepekatan 100 mg/ml	167
Rajah 5.11: Mikrograf SEM <i>Bacillus subtilis</i> yang telah diolah dengan ekstrak metanol <i>G. changii</i> berkepekatan 100 mg/ml	169
Rajah 6.1 : Kesan perencatan ekstrak <i>G. changii</i> terhadap sel kanser HepG2 pada kepekatan tertentu	205
Rajah 6.2: Keputusan ujian kesitotoksikan ekstrak <i>G. changii</i> menggunakan anak udang brin selepas 6 jam	206
Rajah 6.3: Keputusan ujian kesitotoksikan ekstrak <i>G. changii</i> menggunakan anak udang brin selepas 24 jam	207
Rajah 6.4: Keputusan ujian kesitotoksikan potasium dikromat (kawalan positif) menggunakan anak udang brin selepas 6 jam	208
Rajah 6.5: Keputusan ujian kesitotoksikan potasium dikromat (Kawalan positif) menggunakan anak udang brin selepas 24 jam	209
Rajah 6.6: Anak udang brin (<i>Artemia salina</i>) yang telah mati	

akibat ditindak oleh ekstrak <i>G. changii</i> .	210
Rajah 6.7: Pemeriksaan histopatologi: (A) Ginjal, (B) Hati dan (C) Paru-paru	212
Rajah 7.1: Fasa bergerak kloroform: metanol dengan nisbah 85:15 yang menunjukkan keputusan yang terbaik yang dapat membentuk jalur terpisah yang terbanyak pada plat aluminium TLC	226
Rajah 7.2: Zon perencatan Fraksi 3 <i>G. changii</i> keatas pertumbuhan yis ujian, <i>Candida albicans</i> strain 2	228
Rajah 7.3: Keputusan kajian perbandinagn bagi pencapjarian TLC Fraksi 3 daripada kromatografi turus di bawah cahaya ultra lembayung dan pencapjarian TLC ekstrak kasar metanol <i>G. changii</i> dan bioautogram dengan zon perencatan diatas permukaan medium SDA pada jalur dengan nilai R_f 0.63	229
Rajah 7.4: Kromatogram HPLC Fraksi 3 yang diperolehi daripada ekstrak kasar <i>G. changii</i> dan datanya	230
Rajah 7.5: Mikrograf SEM <i>Candida albicans</i> yang telah diolah dengan sebatian bersifat antimikrob (SBA) daripada ekstrak <i>G. changii</i> pada kepekatan 1.0 mg/ml	232
Rajah 7.6: Mikrograf TEM <i>Candida albicans</i> yang telah didedahkan kepada sebatian bersifat antimikrob (SBA) daripada ekstrak <i>G. changii</i> pada kepekatan 1.0 mg/ml.	234
Rajah 8.1: Peratusan mortaliti mencit yang dijangkiti <i>C. albicans</i> pada saiz inokulum berbeza	254
Rajah 8.2: Jangkitan kandidiasis keatas organ ginjal oleh <i>C. albicans</i>	256
Rajah 8.3: Kajian histologi jangkitan kandidiasis sistemik pada organ ginjal (pewarnaan PAS) diamati di bawah mikroskop cahaya	258
Rajah 8.4: Penentuan kestabilan ekstrak <i>G. changii</i> di dalam cecair gastrik dan usus tiruan	260
Rajah 8.5: Mencit kawalan yang normal selepas di cukur pada bahagian dorsal	266
Rajah 8.6: Mencit yang telah diaruhkan dengan jangkitan oleh sel <i>C. albicans</i>	267

Rajah 8.7: Koloni putih yang terbentuk pada agar dekstroza Sabouraud (SDA) yang mengesahkan kehadiran <i>C. albicans</i>	268
Rajah 8.8: Perbezaan diantara unit pembentukan koloni (CFU) untuk rawatan salap 10 % ekstrak <i>G. changii</i> dan salap parafin kuning (kawalan)	269
Rajah 8.9: Keputusan pemeriksaan histologi bagi kulit mencit yang normal dengan folikel ramput (F) dan gelenjar sebum (GS)	271
Rajah 8.10: Keputusan pemeriksaan histologi bagi kulit yang telah dijangkiti oleh <i>C. albicans</i>.	272
Rajah 8.11: Keputusan pemeriksaan histologi bagi kulit yang telah dijangkiti oleh <i>C. albicans</i> dirawat dengan salap antiyis yang diperbuat daripada 10% ekstrak <i>G. changii</i> pada hari ke-14.	273

PENERBITAN DARIPADA PENYELIDIKAN INI

1. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2006). Acute toxicity of marine algae *G. changii* crude extract in mice. *The 3rd Life Sciences Postgraduate Conference: 'Life Sciences: Moving in Synchrony with the Changes in the World'*. 1st USM-Penang International Postgraduate Convention. Universiti Sains Malaysia, Penang. 24-27 Mei 2006 Penang.
2. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2006). Wound healing potential of *Gracillaria changi* crude extract in mice. *The 3rd Life Sciences Postgraduate Conference: 'Life Sciences: Moving in Synchrony with the Changes in the World'*. 1st USM-Penang International Postgraduate Convention. Universiti Sains Malaysia, Penang. 24-27 Mei 2006 Penang.
3. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2005). SEM and TEM studies of The *B. subtilis* cells after treated with the crude extract of *G. changii*. *Proceeding of the 14th Scientific Conference and 15th Annual General Meeting of Electron Microscopy Society of Malaysia. 5th- 7th December 2005. Vistana Hotel Penang.*
4. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2005). Morphological changes of *Pseudomonas aeruginosa* cells after exposure to crude extract of *G. changii*. *Proceeding of the 27th Symposium of the Malaysian Society for Microbiology Grand Plaza Park Royal Penang. 24-27 November 2005. pp. 490-492.*
5. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2005). The preliminary isolation and *In Vitro* antiyeast activity of active fraction from crude extract of *G. changii*. *Proceeding of the 27th Symposium of the Malaysian Society for Microbiology Grand Plaza Park Royal Penang. 24-27 November 2005. pp. 487-489.*
6. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2004). *Invivo* and *invitro* toxicity studies of crude extract of *G. changii*. *Proceedings of 26th Symposium of the Malaysian Society for Microbiology, Microbes: The Gateway to Biotechnology, Langkawi, 25-28 November 2004. pp. 348-351.*
7. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2003). Antimicrobial activity of crude extract from *G. changii*. *The 14th National Biotechnology Seminar. 11-13 December 2003 Penang. pp. 39-44.*
8. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2003). Structural deterioration of *C. albicans* cells after exposure to crude extract from *G. changii*. *The 14th National Biotechnology Seminar. 11-13 December 2003 Penang. pp.128-131.*
9. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2007). SEM and TEM studies of the *Bacillus subtilis* cells after treatment with a crude extract of *Gracillaria changii*. *Malaysian Journal of Microscopy. (in press)*

10. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2007). Antioxidant Activity of *Gracilaria changii*, The *Usm-Unair First Collaborative Conference*. 13-14th June 2007, Usm, Penang.
11. **Sasidharan, S.**, Darah, I. and Jain, K. (2007). Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Gracilaria changii*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3): In press

RINGKASAN YANG DIGUNAKAN

BHT	hidroksitoluena berbutilat
CFU	unit pembentukan koloni
DPPH	α, α -difenil- β -pikrilhidrazil
FTIR	spektroskopi Fourier Transform Infra Red
GA	asid galik
GCB	Ekstrak butanol <i>G. changii</i>
GCCM	Ekstrak kloroform metanol <i>G. changii</i>
GCDE	Ekstrak dietil eter <i>G. changii</i>
GCEA	Ekstrak etil asetat <i>G. changii</i>
GCM	Ekstrak metanol <i>G. changii</i>
HPLC	kromatografi cecair berprestasi tinggi
IC₅₀	kepekatan perencatan 50%
LC₅₀	kepekatan maut 50%
LD₅₀	dos membunuh 50%
MBC	kepekatan bakterisid minimum
MFC	kepekatan fungisid minimum
MIC	kepekatan perencatan minimum
MLC	kepekatan maut minimum
MYC	kepekatan yistosid minimum
NA	agar nutrient
OD	ketumpatan optic
PAS	pewarnaan asid periodic Schiff
R_f	nilai relative pergerakan
SDA	agar dekstrosa Sabouraud
SEM	mikroskop elektron penskanan
TEM	mikroskop elektron transmisi
TLC	kromatografi lapisan nipis
UV	sinaran ultra lembayung

PENGEKSTRAKAN ALGA *Gracilaria changii*, PENCIRIAN AKTIVITI ANTIOKSIDAN, ANTIKANSER DAN ANTIMIKROB SERTA POTENSI SEBAGAI AGEN ANTIKANDIDA

ABSTRAK

Penyelidikan ini telah dijalankan untuk mengkaji kesan aktiviti antimikrob, antioksidan dan antikanser serta melihat keberkesanan ekstrak *Gracilaria changii* sebagai agen rawatan ke atas mencit yang diaruhkan penyakit. Sebanyak lima jenis penyediaan ekstrak telah diperolehi daripada pengekstrakan *G. changii* iaitu ekstrak metanol (GCM), dietil eter (GCDE), etil asetat (GCEA), butanol (GCB) dan ekstrak metanol: kloroform (GCCM) (1:1 v/v). Penyelidikan tentang kehadiran sebatian kimia di dalam ekstrak GCM, GCDE, GCEA, GCB dan GCCM menunjukkan bahawa sebatian kimia yang sama hadir dalam semua ekstrak sepanjang tahun, tetapi kuantitinya berubah-ubah. Kajian penyaringan ekstrak GCM, GCDE, GCEA, GCB dan GCCM menunjukkan terdapat aktiviti antimikrob terhadap bakteria Gram positif, Gram negatif dan yis yang signifikan tetapi tidak ada aktiviti antikulat. Kesan kepekatan perencatan minimum (MIC) dan kesan kepekatan maut minimum (MLC) bagi ekstrak GCM, GCDE, GCEA, GCB and GCCM telah ditentukan dan didapati dalam julat 3.125-12.500 mg/ml dan 6.25-25.00 mg/ml, masing-masing. Ekstrak GCM pada kepekatan MIC, separuh MIC dan dua kali MIC didapati menindas fasa awal pertumbuhan yis (*Candida albicans*) dan bakteria, (*P. aeruginosa* dan *B. subtilis*). Pencerapan mikroskopi pula menunjukkan bahawa ekstrak GCM dapat mengakibatkan berlakunya beberapa perubahan dalam fisiologi dan morfologi sel *C. albicans*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*. Kajian antioksidan yang dilakukan terhadap ekstrak GCM menunjukkan aktiviti antioksidan dengan nilai IC₅₀ 15.77 mg/ml

dan kajian kromatografi lapisan nipis pula menunjukkan ia mengandungi hanya satu jalur yang menunjukkan penjerapan radikal DPPH daripada 7 jalur utama dan ia dikesan dengan nilai R_f 0.63. Kajian kesitotoksikan telah dijalankan dan ekstrak GCM yang telah diuji untuk ketoksikan dengan menggunakan anak udang brin menunjukkan nilai kepekatan kemautan 50 % (LC_{50}) lebih daripada 1 mg/ml, dengan sel kanser HepG2 pula menunjukkan nilai perencatan 50% (IC_{50}) lebih daripada 30 μ g/ml dan dengan mencit menunjukkan nilai dos kemautan 50 % (LD_{50}) lebih daripada 2000 mg/ml. Ini membuktikan bahawa ekstrak GCM adalah tidak toksik. Hasil penyisihan ekstrak GCM berjaya memencilkan Fraksi 3 yang merupakan suatu sebatian yang hampir tulen dan menunjukkan aktiviti antiyis yang signifikan berbanding dengan ekstrak GCM. Kajian penentuan kestabilan ekstrak GCM di dalam cecair gastrik dan usus tiruan secara *in vitro* pula menunjukkan bahawa ia masih menunjukkan aktiviti antimikrob dan membuktikan ekstrak GCM adalah stabil. Kajian rintis penggunaan ekstrak GCM dalam rawatan penyakit kandidiasis sistemik aruhan menunjukkan bahawa ekstrak ini gagal mengurangkan bilangan patogen iaitu yis *Candida albicans* dalam sistem badan mencit yang diuji tetapi ia berupaya mengurangkan peratusan kematian mencit yang terjangkit apabila dibandingkan dengan kumpulan kawalan. Kajian penggunaan ekstrak GCM secara topikal dalam rawatan penyakit kandidiasis kulit aruhan, menunjukkan kesan yang positif dalam membaik pulihkan luka dengan pengurangan bilangan yis patogen yang hadir dan juga membantu dalam pembinaan balik struktur-struktur sel pada kulit mencit seperti gelenjar sebum, folikel rambut dan epitelium.

EXTRACTION OF *Gracilaria changii* ALGA, CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT, ANTICANCER AND ANTIMICROBIAL AKTIVITIES AND ITS POTENTIAL AS AN ANTICANDIDAL AGENT

ABSTRACT

This research was conducted to study the antimicrobial, antioxidant as well as anticancer activities and to evaluate the extract of *Gracilaria changii* as an antimicrobial agent in the treatment of the disease induced mice. Five types of extract preparations were extracted from the *G. changii*, namely methanol (GCM), diethyl ether (GCDE), ethyl acetate (GCEA), buthanol (GCB) and methanol: chloroform (GCMC) (1:1 v/v) extracts. The study carried out to examine the sustainability of the bioactive compound in the GCM, GCDE, GCEA, GCB and GCMC for one year period revealed that the bioactive compounds presence all over the year but with different quantities. Screening of the GCM, GCDE, GCEA, GCB and GCMC extract for antimicrobial activity showed that the extracts possesses significant antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria, and also yeast cells but not against the fungi tested. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MLC) values for the GCM, GCDE, GCEA, GCB and GCMC extracts had been determined and were found in the range of 3.125-12.500 mg/ml and 6.25-25.00 mg/ml, respectively. The GCM extract at the MIC, half MIC and two time MIC concentration were found to inhibit the early growth phase of the yeast (*C. albicans*) and bacteria (*P. aeruginosa* and *B. subtilis*). Microscopic studies showed that the GCM extract caused some physiological and morphological changes in the treated cells of *C. albicans*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*. The antioxidant activity study demonstrated that the GCM extract possessed antioxidant activity with IC₅₀ values 5.77 mg/ml

and the thin layer chromatography (TLC) study showed that the extract contain only one band with R_f 0.63 from the seven major bands, which exhibited the DPPH radical scavenging activity. The GCM extract screened for toxicity against the brine shrimp had lethality concentration of 50% (LC_{50}) value more than 1.0 mg/ml; screened for cytotoxicity against HepG2 cancer cells had the inhibition concentration of 50% (IC_{50}) value more than 30.0 μ g/ml; and screened for acute toxicity in mice had lethality dose of 50% (LD_{50}) value more than 2000 mg/ml. These findings confirmed that the crude extract was not toxic. The separation procedures had successfully isolated an almost pure antiyeast active fraction from the GCM extract, which was identified as Fraction 3 that exhibited more significant activity against *C. albicans* compared to the GCM extract. Evaluation of the stability of the GCM extract in the artificial gastric and intestine juice demonstrated that the crude extract retained the antimicrobial activity and signified that the crude extract was stable. The preliminary study on the application of the GCM extract for the treatment of induced systemic candidiasis showed that the extract did not reduce the number of *C. albicans* cell in the body system of tested mice although the extract showed the ability to reduce the rate of mortality, compared to the control group. The study of the topical application of the crude extract in the treatment of the induced *C. albicans* infected skin wound of the mice revealed that the positive effect on the skin wound restoration with a significant reduction of yeast count and also helps the regeneration of skin appendages such as epithelium, sebaceous gland and hair follicles.

BAB 1.0 PENGENALAN

Kajian tentang antibiotik telah pun bermula sebelum tahun 1800 an lagi dan ia sering berkaitan dengan teori yang mengatakan bahawa pelbagai penyakit pada manusia adalah disebabkan oleh jangkitan mikroorganisma yang bersifat patogen. Lantaran itu, para saintis telah mula mencari bahan rawatan atau drug yang boleh membunuh mikrob ini tanpa memberi kesan toksik kepada manusia.

Pada peringkat awal para saintis telah mula mengkaji kemungkinan penggunaan bakteria yang bukan bersifat patogen dalam usaha merawat pesakit yang dijangkiti oleh bakteria yang bersifat patogen. Pada tahun 1877, Louis Pasteur telah menunjukkan bahawa bakteria yang menyebabkan penyakit antraks yang mengganggu sistem pernafasan menjadi tidak aktif apabila disuntik dengan bakteria yang dipencilkan daripada tanah, kepada haiwan ujian. Pada tahun 1887 pula, Rudolf Emmerich telah menunjukkan bahawa jangkitan kolera pada saluran pencernaan dapat dihalang jika haiwan itu pernah dijangkiti oleh bakteria *Streptococcus* sebelumnya.

Sementara saintis ini membuktikan bahawa jangkitan bakteria patogen boleh dirawat dengan bakteria bukan patogen, pada tahun 1888, seorang saintis dari Jerman, E. de Freudenreich telah memencilkan bahan antibiotik yang sebenar daripada bakteria yang menunjukkan aktiviti antibakteria. Freudenreich telah menunjukkan bahawa pigmen biru yang dirembeskan di dalam kultur oleh bakteria *Bacillus pyocyaneus* mampu menghalang pertumbuhan bakteria lain yang tumbuh di dalam kultur sel. Pigmen biru itu telah dikenali sebagai piokianase dan ia didapati mampu membunuh pelbagai

bakteria yang bersifat patogen. Kajian seterusnya telah membuktikan bahawa penicillin adalah toksik dan tidak stabil. Ia adalah antibiotik semulajadi yang pertama yang telah gagal dikembangkan sebagai drug untuk merawat jangkitan bakteria patogen.

Pada awal tahun 1920 an, seorang saintis dari British, Alexander Fleming telah melaporkan bahawa bahan daripada air mata manusia dapat melisis sel bakteria. Penemuan Fleming, yang beliau menamakannya sebagai lisozim merupakan agen antibakteria yang pertama yang didapati pada manusia. Lisozim juga gagal dikembangkan sebagai drug semulajadi kerana ia hanya membunuh bakteria yang bukan patogen atau ia adalah antibiotik yang lemah (Fleming, 1922)

Penemuan kedua Fleming's telah membawa revolusi dalam bidang perubatan. Pada tahun 1928, Fleming telah menemui agen antibakteria yang kedua apabila beliau melihat satu set piring petri yang lama yang mengandungi kultur bakteria. Salah satu daripada piring petri yang mengandungi koloni *Staphylococcus*, didapati lisis pada kawasan yang hanya terdapat pertumbuhan kulat dan beliau telah menganggap bahawa bahan antibakteria yang dirembeskan oleh kulat tersebut yang menyebabkan sel pecah.

Walaupun pada tahun 1896, seorang pelajar perubatan berbangsa Perancis, Ernest Duchesne telah menemui bahan antibiotik penisilin, tetapi mereka gagal mengaitkan perhubungan diantara kulat dan bahan antibakterianya. Melalui kajian lanjutan, Fleming telah menunjukkan

bahawa kulat itu sebenarnya merembeskan suatu bahan antibiotik iaitu penisilin dan ia meresap melalui agar pada piring petri untuk menghalang pertumbuhan bakteria tersebut. Dengan mengekstrak penisilin beliau telah menunjukkan kesannya secara langsung (Silverthorn, 2004)

Penemuan penisilin pada 1928 oleh Alexander Fleming merupakan suatu penemuan yang paling penting dalam sejarah bidang antibiotik. Penemuan ini telah membawa kepada revolusi dalam pemahaman kita terhadap antibiotik dan dalam pendekatan merawat penyakit yang disebabkan oleh jangkitan mikroorganisma yang bersifat patogen. Hasil maklumat yang terkumpul sehingga sekarang telah membuktikan yang antibiotik merupakan pilihan terbaik untuk merawat penyakit yang disebabkan oleh jangkitan patogen.

Semenjak zaman silam lagi manusia telah menggunakan bahan-bahan semulajadi untuk kepentingan perubatan. Produk-produk ini biasanya diperolehi daripada alam tumbuhan, rumpai, haiwan atau daripada mikroorganisma. Drug boleh didefinisikan sebagai komponen bahan kimia yang digunakan untuk tujuan merawat penyakit tertentu atau tujuan penjagaan kesihatan serta pemakanan. Antibiotik pula merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteria dan kulat untuk melindungi diri mereka daripada serangan mikroorganisma yang lain dengan menghalang pertumbuhan atau dengan membunuh mikroorganisma lain pada kepekatan yang sangat rendah. Farmakognosi pula boleh didefinisikan sebagai kajian

bahan semulajadi yang mempunyai kepentingan atau kegunaan dalam bidang perubatan.

Oleh itu objektif utama dalam bidang farmakognosi ialah untuk mencari komponen-komponen bahan kimia yang sesuai daripada alam semulajadi seperti tumbuh-tumbuhan dan alga marin yang mampu bertindak sebagai antibiotik atau drug. Produk yang diperolehi daripada alam semulajadi biasanya didapati sangat sesuai dan berkesan sebagai drug. Akan tetapi masalah ketoksikan drug juga kadang-kala wujud. Maka dalam usaha pencarian produk baru sebagai drug, ia memerlukan suatu kaedah yang sistematik untuk menguji sama ada drug ini berfungsi dalam sistem manusia dan juga kesesuaiannya sebagai bahan drug yang baru. Disamping itu dalam usaha pencarian drug baru, kajian dasar tentang biologi dan kimia sesuatu penyakit juga amat diperlukan. Lantaran itu pencarian drug baru juga memerlukan bantuan daripada pakar-pakar daripada bidang lain seperti perubatan, biokimia, farmakologi, matematik, komputer dan sebagainya.

Kaedah moden yang melibatkan penggunaan teknologi boinformasi dan biologi molekul juga telah memainkan peranan yang penting dalam pencarian drug baru dan telah membawa kepada suatu paradigma baru. Paradigma baru ini telah membuatkan suatu pendekatan baru dalam usaha pencarian dan pembentukan drug baru melalui kuasa komputer yang mengubah kajian makmal konvensional kepada kajian maya secara *in silico* dengan bantuan komputer. Kajian ini melibatkan kajian maya sesuatu molekul bioaktif yang menjadi calon drug baru dan merekabentuk molekul bioaktif tadi menjadi drug

baru jika ia menunjukkan ciri-ciri yang sama dengan komponen bioaktif yang diketahui. Disamping itu, teknologi bioinformasi juga boleh digunakan untuk menyediakan monograf tumbuhan perubatan yang memberi maklumat tentang penggunaan sesuatu tumbuhan dalam perubatan dan ciri-ciri tumbuhan tersebut. Disamping itu, teknologi bioinformasi juga boleh menyediakan suatu pengkalan data yang dapat memberikan maklumat tentang sesuatu struktur molekul bioaktif tersebut.

Tiga per empat daripada dunia kita terdiri daripada air yang merupakan khazanah yang mewah dengan pelbagai hidupan invertebrata, alga, bakteria, kulat, disamping pelbagai flora dan fauna lain. Organisma marin atau akuatik ini sesungguhnya telah lama dikenali sebagai agen yang mempelopori ke arah penyumbangan komponen bioaktif yang boleh digunakan untuk penghasilan drug. Kebanyakan daripada organisma ini merupakan gedung simpanan beribu-ribu komponen bioaktif yang menunjukkan sifat antimikrob dan antikanser (Fishel *et al.*, 1995; Mayer & Lehmann, 2001) dan boleh digunakan sebagai drug untuk merawat pelbagai penyakit yang merbahaya seperti kanser, AIDS, malaria dan sebagainya.

Penghasilan antibiotik daripada sumber marin juga menjadi semakin penting kerana rawatan antimikrob yang sedia wujud pada masa kini didapati menunjukkan ketidak berkesan apabila rintangan terhadap antibiotik itu berlaku (Metzger & Hoffmann 1997). Pada tahun 1945, dalam temuramah dengan *The New York Times*, Fleming telah menasihatkan bahawa penyalahgunaan penisilin boleh membawa kepada rintangan terhadap antibiotik penisilin. Fleming telah menyatakan bahawa rintangan terhadap

penisilin boleh berlaku apabila dinding sel bakteria menjadi lebih kuat atau melalui protein bakteria mutan yang dapat memusnahkan penisilin. Masalah di atas telah meningkatkan lagi minat para ahli sains untuk mencari bahan antimikrob daripada bahan semulajadi (Hammer *et al.*, 1998) seperti alga marin yang dianggap lebih berkesan.

Pada masa yang sama, drug sintesis memerlukan kos dan biayai yang tinggi untuk menghasilkannya. Kebanyakan drug sintesis telah dikatakan boleh memberikan kesan sampingan yang serius dan mendorong kepada kerosakan genotoksik (Epstein, 1990).

Dewasa ini, syarikat-syarikat gergasi farmaseutis sudah pun memulakan penglibatan mereka dalam penyelidikan tentang sebatian bioaktif ke arah menjayakan program pemencilan, pencirian dan penghasilan drug asli daripada sumber semulajadi. Syarikat-syarikat tersebut berminat ke atas herba, mikroorganisma dan organisma lautan seperti alga yang kebanyakan terdapat di negara-negara membangun sebagai sumber utama komponen bioaktif di dalam industri pembuatan entiti drug yang baru. Mengikut kenyataan *US Food and Drug administration* daripada tahun 1983 sehingga 1994, didapati 61% daripada agen antikanser berasal daripada sumber semulajadi. Oleh itu, untuk membuktikan keupayaan alga marin ini sebagai sumber drug baru yang berpotensi, maka suatu siri kajian yang mendalam dan terperinci perlu dilaksanakan. Perairan Malaysia kaya dengan pelbagai alga marin dan ini termasuklah *Gracilaria changii* yang begitu terkenal dikalangan masyarakatnya. Daripada beberapa laporan awal, ia didapati

sesuai dijadikan calon untuk pencarian drug baru. Sekiranya kenyataan ini terbukti maka ia akan memberikan cahaya baru dalam bidang farmaseutis yang akhirnya akan menghasilkan sebatian bioaktif yang bersifat antimikrob, antioksidan dan mungkin juga antikanser. Secara tidak langsung, keadaan ini akan menarik lebih banyak pelabor asing untuk melabor di Malaysia, dan seterusnya meningkatkan ekonomi negara kita, disamping membuka banyak peluang pekerjaan kepada penduduknya.

1.1 TUMPUAN DAN OBJEKTIF PENYELIDIKAN

Suatu kajian terperinci keatas alga marin tempatan, *G. changii* dilakukan untuk membuktikan keupayaan dan keberkesanannya sebagai agen antimikrob, antioksidan dan juga antikanser. Untuk mencapai matlamat ini, maka beberapa objektif penyelidikan telah dirancang seperti;

- a) Mengekstrak dan menyediakan profil bagi komponen bioaktif mengikut masa bagi ekstrak *G. changii* selama satu tahun.
- b) Menentukan aktiviti antioksidan ekstrak *G. changii*.
- c) Penyaringan dilakukan ke atas mikroorganisma ujian patogen kulat, bakteria, dan yis untuk mengesan aktiviti antimikrob dengan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) dan nilai kepekatan maut minimum (MLC).
- d) Menyediakan kelok kematian mikroorganisma patogen sebagai kesan ekstrak *G. changii*.
- e) Mengkaji kesan ke atas morforlogi sel mikroorganisma patogen daripada ekstrak *G. changii* dan mengkaji mekanisme tindakan.

- f) Menyediakan data ketoksikan ekstrak *G. changii* terhadap *Artemia salina* dan mencit secara *in vivo*. Mengesan aktiviti antikanser terhadap sel kanser manusia HepG2 secara *in vitro*.
- g) Penggunaan ekstrak *G. changii* sebagai agen rawatan ke atas haiwan yang diaruh penyakit kandidiasis.
- h) Menentukan komponen utama bahan antiyis dan mekanisme tindakannya dalam ekstrak *G. changii*.

BAB 2.0 TINJAUAN BAHAN BACAAN

2.1 Bahan semula jadi dan kajian aktiviti antimikrob dahulu, kini dan pada masa hadapan

Mengikut Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO), sebanyak tiga per empat daripada populasi dunia bergantung pada bahan semulajadi (kebanyakannya adalah herba) untuk penjagaan kesihatan manusia (Gilani & Rahman, 2005). Sebelum manusia menemui kewujudan mikrob idea tentang bahan semulajadi mempunyai keupayaan merawat setengah penyakit telahpun diterima umum. Sejarah juga menunjukkan bukti yang kukuh tentang penggunaan bahan semulajadi oleh masyarakat primitif. Sejak masa silam lagi manusia telah menggunakan tumbuhan untuk merawat penyakit yang bersifat jangkitan dan ada diantara tumbuhan itu yang masih digunakan lagi sehingga kini. Sebagai contoh bawang putih (*Allium sativum*) dan pokok teh (*Camellia sinensis*) telah dilaporkan sebagai agen antimikrob yang mempunyai spektrum tindakan yang luas (Heinrich *et al.*, 2004) dalam rawatan jangkitan saluran pernafasan, urinari, gastrointestin dan sistem hati manusia. Kuinin daripada pokok kinkona (*Cinchona*) telah lama digunakan untuk merawat penyakit malaria sebelum penyakit itu dikenali dan disahkan secara saintifik. Pada pertengahan abad ke sembilan belas, sekurang-kurangnya 80% daripada jumlah ubat-ubatan adalah berasaskan sumber bahan semulajadi (Ríos & Recio, 2005). Revolusi yang belaku seterusnya telah membawa kepada dominasi drug sintesis dan pertumbuhan perindustrian farmasi. Walaupun begitu penghasilan drug daripada bahan semulajadi masih menjadi pilihan utama. Pada masa kini terdapat sekurang-kurangnya 25% daripada drug yang dijual di negara-negara barat adalah daripada tumbuhan atau bahan semulajadi dan memang tidak dapat dinafikan

kebanyakan drug sintesis yang dijual sekarang juga adalah prototip bahan semulajadi (Gilani *et al.*, 1992). Aspirin, atropin, artimesinin, kolkisin (colchicine), digoksin, efedrin, morfin, fisostigmin, pilokarpin, kuinin, kuinidin, reserpin, taksol, tubokurarin, vinkristin, dan vinblastin merupakan contoh-contoh drug yang boleh diperolehi secara komersial dan merupakan hasil daripada bahan semulajadi (Gilani *et al.*, 1992).

Pada masa dahulu kebanyakan kajian adalah tertumpu kepada alam tumbuhan. Mengikut Recio *et al.*, (1989a) diantara tahun 1978 dan 1988, sebanyak 75 spesies tumbuhan telah dikaji secara terperinci untuk aktiviti biologinya dan mereka juga telah melaporkan bahawa kumpulan fenolik merupakan konstituen kimia yang utama yang dipencilkan, dengan bakteria Gram positif sebagai bakteria paling sensitif terhadap ekstrak tumbuhan. Mereka juga melaporkan bahawa masalah utama yang dialami oleh para saintis ialah untuk membiawaikan kaedah yang digunakan untuk mengkaji ekstrak tumbuhan dalam menentukan aktiviti antimikrob. Keadaan ini telah membawa kepada keputusan bagi aktiviti antimikrob yang berbeza bagi ekstrak tumbuhan yang sama oleh para saintis yang berlainan (Pellecuer *et al.*, 1976). Pada tahun 1988 Ríos *et al.*, (1988) telah melaporkan beberapa kaedah eksperimen untuk mencerakin aktiviti antimikrob ekstrak tumbuhan termasuklah kaedah peresapan agar dan kaedah pencairan kaldu. Akhirnya kaedah pencairan kaldu telah diterima sebagai kaedah unggul oleh kebanyakan saintis.

Pada masa kini pula kebanyakan kajian antimikrob adalah bertumpu kepada aktiviti antimikrob bahan semulajadi tanpa menyatakan aplikasinya.

Terdapat juga saintis yang hanya menumpukan kajian antimikrob bahan semula jadi terhadap mikrob yang bersifat patogen obligat seperti *Candida albicans* (Duarte *et al.*, 2005), *Helicobacter pylori* (O'Gara *et al.*, 2000), *Escherichia coli* enteropatogen (Voravuthikunchai *et al.*, 2004), *Neisseria gonorrhoeae* (Shokeen *et al.*, 2005), bakteria rintang antibiotik seperti *Staphylococcus aureus*, yang rintang terhadap metisilin (MRSA; Machado *et al.*, 2003) dan *Salmonella typhi* (Rani & Khullar, 2004). Terdapat juga kajian antimikrob yang dijalankan untuk tujuan kosmetik dan pengawetan makanan yang dirosakkan oleh mikrob, malah rempah dianggap sebagai agen antimikrob terhadap bakteria dan yis yang bersifat patogen kepada manusia. Kajian antimikrob yang telah dilakukan oleh Arora dan Kaur (1999) menunjukkan bahawa bawang putih dan pokok bunga cengkih juga mempamerkan aktiviti antimikrob.

Pada masa hadapan kajian antimikrob harus berfokus terhadap pemencilan komponen bioaktif yang menunjukkan aktiviti antimikrob kerana kajian seumpama itu boleh memberikan maklumat sebenar tentang bahan bioaktif yang bertindak dalam sesuatu ekstrak kasar. Akhirnya para penyelidik juga perlu menyediakan suatu pangkalan data tentang kesitoksikan terhadap sel haiwan atau manusia, mekanisme tindakan, kesan komponen bioaktif itu secara *in vivo*, kesan negatif dan positif akibat daripada interaksi diantara antibiotik komersial dan drug baru dan sebagainya. Shibata *et al.*, (2005) telah melaporkan kesan etil gallat dan β -laktam terhadap bakteria *Staphylococcus aureus* rintang metisilin (MRSA). Mereka melaporkan yang gabungan etil galat dan β -laktam telah menambahkan aktiviti antibiotik dan kesan sinergistik alkil gallat ini adalah spesifik untuk antibiotik β -laktam,

kerana tiada perubahan yang nyata ditunjukkan oleh antibiotik lain yang beliau telah uji. Kajian ini menyokong tentang manfaat yang mungkin diperolehi daripada gabungan antibiotik komersial dan drug baru daripada bahan semula jadi yang dapat mengurangkan kesan sampingan. Kajian yang telah dijalankan oleh Stermitz *et al.*, (2000) dengan menggunakan bahan semulajadi 5'-metoksihidnokarpin iaitu suatu konstituen kimia yang dipencilkan daripada minyak pati kaulmogra, dengan berberin didapati sangat menarik. Mereka menunjukkan bahawa 5'-metoksihidnokarpin sendirian tidak menunjukkan sebarang aktiviti antimikrob tetapi ia menggalakan aktiviti antimikrob berberin terhadap *Staphylococcus aureus* (Stermitz *et al.*, 2000). Mereka juga melaporkan bahawa penggumpalan berberin di dalam sel *Staphylococcus aureus* telah bertambah dengan kehadiran 5'-metoksihidnokarpin, yang membenarkan bahan semulajadi ini menggagalkan mekanisme rintangan bakteria ini terhadap berberin. Ini adalah disebabkan oleh sistem pam pelbagai rintangan *Staphylococcus aureus* dapat mengeluarkan berberin daripada selnya secara semula jadi. Kajian ini telah menunjukkan keberkesanan penggunaan antibiotik bahan semulajadi yang lemah dengan bahan semula jadi yang lain yang sesuai untuk meningkatkan aktiviti. Kajian seumpama ini dapat meningkatkan penggunaan bahan semula jadi sebagai drug secara berasingan atau bergabung dengan antibiotik lain.

2.1.1 Kajian aktiviti antimikrob: Masalah dan penyelesaian

Beberapa parameter perlu ditetapkan dalam usaha mengkaji aktiviti antimikrob daripada bahan semula jadi untuk mengelakkan masalah yang mungkin timbul seperti sumber dan kawasan persampelan bahan mentah,

kaedah yang digunakan untuk mengkaji aktiviti antimikrob, medium pertumbuhan mikroorganisma ujian serta mikroorganisma ujian itu sendiri.

Pendekatan saintifik haruslah digunakan dalam usaha pemilihan bahan mentah semula jadi. Bahan mentah tidak seharusnya dipilih secara rawak tetapi berdasarkan tentang pengetahuan etnofarmakologi dan dari segi penggunaannya dalam perubatan tradisional. Semua spesies yang digunakan haruslah diuraikan secara terperinci tentang kawasan, musim, tarikh dan masa persampelan dilakukan. Penggunaan sampel komersial haruslah dielakkan supaya faktor-faktor diatas dapat ditentukan dan untuk memastikan semua ekstrak bahan semula jadi datang daripada kawasan semula jadi.

Penggunaan pelarut tertentu dan cara pengekstrakan juga dapat mengubah keputusan akhir sesuatu kajian antimikrob. Pelarut yang paling sesuai adalah pelarut yang serupa dengan yang digunakan oleh para pengamal perubatan tradisional atau fitoterapi, walaupun di dalam makmal penyelidikan, metanol atau etanol menjadi pilihan utama. Kajian *in vitro* yang dilakukan oleh Nostro *et al.* (2000) menunjukkan bahawa ekstrak *Helichrysum italicum* atau *Phytolacca dodecandra* mempunyai aktiviti yang sederhana terhadap *Escherichia coli* apabila pelarut dietil digunakan, akan tetapi tiada aktiviti dipemerkan apabila ia diekstrakkan secara berturutan dengan pelarut petroleum eter, diklorometan, diklorometan metanol (9:1) atau metanol. Sebaliknya, semua ekstrak yang diperolehi daripada pelbagai pelarut tersebut didapati aktif terhadap bakteria *Propionibacterium acnes*. Ini menunjukkan yang pelarut memainkan peranan penting dalam pengekstrakan komponen-komponen aktif daripada sesuatu bahan semula jadi.

pH ekstrak juga boleh mempengaruhi keputusan aktiviti antimikrob kerana kadangkala kumpulan fenolik atau karbosilik hadir di dalam ekstrak. Bahkan, bukan ekstrak yang mempunyai ion sahaja mempengaruhi aktiviti antimikrob tetapi minyak pati yang neutral juga menunjukkan aktiviti yang berlainan pada pH yang berlainan. Contohnya, minyak pati anise menunjukkan aktiviti antikulat yang tinggi pada pH 4.8 berbanding dengan pH 6.8, sementara itu minyak pati daripada *Cedrus deudora* pula adalah paling aktif pada pH 9 (Janssen *et al.*, 1987).

Kaedah yang digunakan merupakan satu lagi faktor yang perlu diberi perhatian. Untuk ekstrak tak berketup, kaedah peresapan agar adalah tidak sesuai walaupun banyak penyelidik melaporkan kajian sedemikian. Dalam keadaan seperti itu kaedah pencairan kaldu haruslah digunakan. Walau bagaimanapun, dalam keadaan dimana jumlah sampel amat sedikit maka kaedah peresapan agar boleh dipertimbangkan.

Kandungan medium pertumbuhan mikroorganisma juga boleh mempengaruhi aktiviti ekstrak atau komponen yang sedang diuji. Ross *et al.*, (2001) telah melaporkan bahawa aktiviti antimikrob ekstrak bawang putih menunjukkan aktiviti yang lebih baik apabila medium pertumbuhan tanpa tripton atau sistin digunakan. Ini mungkin disebabkan oleh kesan aktiviti sulfhidril. Ini adalah kerana kegagalan kumpulan sulfhidril (SH) yang hadir dalam sesuatu ekstrak untuk bertindakbalas dengan sistin dan tripton boleh mengurangkan aktiviti antimikrobnya.

Pemilihan mikroorganisma ujian juga memainkan peranan yang penting dalam pengujian aktiviti antimikrob (Janssen *et al.*, 1987). Mikroorganism

ujian harus dipilih dan dinyatakan dengan jelas sumbernya dan kajian lanjutan juga perlu dijalankan pada patogen yang baru dipencilkan untuk menentukan keberkesanan aktiviti antimikrob. Disamping itu kepekatan ekstrak yang digunakan haruslah bersesuaian. Ríos & Recio, (2005) telah menyatakan bahawa ekstrak yang menunjukkan aktiviti antimikrob yang baik pada kepekatan ekstrak yang rendah adalah lebih berpotensi untuk kajian antimikrob. Mereka juga mencadangkan kajian lanjutan tidak harus diteruskan dengan ekstrak yang menunjukkan aktiviti antimikrob yang baik pada kepekatan yang sangat tinggi.

2.2 Keperluan untuk mendapat antibiotik baru

Penyelidikan untuk mendapatkan antibiotik baru adalah amat diperlukan walaupun pada masa kini terdapat banyak antibiotik dipasaran. Ini adalah kerana apabila kita membincangkan tentang evolusi bidang farmakognosi iaitu kajian tentang bahan semulajadi yang aktif secara biologi, ia biasanya melibatkan penjagaan kesihatan manusia sejagat, khususnya tentang penggunaan agen perubatan dalam usaha merawat dan menghalang sesuatu penyakit. Dalam masa 39 tahun lagi populasi dunia mungkin akan mencecah angka 9.2 bilion (United States Census Bureau, 2005a), iaitu sebanyak 44% lebih daripada sekarang (United States Census Bureau, 2005b). Angka ini sememangnya memberikan cahaya baru kepada bidang farmakognosi kerana agen drug yang baru amat diperlukan bagi menampung populasi yang bertambah secara mendadak, terutamanya di negara dunia ketiga yang miskin.

Mengikuti Penilaian Ekosistem Millenium Amerika (United Nations, 2005) suhu dunia dijangka akan meningkat sebanyak 1.5–2.0 °C pada tahun 2050. Perubahan iklim ini akan menyebabkan kehilangan habitat semula jadi yang menjadi sumber kepada sumber bahan semula jadi. Perubahan ekosistem ini juga akan membawa kepada pelbagai penyakit berjangkit pada peringkat dunia. Ini termasuklah malaria, meningitis, leishmaniasis, denggi, ensefalitis Jepun, tripanosomiasis Afrika, skhistosomiasis, filariasis, dan penyakit diarea. Maka, para saintis perlu mengenal pasti dan melindungi bahan semula jadi yang menjadi sumber agen antibiotik atau drug, sebelum ia dipupuskan oleh perubahan iklim dunia. Secara tidak langsung, kita juga perlu menyediakan antibiotik yang secukupnya untuk menghadapi sebarang kemungkinan yang bakal berlaku pada masa hadapan.

Oleh yang demikian, terdapat banyak faktor yang mendorong kepada keperluan untuk mendapatkan antibiotik baru. Antaranya ialah: (i) pertambahan populasi manusia yang mendadak akan berlaku di negara membangun berbanding dengan negara maju.

Sebenarnya jumlah populasi mungkin menurun di negara-negara Eropah dan Jepun (United States Census Bureau, 2005c); (ii) harga yang tinggi - pada masa kini telah dianggarkan bahawa untuk membawa masuk sesuatu drug baru, ia memerlukan kos sebanyak US\$ 800 juta di Amerika (Di Masi *et al.*, 2003; Adams & Brantner, 2004); (iii) teknologi dan bioteknologi yang dapat digunakan dalam kajian bahan semula jadi adalah canggih, cepat dan tepat; (v) timbulnya penyakit baru yang boleh membunuh manusia (misalnya SARS, virus Marburg, virus avian flu, dan lain-lain lagi), dan

kerintangan terhadap antibiotik (Anonymous, 2000); (vi) ancaman bioterrorisme dengan menggunakan senjata biologi seperti patogen yang rintang terhadap pelbagai drug.

2.2.1 Timbulnya penyakit baru dan mikroorganisma baru

Kemunculan penyakit baru dan penemuan mikroorganisma baru telah membawa kepada masalah kesihatan yang serius terhadap kesihatan manusia sejagat. Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.1, terdapat tujuh jenis penyakit utama yang dilaporkan menjadi pembunuh manusia di peringkat dunia.

Pada bulan November tahun 2002 di daerah Guangdong, China suatu penyakit baru yang disebabkan oleh jangkitan koronavirus yang dikenali sebagai 'sindrom respirasi akut yang teruk' (SARS) telah dilaporkan. Koronavirus adalah virus yang mempunyai genom tunggal yang bersaiz 30 kb dan boleh menjangkiti haiwan dan manusia (Siddell, 1995). Sehingga 30 Desember 2005, sebanyak 142 kes telah dilaporkan dengan jumlah kematian sebanyak 74 orang, dengan nisbah kematian sebanyak 52% di negara-negara Asia seperti Kamboja, Thailand, Vietnam, Indonesia dan China (Wai-Fu Ng *et al.*, 2006). Manakala, di negara Malaysia mencatat 2 kes kematian akibat daripada penyakit ini (The Star, 10 Mei 2003). Para penyelidik menyatakan bahawa koronavirus ini merupakan virus yang baru menjangkiti manusia dan mereka mendapati kemungkinan besar virus ini

Jadual 2.1: Penyakit utama yang menjadi pembunuh manusia di peringkat dunia

Sumber: Data daripada laman Web Centers for Disease Control, Atlanta, October, 2004.

Penyakit	Bilangan kematian	Bialnagn kes baru setiap tahun
AIDS	3.1 juta orang	3.5 juta
Tuberculosis	2.0 juta orang	8.0 juta
Diarea	1.9 juta orang	2.7 juta
Malaria	1.0 juta orang	300-500 juta
Hepatitis B	1.0 juta orang	10-30 juta
SARS	8,096 kes, 774 orang mati (daripada 4/4/2002)	Meningkat
Penyakit berkaitan tembakau	3.5 orang mati akibat kanser paru-paru	Meningkat

dijangkiti daripada haiwan kepada manusia (zoonosis). Tambahan pula para ahli perubatan masih gagal untuk mendapatkan agen terapi yang boleh mencegah penyakit ini (Anonymous, 2005).

Ini mungkin disebabkan oleh kepantasan pembentukan strain mutan oleh virus ini (The Star, 3 Mei 2003). Kajian-kajian yang telah dilakukan di Chinese Universiti of Hong Kong pada akhir bulan Mac 2003 menunjukkan terdapat 2 jenis penyakit yang berlainan hadir pada 11 sampel virus yang diambil daripada pesakit SARS (The Star, 3 Mei 2003). Hal ini membuktikan kepantasan kejadian mutasi terhadap virus ini untuk menjadi mutan dan menghasilkan 2 jenis penyakit yang berlainan pada pesakit SARS. Keadaan ini telah merumitkan lagi usaha untuk mendapatkan agen terapi yang berkesan terhadap penyakit SARS. Walaupun terdapat beberapa vaksin untuk merawat SARS seperti vaksin MVA rekombinan dan vaksin bovin PIV-3 rekombinan, tetapi kesemua vaksin tersebut masih tidak berkesan dalam usaha merawat penyakit SARS dengan sempurna.

Pada tahun 2003 pula satu lagi penyakit baru yang dikenali sebagai Avian influenza atau selesema burung yang disebabkan oleh jangkitan virus (strain H5N1) yang biasanya menyerang burung telah dilaporkan berlaku di Asia Tenggara. Mengikut WHO sebanyak 150 juta burung dan 22 orang manusia telah mati akibat daripada wabak ini diseluruh dunia daripada tahun 2003 hingga 2005. Menurut Organisasi Makanan dan Pertanian Bangsa-Bangsa Bersatu (FAO), wabak selesema burung telah mengakibatkan sebanyak 80 juta ternakan di negara Thailand, Vietnam dan Indonesia dibunuh dalam usaha menyekat sebaran penyakit ini (Berita Harian, 14 Februari 2004). Pada

tahun ini sahaja negara Indonesia telah melaporkan sebanyak 27 kematian daripada 33 kes yang telah dilaporkan (Anonymous, 2006). Walaupun terdapat drug seperti oseltamivir dan zanamivir untuk merawat jangkitan ini namun masih belum terdapat suatu drug atau vaksin pun yang berkesan untuk merawat penyakit ini (Anonymous, 2005) .

Pada tahun 1967 , satu lagi penyakit baru yang disebabkan oleh jangkitan virus yang dikenali sebagai Marburg virus telah dilaporkan di Marburg dan Frankfurt, Jerman serta Belgrade, Yugoslavia (sekarang Serbia) (Stile *et al.*, 1968). Sejumlah 37 orang telah disahkan menghidapi penyakit demam hemoragik akibat daripada jangkitan virus ini pada masa itu. Penyakit ini telah menular ke negara lain seperti Angola, Republik Demokrasi Congo, Kenya, dan Afrika Selatan diantara tahun 1975 hingga 2004 dan telah mengakibatkan kematian sebanyak 279 orang (Lee Ligon, 2005). Penyakit ini disebabkan oleh sejenis virus RNA yang dikenali sebagai virus Ebola, daripada famili Filoviridae. Virus ini mempunyai morfologi berfilamen dengan panjang 14,000 nm dan lebar 80 nm serta bergenom tunggal (Lee Ligon, 2005). Wabak penyakit ini juga masih memerlukan agen terapi untuk merawat pesakit yang menghidapnya kerana masih tidak ada vaksin yang berkesan terhadapnya. Hanya rawatan sokongan seperti pengimbangan cecair elektrolit pesakit, mengekalkan status oksigen, mengawal tekanan darah serta merawat sebarang jangkitan yang dikenakan pada masa sekarang. Rawatan kontroversial seperti penggunaan heparin juga kadangkala dikenakan (Lee Ligon, 2005).

Pada tahun 1950 penyakit denggi yang disebabkan oleh virus yang disebarkan oleh vektor nyamuk *Aedes aegypti* telah dilaporkan di Filipina dan Thailand. Virus denggi ini dipindahkan kepada manusia semasa nyamuk, *Aedes aegypti* mengigit. Mengikut WHO, pada masa kini sebanyak 2.5 bilion masyarakat dunia hidup dikawasan yang mampu mendapat jangkitan penyakit denggi. Pada tahun 1998, sebanyak 1.2 juta kes denggi dengan kematian sebanyak 3442 telah dilaporkan kepada WHO (WHO, 2000; Maria & Gustavo, 2002). Pada masa ini, hanya pengawalan vektor denggi sahaja yang paling berkesan untuk mengawal penyakit ini kerana kajian tentang drug dan vaksinya masih pada peringkat awal sahaja (Maria & Gustavo, 2002).

Fakta-fakta di atas dengan jelas menunjukkan kepada kita bahawa pelbagai penyakit baru sedang dan telah pun wujud. Malah, diantara kebanyakan penyakit baru ini masih belum ada drug atau vaksin lagi untuk mencegah atau mengubatnya secara berkesan. Keadaan ini telah mendesak para penyelidik untuk mendapatkan antibiotik atau drug baru yang mampu merawat penyakit-penyakit yang baru muncul itu.

2.2.2 Kerintangan mikroorganisma terhadap antibiotik

Pada tahun 1945, dalam temubual dengan *The New York Times* mengenai penyelidikan makmal, Sir Alexander Fleming telah memberi amaran tentang penyalahgunaan penisilin boleh membawa kepada mutasi dan strain *Staphylococcus aureus* yang rintang terhadap antibiotik tersebut. Apabila keadaan ini berlaku, ia akan membawa kepada jangkitan yang lebih serius kepada manusia dan keadaan ini akan menjadi lebih parah jika strain

rintang ini disebarkan kepada manusia lain (Levy, 2002). Dalam masa satu tahun selepas temubual tersebut, penggunaan berleluasa antibiotik ini telah menyebabkan kewujudan strain yang rintang terhadap antibiotik tersebut (Levy, 2002). Malangnya, setiap hari selepas itu terdapat laporan tentang kewujudan strain bakteria yang rintang terhadap agen antimikrob tersedia ada dipasaran. Walaupun, bakteria yang rintang ini asalnya disebabkan oleh jangkitan nosokomium tetapi ia kemudiannya telah tersebar dikalangan masyarakat umum.

Untuk memastikan sesuatu benda hidup itu sentiasa wujud, ia terpaksa beradaptasi mengikut keadaan sekelilingnya. Proses adaptasi ini termasuk pengubahsuaian terhadap iklim, makanan, air, keperluan oksigen dan terhadap kehadiran bahan-bahan toksik (Alanis, 2005). Akhirnya fenomena ini telah membawa kepada wujudnya strain bakteria yang rintang terhadap antibiotik dan dalam banyak kes ia adalah rintang terhadap pelbagai agen terapi yang digunakan untuk merawat jangkitan mikrob yang bersifat patogen.

Kes pertama kerintangan antibiotik oleh bakteria telah dilaporkan pada tahun 1940an selepas pengenalan kepada antibiotik sulfonamida and penisilin iaitu *Staphylococcus aureus* (Rammelkamp, 1942). Senarai bakteria yang menunjukkan kerintangan telah meningkat secara mendadak daripada tahun 1940an hingga 1990an. Pada tahun 1970an, *Neisseria gonorrhoeae* dan *Haemophilus influenzae* yang menghasilkan β -laktamase telah dilaporkan mampu menunjukkan kerintangan terhadap penisilin (Jaffe *et al.*, 1981; Williams & Moosdeen, 1986; Lind, 1990; Jorgensen, 1993). *Staphylococcus aureus* yang rintang terhadap metisilin (MRSA) dan

Mycobacterium tuberculosis yang rintang terhadap pelbagai drug telah dilaporkan berlaku pada penghujung tahun 1970an dan pada awal tahun 1980an (Lowy, 1998; Pablos-Mendez *et al.*, 1998; Espinal *et al.*, 2001; Lowy, 2003; Foster, 2004; Deresinski, 2005). Pada sekitar tempoh itu kerintangan antibiotik hanya berlaku dikalangan bakteria Gram negatif sahaja seperti *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Pseudomonas aeruginosa* sahaja (Smith *et al.*, 1999; Wegener, 1999; Fey *et al.*, 2000; Waterer & Wunderink, 2001; White *et al.*, 2001; Rupp & Fey, 2003).

Pengetahuan yang baik pada peringkat molekul adalah penting untuk memahami tentang kejadian kerintangan antibiotik, kerana pengetahuan sedemikian membenarkan pendekatan yang baru dalam pengurusan jangkitan yang disebabkan oleh bakteria dilakukan. Pengetahuan ini juga perlu untuk membuat strategi baru dalam pembangunan agen terapi terhadap mikrob yang menunjukkan kerintangan antibiotik. Terdapat dua mekanisme yang bertanggungjawab keatas kerintangan bakteria terhadap drug iaitu mekanisme genetik dan mekanisme biologi (Alanis, 2005).

2.2.2.1 Mekanisme genetik

Untuk berlakunya kerintangan terhadap sesuatu antibiotik kehadiran dua elemen penting adalah diperlukan: Pertama, kehadiran bahan antibiotik yang merencatkan kebanyakan daripada bilangan mikrob yang hadir dalam sesuatu koloni bakteria atau koloni yang heterogen, dan terdapat pula sekurang-kurangnya satu bakterium yang mempunyai gen penentu kerintang antibiotik tersebut (Levy & Marshall, 2004). Jika ini berlaku, bakteria yang

mempunyai gen yang menunjukkan kerintangan akan hidup tetapi yang lain akan dibunuh oleh antibiotik. Gen daripada bakteria ini akan dipindahkan pula kepada bakteria lain supaya bakteria lain yang normal juga dapat menunjukkan kerintangan terhadap antibiotik (Levy & Marshall, 2004). Kemudian gen yang menunjukkan kerintangan terhadap antibiotik itu akan dipindahkan pula kepada bakteria lain melalui beberapa proses seperti (Alanis, 2005):

a. Konjugasi

Konjugasi merupakan kaedah pemindahan gen kerintangan yang biasa ditunjukkan oleh bakteria. Konjugasi biasanya berlaku dengan bantuan plasmid, dimana apabila dua bakteria dihubungkan dengan pembentukan pilus seks (struktur berbentuk tiup) yang membenarkan pemindah gen tersebut berlaku.

b. Transformasi

Transformasi berlaku apabila terdapat DNA yang bebas yang wujud akibat daripada kematian dan pemecahan sel bakteria yang sangat dekat dengan sel bakteria lain yang hidup. DNA yang bebas itu akan masuk ke dalam sel bakteria yang hidup dan bersatu dengan DNA bakteria tersebut.

c. Transduksi

Transduksi adalah mekanisme genetik yang ketiga. Ia biasanya melibatkan vektor seperti virus yang dapat menjangkiti bakteria, misalnya bakteriofaj. Virus yang mempunyai gen yang menunjukkan kerintangan akan