

**AKTIVITI ANTIBAKTERIA EKSTRAK
*GRACILARIA MANILAENSIS***

LEONG HUEY SHAN

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2008

**AKTIVITI ANTIBAKTERIA EKSTRAK
*GRACILARIA MANILAENSIS***

oleh

LEONG HUEY SHAN

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

Jun 2008

PENGHARGAAN

Saya ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan ribuan terima kasih kepada penyelia saya, Profesor Hjh. Dr. Darah Ibrahim yang telah banyak memberikan tunjuk ajar dan bimbingan kepada saya semasa menjalankan kajian ini. Sepanjang kajian ini, saya telah diberi kemudahan yang sempurna untuk penyediaan bahan-bahan kajian dan suasana makmal yang selesa untuk menjalankan kajian ini.

Selain itu, saya juga berterima kasih kepada Dr. Sasidharan yang banyak menghulurkan bantuan, tunjuk ajar dan bimbingan semasa menjalankan kajian ini. Saya juga bersyukur kerana dapat nasihat dan bantuan daripada Kak Suraya, Wendy Rusli dan Hajjar.

Untuk ibu dan bapa serta ahli-ahli keluarga saya yang lain, saya amat menghargai jasa mereka. Dorongan yang diberikan telah meningkatkan semangat dan keyakinan saya untuk menghadapi segala pahit maung walaupun berada di tempat yang jauh. Kejayaan ini sahajalah sebagai hadiah di atas segala sokongan dan doa daripada kalian.

Saya juga mengucapkan terima kasih kepada semua warga staf Pusat Pangajian Sains Kaji Hayat terutamanya Encik Muthu, Kak Jamilah, Encik Johari, Kak Falizah, Encik Teoh, Encik Hamzah, Kak Nurul dan Encik Khairul yang sudi membantu dan memberikan kerjasama kepada saya.

Kepada rakan-rakan seperjuangan, Pei Kheng, Chee Keong, Chu Chia, Sumathi, Balvinder, Kok Chang, Mei Sing, Mang Ling, Muhamad dan Najiha, terima kasih saya ucapkan. Kenangan bersama-sama dalam Makmal Penyelidikan Bioteknologi Industri (Makmal 418) tidak akan saya lupakan. Tidak lupa juga sahabat-sahabat lain dari Makmal 106 iaitu Bing Ling dan Shu Inn yang tidak pernah sunyi menghibur, berkongsi masalah dan memberi semangat.

Tidak lupa juga tunang saya iaitu Hua Kiong kerana sudi berkongsi suka dan duka sepanjang projek ini dijalankan. Kehadiranmu telah meniup semangat dan segala bantuan yang dihulurkan dengan penuh ikhlas membawa saya ke arah kejayaan yang diimpikan bersama.

Akhir sekali, saya ucapkan ribuan terima kasih kepada semua insan yang telah membantu saya sama ada secara langsung atau tidak langsung. Hanya Tuhan sahaja yang mampu membalasnya. Saya minta maaf sekiranya ada salah dan silap.

Sekian, terima kasih.

LEONG HUEY SHAN

2008

KANDUNGAN

	Muka surat	
PENGHARGAAN	ii	
KANDUNGAN	iv	
SENARAI JADUAL	ix	
SENARAI PLAT	xi	
SENARAI RAJAH	xiii	
SENARAI SINGKATAN	xiv	
ABSTRAK	xv	
ABSTRACT	xvii	
 BAB SATU: PENGENALAN		
1.1	Pendahuluan	1
1.2	Keperluan mendapatkan antibiotik baru	1
1.2.1	Wujudnya kerintangan antibiotik baru	2
1.2.2	Munculnya penyakit dan mikroorganisma baru	4
1.3	Antibiotik antibakteria	8
1.3.1	Cara tindakan antibiotik antibakteria	8
1.3.1.1	Merencat sintesis dinding sel	10
1.3.1.2	Merencat membran sel	13
1.3.1.3	Merencat sintesis protein	13
1.3.1.4	Merencat sintesis asid nukleik	14
1.3.1.5	Merencat metabolisme sel	14
1.4	Sebatian semula jadi yang bersifat antibakteria	15
1.5	Sebatian bioaktif daripada marin	15
1.5.1	Mikroorganisma marin	21

1.5.2	Span marin	22
1.5.3	Invertebrat marin	23
1.5.3.1	Selenterat (filum Cnidaria)	23
1.5.3.2	Moluska	23
1.5.3.3	Krustasia	24
1.5.3.4	Ekinoderma	25
1.5.3.5	Tunikat	26
1.5.4	Alga Marin	26
1.5.4.1	Makroalga	28
1.5.4.2	Mikroalga	34
1.6	<i>Gracilaria manilaensis</i> sebagai alga marin kajian	38
1.6.1	Taburan dan pengelasan	39
1.6.2	Potensi <i>Gracilaria manilaensis</i> sebagai bahan agen antibakteria yang baru	44
1.7	Objektif penyelidikan	45
 BAB DUA: BAHAN DAN KAEDAH		
2.1	Penyampelan alga marin kajian	46
2.1.1	Penyampelan <i>Gracilaria manilaensis</i>	46
2.1.2	Proses pembasuhan dan pengeringan	46
2.1.2.1	Pembasuhan di lapangan	46
2.1.2.2	Pembasuhan di makmal	47
2.1.2.3	Pengeringan	47
2.2	Pengekstrakan	47
2.2.1	Pengekstrakan secara rendaman	49
2.2.2	Pengekstrakan secara berperingkat	49

2.3	Penyaringan aktiviti antibakteria ekstrak <i>Gracilaria manilaensis</i> ke atas pelbagai bakteria patogen.	53
2.3.1	Pensterilan	53
2.3.2	Sumber kultur	53
2.3.3	Medium pengkulturan	55
2.3.4	Penyediaan inokulum	55
2.3.5	Penyediaan cakera yang mengandungi ekstrak kasar	55
2.3.6	Ujian kepekaan bakteria terhadap ekstrak kasar	56
2.3.7	Pemerhatian perencatan pertumbuhan bakteria	56
2.4	Kesan kepekatan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap mikroorganisma ujian.	56
2.4.1	Penentuan kepekatan perencatan minimum (MIC)	56
2.4.2	Penentuan kepekatan bakteriosid minimum (MBC)	57
2.5	Kesan penambahan pelbagai kepekatan ekstrak <i>Gracilaria manilaensis</i> ke atas pertumbuhan sel bakteria terpilih.	59
2.6	Perubahan struktur dan morfologi sel bakteria selepas ditindak dengan ekstrak <i>Gracilaria manilaensis</i> .	60
2.6.1	Mikroskopi elektron pensakanan (SEM)	60
2.6.2	Mikroskopi elektron transmisi (TEM)	61
2.7	Ujian kesitotoksikan ekstrak menggunakan kaedah anak udang brin, <i>Artemia salina</i> .	64
2.7.1	Penyediaan air laut buatan 35% saliniti	64
2.7.2	Penyediaan <i>Artemia salina</i>	64
2.7.3	Penyediaan siri kepekatan ekstrak	64
2.7.4	Pendedahan <i>Artemia salina</i> kepada kepekatan ekstrak berlainan	66
2.7.5	Penentuan tahap ketoksikan ekstrak	66

2.8	Penyisihan sebatian bioaktif ekstrak <i>Gracilaria manilaensis</i> melalui kaedah kromatografi.	67
2.8.1	Kromatografi Lapisan Nipis (TLC)	68
2.8.1.1	Penyediaan plat Kromatografi Lapisan Nipis (TLC)	68
2.8.1.2	Penentuan pergerakan relatif	70
2.8.2	Kromatografi turus	70
2.8.2.1	Penyediaan kromatografi turus	71
2.8.3	Penyaringan aktiviti antibakteria daripada setiap fraksi	72

BAB TIGA: KEPUTUSAN

3.1	Pengekstrakan	73
3.1.2	Pengekstrakan secara rendaman	73
3.1.3	Pengekstrakan secara berperingkat	77
3.2	Penentuan aktiviti antibakteria ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> .	77
3.3	Kesan kesitotoksikan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap anak udang brin, <i>Artemia salina</i> .	81
3.4	Kesan kepekatan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap mikroorganisma ujian.	85
3.4.1	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)	85
3.4.2	Penentuan Kepekatan Bakterisid Minimum (MBC)	85
3.5	Kesan penambahan ekstrak <i>Gracilaria manilaensis</i> ke atas pertumbuhan bakteria.	87
3.6	Kesan perubahan struktur dan morfologi sel bakteria selepas penindasan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> .	91
3.6.1	Pengamatan melalui Mikroskop Elektron Penskanan (SEM).	91
3.6.2	Pengamatan melalui Mikroskop Elektron Transmisi (TEM).	97
3.7	Penyisihan sebatian bioaktif yang bersifat antibakteria melalui kaedah kromatografi	102

3.7.1	Hasil penyisihan ekstrak metanol <i>Gracilaria manilaensis</i> dengan kaedah Kromatografi Lapisan Nipis	102
3.7.2	Pemfraksian ekstrak kasar metanol <i>Gracilaria manilaensis</i> dengan Kaedah Kromatografi Turus	105
BAB EMPAT: PERBINCANGAN		
4.1	Ekstrak kasar daripada <i>Gracilaria manilaensis</i> : Kesannya terhadap bakteria patogen dan ketoksikannya.	109
4.2	Perencatan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> oleh ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> dalam ujian MIC.	115
4.3	Kesan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap sel <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> di dalam kaldu pertumbuhan serta pemerhatian di bawah SEM dan TEM.	119
4.4	Pemfraksian ekstrak metanol <i>Gracilaria manilaensis</i> dan penentuan sebatian yang bersifat antibakteria.	123
BAB LIMA: KESIMPULAN DAN CADANGAN PADA MASA HADAPAN		
5.0	Kesimpulan	127
5.1	Cadangan pada masa hadapan	128
RUJUKAN		129
PENERBITAN		163

SENARAI JADUAL

Muka surat

Jadual 1.1	Kelas-kelas utama antibiotik	9
Jadual 1.2	Antibiotik antibakteria dan sasaran tindakannya di dalam sel bakteria.	11
Jadual 1.3	Jenis tumbuhan yang mengandungi sebatian semula jadi bersifat antibakteria.	16
Jadual 1.4	Sebatian marin yang menunjukkan aktiviti antibakteria, antikoagulan, antikulat, antihelminthik, antiplatelet, antiprotozoa dan antivirus.	19
Jadual 1.5	Sebatian bioaktif yang diperolehi daripada Rhodophyta (alga merah).	29
Jadual 1.6	Sebatian bioaktif yang diperolehi daripada Phaeophyta (alga perang).	30
Jadual 1.7	Sebatian bioaktif yang diperolehi daripada Chlorophyta (alga hijau).	32
Jadual 1.8	Sebatian bioaktif yang diperolehi daripada Dinophyceae dan Chlorophyceae.	35
Jadual 1.9	Sebatian bioaktif yang diperolehi daripada sianobakteria.	36
Jadual 1.10	Senarai spesies alga marin dari Famili Gracilariaceae di Malaysia.	42
Jadual 2.1	Senarai bakteria ujian yang digunakan.	54
Jadual 2.2	Kandungan sebatian dalam air laut buatan 35% (b/i) saliniti.	65

Jadual 2.3	Sistem gabungan pelarut yang digunakan untuk TLC.	69
Jadual 3.1	Berat ekstrak yang dapat diekstrak daripada 100.0 g <i>Gracilaria manilaensis</i>	74
Jadual 3.2	Aktiviti perencatan pelbagai ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap bakteria Gram positif.	78
Jadual 3.3	Aktiviti perencatan pelbagai ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap bakteria Gram negatif.	79
Jadual 3.4	Keputusan Ujian Ketoksikan Ekstrak <i>Gracilaria manilaensis</i> Terhadap <i>Artemia Salina</i> .	84
Jadual 3.5	Nilai MIC dan Nilai MBC yang ditunjukkan oleh ekstrak metanol <i>Gracilaria manilaensis</i> .	86
Jadual 3.6	Bilangan fraksi yang dapat dihitung.	103
Jadual 3.7	Pengesanan kehadiran sebatian fenol dengan kaedah TLC dan reagen Vanilin-HCl.	106
Jadual 3.8	Fraksi-fraksi yang disisihkan melalui kromatografi turus.	107

SENARAI PLAT

Muka surat

Plat 1.1	<i>Gracilaria manilaensis</i> .	40
Plat 2.1	<i>Gracilaria manilaensis</i> yang telah dikeringkan dan dipotong kecil.	48
Plat 2.2	<i>Gracilaria manilaensis</i> kering yang telah dipotong kecil direndamkan dalam 200.0 ml larutan metanol: kloroform (1:1).	50
Plat 3.1	Ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> .	75
Plat 3.2	Ekstrak dalam bentuk pes.	76
Plat 3.3	Zon perencatan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap <i>P. aeruginosa</i> .	82
Plat 3.4	Zon perencatan ekstrak kasar <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap <i>S. aureus</i> .	83
Plat 3.5	Sel-sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol pada permulaan eksperimen.	92
Plat 3.6	Sel-sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) pada permulaan eksperimen (0 jam).	92
Plat 3.7	Sel-sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol selepas 48 jam pengkulturan.	94
Plat 3.8	Sel-sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) selepas 48 jam pengkulturan.	94
Plat 3.9	Sel-sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol pada permulaan eksperimen.	95
Plat 3.10	Sel-sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) pada 0 jam pengkulturan.	95
Plat 3.11	Sel-sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol selepas 48 jam pengkulturan.	96
Plat 3.12	Sel-sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) selepas 48 jam pengkulturan.	96

Plat 3.13	Keratan rentas sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol pada permulaan eksperimen (0 jam).	98
Plat 3.14	Keratan rentas sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol selepas 48 jam pengkulturan.	98
Plat 3.15	Keratan rentas sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) pada 0 jam pengkulturan.	99
Plat 3.16	Keratan rentas sel <i>P. aeruginosa</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) selepas 48 jam pengkulturan.	99
Plat 3.17	Keratan rentas sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol pada permulaan eksperimen (0 jam).	100
Plat 3.18	Keratan rentas sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu tanpa penambahan ekstrak metanol selepas 48 jam pengkulturan.	100
Plat 3.19	Keratan rentas sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) pada 0 jam pengkulturan.	101
Plat 3.20	Keratan rentas sel <i>S. aureus</i> dalam kaldu yang mengandungi ekstrak metanol (6.25 mg/ml) selepas 48 jam pengkulturan.	101
Plat 3.21	Fraksi-fraksi yang dipisahkan daripada ekstrak metanol <i>Gracilaria manilaensis</i> dengan sistem pelarut kloroform : etil asetat (9:1).	104

SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 1.1	Sasaran utama antibiotik.	12
Rajah 1.2	<i>Gracilaria manilaensis</i> .	43
Rajah 2.1	Carta aliran pengekstrakan <i>Gracilaria manilaensis</i> secara berperingkat	51
Rajah 2.2	Cara pengiraan kepekatan kaldu untuk MIC dan MBC.	58
Rajah 3.1	Kesan ekstrak metanol daripada <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	88
Rajah 3.2	Kesan ekstrak metanol daripada <i>Gracilaria manilaensis</i> terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .	90

SENARAI SINGKATAN

1. DMSO : Dimetilsulfoksida
2. HMDS : Heksametildisilazana
3. LC₅₀ : Kepekatan yang dapat membunuh 50% haiwan kajian
4. LC₅₀ akut : Kepekatan yang dapat membunuh 50% pada ketoksikan akut
5. LC₅₀ kronik : Kepekatan yang dapat membunuh 50% pada ketoksikan kronik
6. MIC : Kepekatan Perencatan Minimum
7. MBC : Kepekatan Bakterisid Minimum
9. MRSA : *Staphylococcus aureus* rintang metisilin
8. PTFE : Penuras Membran Politetraflurotelina
9. R_f : Pergerakan Relatif
10. SEM : Mikroskop Elektron Penskanan
11. TEM : Mikroskop Elektron Transmisi
12. TLC : Kromatografi Lapisan Nipis
13. UV : Ultra Lembayung

ABSTRAK

Aktiviti antibakteria *Gracilaria manilaensis* (*G. manilaensis*) telah dikaji untuk menilai potensinya sebagai agen antibakteria dalam industri farmaseutikal. Pengekstrakan telah dijalankan dengan menggunakan beberapa pelarut yang berbeza, iaitu kloroform:metanol (1:1), metanol, dietil eter dan etil asetat. Bioaktiviti ekstrak kasar daripada *G. manilaensis* telah dianalisiskan terhadap 30 spesies bakteria (8 bakteria Gram positif, 22 bakteria Gram negatif) dengan menggunakan kaedah pembauran cakera. Ekstrak kasar kloroform:metanol (1:1) dan ekstrak kasar metanol bertindak paling aktif terhadap sesetengah bakteria ujian. Walau bagaimanapun, ekstrak kasar methanol memberikan hasil yang lebih baik sedikit daripada ekstrak kasar kloroform:methanol (1:1). Kedua-dua ekstrak menunjukkan aktiviti paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Ekstrak kasar dietil eter dan ekstrak kasar etil asetat pula menunjukkan aktiviti yang sederhana terhadap sesetengah bakteria ujian. Larva *Artemia salina* (*A. salina*) yang baru menetas telah digunakan untuk mengkaji sitotoksik ekstrak kasar *G. manilaensis* dalam bioasai anak udang brin. Semua ekstrak kasar *G. manilaensis* mempunyai kesan maut dan membunuh 50% larva anak udang apabila nilai LC_{50} ekstrak kloroform:metanol (1:1), metanol, dietil eter dan etil asetat terhadap *A. salina* ialah 5.84 mg/ml, 10.66 mg/ml, 5.03 mg/ml dan 2.51 mg/ml. Semua ekstrak kasar *G. manilaensis* adalah tidak toksik terhadap anak udang brin secara relatif ($LC_{50} > 1$ mg/ml). Ekstrak kasar metanol telah dipilih berdasarkan aktiviti yang tinggi terhadap *S. aureus* (zon perencatan terbesar 15.33 ± 0.58 mm) dan *P. aeruginosa* (zon perencatan terbesar 13.50 ± 0.58 mm) dan tidak toksik terhadap *A. salina*. Kepekatan perencatan minimum (MIC) dan kepekatan bakteriosid minimum (MBC) bagi

ekstrak kasar metanol telah ditentukan terhadap bakteri ujian yang terpilih. Nilai MIC bagi ekstrak kasar metanol terhadap *S. aureus* ialah 6.25 mg/ml dan nilai MBC ialah 12.50 mg/ml. Nilai MIC dan MBC bagi ekstrak kasar metanol terhadap *P. aeruginosa* ialah 6.25 mg/ml dan 12.50 mg/ml masing-masing. Profil pertumbuhan bakteri telah ditentukan pada kepekatan setengah MIC, MIC dan dua kali ganda MIC. Pertumbuhan *S. aureus* dan *P. aeruginosa* semakin berkurang dengan peningkatan kepekatan ekstrak kasar metanol. Pencerapan mikroskopi menunjukkan bahawa ekstrak kasar metanol berupaya menyebabkan beberapa perubahan dalam fisiologi dan morfologi sel *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Berdasarkan pemerhatian melalui mikroskop penskanan elektron dan mikroskop transmisi elektron, bilangan dinding rentas *S. aureus* dan ketebalan dinding sel *S. aureus* didapati bertambah secara signifikan selepas didedahkan kepada ekstrak kasar metanol. Pendedahan *P. aeruginosa* kepada ekstrak kasar metanol menunjukkan bahawa perubahan pada dinding sel dan akhirnya menyebabkan gangguan kepada dinding sel. Ekstrak kasar metanol telah difraksikan dengan lebih lanjut untuk menentukan komponen aktif yang bertanggungjawab untuk menunjukkan antibakteria aktiviti melalui kromatografi lapisan nipis dan kromatografi turus. Fraksi-fraksi ini telah diuji terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa* dengan menggunakan kaedah pembauran cakera dan fraksi-fraksi ini didapati bertindak aktif terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa*.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE *GRACILARIA MANILAENSIS* EXTRACTS

ABSTRACT

The antibacterial activity of *Gracilaria manilaensis* (*G. manilaensis*) was studied to evaluate its potential for being used as antibacterial agent in the pharmaceutical industry. The extraction was carried out with different solvents, namely chloroform:methanol (1:1), methanol, diethyl ether and ethyl acetate. The bioactivity was analysed from crude extracts of dried algae sample against 30 bacterial species (8 Gram positive bacteria, 22 Gram negative bacteria) using disc diffusion method. Chloroform:methanol (1:1) crude extract and methanol crude extract were more active against some of the tested bacteria. But, methanol crude extract shown better activity compared with chloroform:methanol (1:1) crude extract. Both extracts were most active against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). The diethyl ether crude extract and ethyl acetate crude extract showed mild activity against some of the tested organisms. A brine shrimp bioassay using newly hatched *Artemia salina* (*A. salina*) larvae was used for cytotoxicity studies of crude extracts from *G. manilaensis*. All the crude extracts of *G. manilaensis* had lethal effects and killed 50% of the shrimp larvae when LC₅₀ of chloroform:methanol (1:1), methanol, diethyl ether and ethyl acetate extract on *A. salina* was 5.84 mg/ml, 10.66 mg/ml, 5.03 mg/ml and 2.51 mg/ml. All the crude extracts of *G. manilaensis* were relatively non-toxic to brine shrimp (LC₅₀ > 1 mg/ml). Methanol crude extract of *G. manilaensis* was selected based on its strong activity against *S. aureus* (largest inhibition zone 15.33 ± 0.58 mm) and *P.*

aeruginosa (largest inhibition zone 13.50 ± 0.58 mm) and non toxicity against *A. salina*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) for methanol crude extract had been determined for the selected test microorganisms. The MIC value for methanol crude extract was 6.25 mg/ml and MBC value was 12.50 mg/ml against *S. aureus*. The MIC and MBC values of methanol crude extract against *P. aeruginosa* was 6.25 mg/ml and 12.50 mg/ml respectively. The bacteria growth profile was determined with the methanol crude extract at half MIC, MIC and two times MIC concentrations. The growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa* were correspondingly decreased by increasing concentration of methanol crude extract. Microscopic studies showed that the methanol crude extract caused some physiological and morphological changes in the treated cells of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Based on scanning electron microscopic (SEM) and transmission electron microscopic (TEM) observation, a significant increase in the number of crosswalls in *S. aureus* and thickening of the cell wall of *S. aureus* occurred after methanol crude extract exposure. Exposure *P. aeruginosa* to methanol crude extract results alterations of the cell wall eventually leading to the destruction of the cell. Methanol crude extract was further fractioned to determine the active components responsible for the antibacterial activity using thin layer chromatography and chromatography column. These fractions were tested against *S. aureus* and *P. aeruginosa* using disc diffusion assay and fractions were found to be active against on *S. aureus* and *P. aruginosa*.

1.0 PENGENALAN

1.1 PENDAHULUAN

Rumpai ialah rumput atau tumbuh-tumbuhan kecil lain yang tidak berguna di kawasan yang telah diusahakan. Manusia telah menggolongkan alga marin sebagai rumpai laut walaupun ia tidak menjejaskan sebarang aktiviti pertanian. Alga marin mempunyai peranan ekologi yang sama seperti yang dimainkan oleh tumbuhan daratan. Melalui proses fotosintesis, alga marin ini membentuk asas kepada jaringan makanan dan menghasilkan bahan organik kepada hidupan laut sama ada secara langsung atau tidak langsung. Namun demikian, kewujudan alga marin yang penuh dengan keunikan sering kali diabaikan oleh manusia.

1.2 KEPERLUAN MENDAPATKAN ANTIBIOTIK BARU

Antibiotik adalah kelas ubat-ubatan yang digunakan dalam mengubati penyakit berjangkit yang disebabkan oleh bakteria. Antibiotik bertindak dengan cara membunuh bakteria (bakterisid) atau merencat pertumbuhan bakteria (bakteriostatik) bagi membolehkan sistem pertahanan tubuh memusnahkannya (Lancini *et al.*, 1995).

Penemuan dan penciptaan antibiotik yang bermula pada tahun 1935 dianggap sebagai peluru ajaib (“magic bullets”) kerana dapat membunuh bakteria dan seterusnya menyelamatkan penduduk dunia dari kesengsaraan (Bu’lock &

Kristiansen, 1987). Hasil penemuan ini didapati berupaya mengurangkan kematian manusia akibat jangkitan penyakit yang diperhatikan pada abad ke-18 hingga abad ke-20 apabila seluruh dunia mengalami masalah penyakit berjangkit yang serius seperti penyakit kelamin, pneumonia, cirit-birit, meningitis, wabak bubonik, batuk kering, demam kuning, tifus dan taun yang telah membunuh jutaan manusia. Walau bagaimanapun, kini, mikroorganisma patogen tersebut telah semakin rintang terhadap antibiotik.

1.2.1 Wujudnya kerintangan antibiotik baru

Fenomena kerintangan bakteria terhadap antibiotic amat penting kerana apabila bakteria menjadi rintang atau tidak sensitif terhadap antibiotik tertentu, maka ia tidak lagi berkesan terhadap penyakit atau kelompok pesakit tertentu yang berlaku dalam sesuatu kawasan. Kerintangan bakteria terhadap antibiotik kini telah menjadi masalah utama di seluruh dunia (Palumbi, 2001).

Kerintangan antibiotik sememangnya tidak dapat dielakkan dan masalah ini adalah berkadar langsung dengan tempoh penggunaan antibiotik tertentu (Davies, 1994). Semakin kerap antibiotik digunakan, kadar kerintangan akan semakin meningkat, lalu menurunkan keberkesanan antibiotik. Biasanya, kerintangan yang signifikan pada antibiotik baru akan muncul selepas digunakan secara klinikal selama beberapa bulan atau tahun (Walsh, 2000; Livermore, 2004).

Sebagai contoh, kerintangan penisilin dikesan selepas beberapa tahun digunakan secara klinikal dalam tahun 1942 (Travis, 1994) dan kerintangan streptomisin berlaku selepas satu tahun penemuannya dalam tahun 1944 (Waksman *et al.*, 1945). Kerintangan vankomisin hanya dikesan selepas 30 tahun (dalam tahun 1987) selepas digunakan secara klinikal (Murray, 1997). Keadaan ini berlaku kerana vankomisin kurang digunakan pada “era antibiotik” di antara tahun 1950-an dan 1960-an memandangkan terdapat antibiotik lain yang lebih berkesan.

Masalah kerintangan serta penyebaran bakteria rintang ke kawasan lain adalah amat membimbangkan. Punca utama masalah ini disebabkan oleh penggunaan antibiotik secara tidak rasional oleh pengamal-pengamal kesihatan atau pesakit seperti menggunakan: antibiotik untuk jangkitan yang terlalu singkat; pada dos yang tidak tepat; atau untuk penyakit yang tidak memerlukannya (Lim, 1992).

Sesetengah antibiotik pula diperolehi oleh orang ramai dari kedai farmasi komuniti atau sumber-sumber lain tanpa preskripsi atau nasihat doktor. Perbuatan ini adalah menyalahi undang-undang. Kegagalan mengubati penyakit berjangkit menggunakan antibiotik pilihan akan membawa bencana kepada rakyat sesuatu negara. Dalam hal ini, antibiotik memainkan peranan yang sangat penting dalam meningkatkan tahap kesihatan rakyat. Tambahan pula, kebanyakan negara dunia ketiga sering diancam oleh penyakit berjangkit akibat masalah kemiskinan, pemakanan tak seimbang, sanitasi yang buruk dan keadaan kawasan perumahan yang tidak baik.

Justeru itu adalah disarankan supaya kedua-dua belah pihak iaitu pengamal perubatan dan orang ramai dapat mengamalkan cara penggunaan ubat antibiotik yang betul.

1.2.2 Kemunculan penyakit dan mikroorganisma baru

Penduduk di sesuatu kawasan mengalami risiko jangkitan jika penyakit tersebut ialah penyakit endemik (penyakit yang sentiasa terdapat dalam sesuatu populasi). Apabila wabak penyakit berlaku, ramai individu dalam sesuatu masyarakat dijangkiti oleh penyakit tersebut pada masa yang sama, penyakit tersebut dikatakan penyakit epidemik. Kahadiran patogen yang baru dalam masyarakat merupakan punca utama berlakunya penyakit epidemik. Apabila penyakit epidemik berlaku di banyak kawasan di dunia pada masa yang sama, penyakit ini akan bertukar menjadi penyakit pendemik.

Kehadiran virus Japanese Encephalitis (JE) dan virus Nipah telah menimbulkan kebimbangan masyarakat terhadap serangan wabak tersebut yang telah mengorbankan lebih 80 orang pada tahun 1999 (Chua, 2003). Ekoran daripada langkah pemusnahan yang diambil terhadap kawasan ternakan khinzir di Bukit Pelanduk, Negeri Sembilan serta Tambun, Ipoh, kedua-dua virus tersebut telah berjaya dikawal. Namun demikian, kemunculan semula virus JE dan virus Nipah di beberapa ladang sekitar negeri Perak pada tahun 2000 telah menunjukkan bahawa usaha untuk menghapuskan virus-virus ini masih menemui jalan yang buntu. Kajian yang dijalankan mendapati bahawa kematian yang

berlaku kepada para penternak khinzir di negara kita bukan disebabkan oleh virus JE tetapi disebabkan oleh virus Nipah (Sahani *et al.*, 2001).

Bacillus anthracis, sejenis bakteria tanah yang tidak dikenali sebelum ini, tiba-tiba sahaja menjadi sebutan serta mencetus kebimbangan dan kegelisahan di seluruh dunia. Keadaan ini berlaku kerana penyakit berjangkit Antraks disebabkan oleh bakteria ini. Antraks berbahaya kerana ia mudah membawa maut dan juga merupakan satu agen biologi yang mudah dijadikan sebagai senjata. Bakteria ini dapat berjangkit kepada manusia sekiranya manusia bersentuh dengan haiwan yang dijangkit penyakit antraks (Anonymous, WHO, 2005, <http://www.who.int/entity/crs/disease/Anthrax/en/index.html>).

Walaupun fobia ancaman antraks masih lagi menjadi igauan kepada sesetengah negara, kini dunia menghadapi ancaman baru iaitu wabak jangkitan sistem pernafasan yang boleh membunuh dikenali sebagai Sindrom Pernafasan Akut Teruk (SARS). SARS merupakan epidemik penyakit bawaan udara pertama dalam sejarah perubatan. Wabak SARS menular begitu cepat di seluruh dunia menyebabkan warga dunia panik terutamanya negara-negara yang dilanda wabak tersebut.

Wabak SARS dipercayai bermula dari wilayah Guandong, China pada November 2002 melibatkan 300 kes dan 5 kematian. China, Hong Kong, Vietnam, Kanada, Taiwan, Singapura, Amerika Syarikat dan United Kingdom telah disahkan sebagai kawasan yang mempunyai jangkitan SARS manakala kematian di lebih 20 negara lain termasuk Malaysia tidak disahkan sebagai

kawasan yang mempunyai jangkitan SARS. Penduduk tempatan yang meninggal dunia akibat jangkitan SARS adalah dijangkiti dari luar negara iaitu negara yang dijangkiti SARS. Walau bagaimanapun, semua negara di dunia ini berusaha menangani dari merebaknya wabak tersebut. Pintu-pintu masuk di sempadan dan lapangan terbang disediakan satu unit khas pemeriksaan kesihatan.

Pertubuhan kesihatan seluruh dunia seperti Pertubuhan Kesihatan Dunia (WHO), Pusat Kawalan dan Pencegahan Penyakit Amerika Syarikat (CDC) serta lain-lain pertubuhan kesihatan bertungkus lumus mengenalpasti punca dan mencari kaedah dan penawar penyakit SARS (Anonymous, WHO, 2003). Sehingga kini WHO telah mengenalpasti punca yang menyebabkan SARS ialah sejenis virus baru dari keluarga coronavirus. Walaupun virus ini disyaki menjadi punca utama penyakit SARS, kajian ke atas virus-virus lain yang mungkin menjadi penyebab SARS masih terus dijalankan

Pada 5 Januari 2005 Malaysia telah diisytiharkan bebas daripada wabak selesema burung. Namun begitu, setelah setahun berlalu virus ini dikesan semula di Malaysia dengan kes kematian 40 ekor ayam kampung yang disahkan dijangkiti virus H5N1 (Anonymous, Utusan Malaysia, 2006).

Ancaman selesema burung mula berlaku dalam sektor ternakan di hampir 8 buah negara di Asia lewat tahun 2003 hingga awal tahun berikutnya. Keadaan menjadi agak terkawal menjelang pertengahan 2004. Namun begitu, penularan wabak ini kembali menjadi perhatian masyarakat dunia apabila ia dilaporkan

masih terus berlaku dengan peningkatan bilangan mangsa yang dijangkiti virus berbahaya ini.

Virus H5N1 pada kebiasaannya tidak menjangkiti manusia. Malah, kebanyakan kes jangkitan terhadap manusia berlaku dalam kalangan individu yang berisiko tinggi seperti mereka yang bekerja di ladang ternakan, bersabung ayam atau mereka yang memeriksa tempat-tempat ternakan dan mengendalikan pemusnahan ternakan yang berpenyakit. Sehingga kini belum ada lagi kes jangkitan selesema burung yang berpunca daripada manusia.

Selesema burung disebabkan oleh sejenis virus. Dalam kalangan ahli sains, virus ini dikenali sebagai Avian Influenza A (H5N1) atau H5N1 (Highly Pathogenic Avian Influenza – HPAI). Berdasarkan kajian, virus avian influenza terdiri daripada banyak subjenis. Kebanyakan subjenis virus ini hanya menjangkiti haiwan ternakan terutamanya spesies burung seperti ayam, itik, angsa dan juga burung-burung liar. Namun demikian, saintis telah berjaya mengenalpasti beberapa subjenis yang dapat menjangkiti manusia, antaranya ialah H5, H7 dan H9. Antara ketiga-tiga subjenis ini, subjenis H5N1 diketahui paling patogenik, manakala keupayaan subjenis H7N7 dan H9N2 untuk menyebabkan jangkitan masih dalam kajian para saintis (Anonymous, WHO, 2007).

1.3 ANTIBIOTIK ANTIBAKTERIA

Pengenalan antibiotik sulfonamida dan penisilin untuk kegunaan secara klinikal pada tahun 1930-an dan 1940-an telah memudahkan rawatan penyakit berjangkit yang disebabkan oleh mikroorganisma. Kemudahan ini telah menurunkan kadar mortaliti secara mendadak (Cohen, 2000). Pencarian agen antibakteria telah dijalankan secara intensif setelah penisilin berjaya digunakan secara klinikal. Ekoran daripada itu, beberapa jenis antibiotik seperti streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, erithromisin, rifamisin, vankomisin dan sefalosporin telah dihasilkan di antara tahun 1940 dan tahun 1960.

Namun demikian, penyakit berjangkit yang disebabkan oleh mikroorganisma masih merupakan faktor kematian utama di negara-negara yang sedang membangun (Fauch, 2001; Nathan, 2004). Kemunculan bakteria dalam bentuk yang lebih virulen dan jangkitan daripada bakteria yang rintang kepada antibiotik telah merumitkan keadaan ini. Untuk mengelakkan sebaran daripada bakteria yang rintang terhadap antibiotik, usaha untuk mencari agen antibakteria baru amat diperlukan (Leeb, 2004; Projan, 2002).

1.3.1 Cara tindakan antibiotik antibakteria

Walaupun terdapat banyak antibiotik digunakan secara klinikal, namun sasaran tindakan antibiotik adalah terhad. Antibiotik biasa dikelaskan berdasarkan struktur kimia (Jadual 1.1) dan cara tindakan antibiotik tersebut. Antibiotik antibakteria bertindak dengan beberapa cara terhadap bakteria (Jadual

Jadual 1.1: Kelas-kelas Utama Antibiotik.
(Sumber: Greenwood, 2000)

Kelas	Contoh
Sulfonamida	sulfametaksazol, sulfasetamida, sulfadoksin
Penisilin	ampisilin, amoksisilin, kloksasilin
Sefalosporin	sefoperazon, seftazidim, sefuroksim
Aminoglikosida	gentamisin, neomisin, streptomisin
Makrolid	eritromisin
Linkosarnida	klindamisin
Tetrasiklin	tetrasiklin, minosiklin
Kuinolon	asid nalidiksik, perfloksasin
Lain-lain	kloramfenikol, kotrimoksazol

1.2). Cara-cara ini termasuk merencat sintesis dinding sel, merencat membran sel, merencat sintesis protein, merencat sintesis asid nukleik dan merencat metabolisme sel (Walsh, 2003). Rajah 1.1 menunjukkan sasaran utama antibiotik.

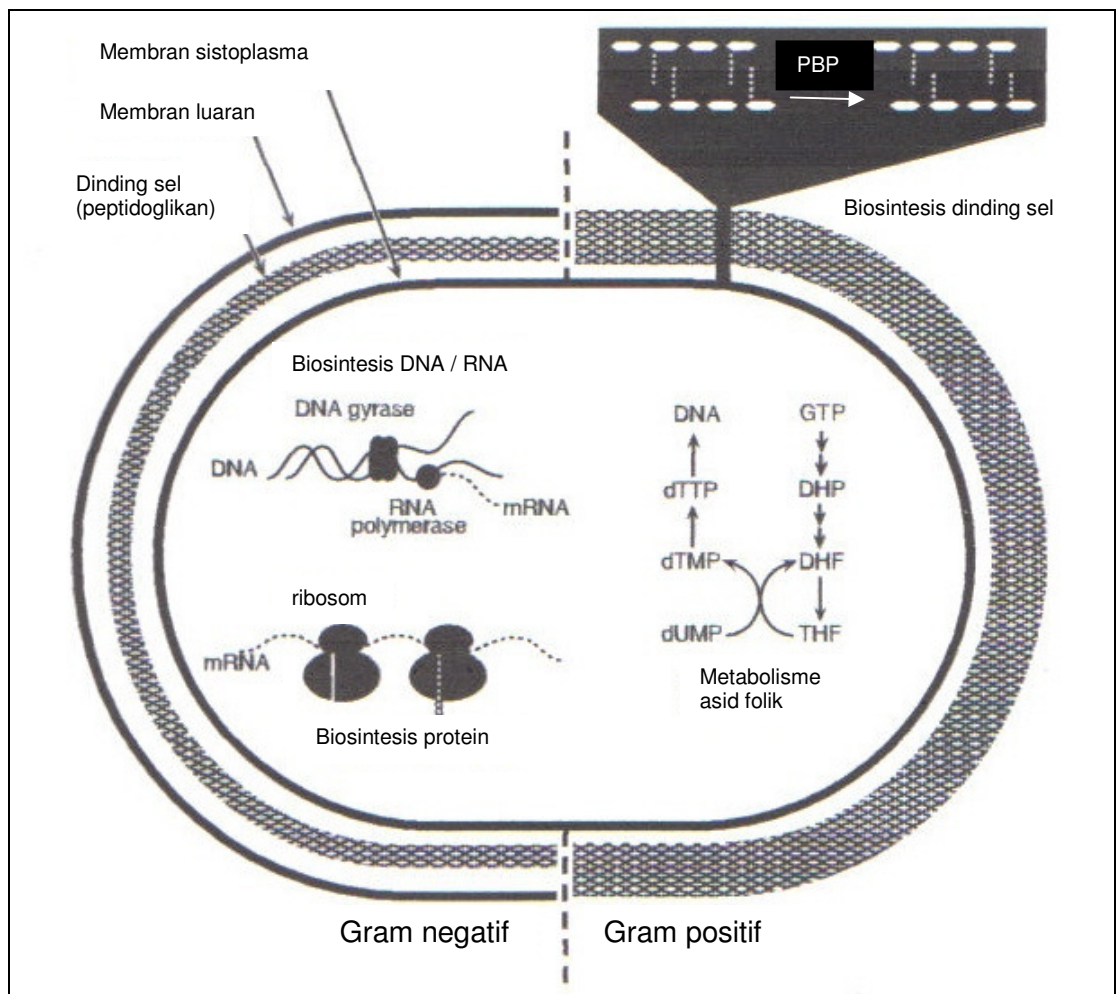
1.3.1.1 Merencat sintesis dinding sel

Lapisan dinding sel bakteria terdiri daripada peptidoglikan, iaitu rantaian polisakarida yang dirangkai silang dengan peptida. Kedua-dua jenis bakteria Gram negatif seperti *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* serta bakteria Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pneumoniae* mempunyai lapisan dinding sel yang terdiri daripada peptidoglikan. Secara amnya, lapisan peptidoglikan ini adalah lebih tebal di dalam dinding sel bakteria Gram positif jika dibandingkan dengan dinding sel bakteria Gram negatif (Nikaido, 1994).

Penisilin mengganggu biosintesis struktur peptidoglikan, khususnya cantuman silang antara rantai-rantai peptide lalu menghalang pembentukan dinding sel yang sempurna. Oleh itu, dinding sel ini akan menjadi lemah dan akhirnya menyebabkan sel lisis. Sel-sel manusia tidak menerima kesan yang ketara daripada kepekatan normal penisilin kerana sel manusia tidak mempunyai dinding sel yang mengandungi peptidoglikan. Penisilin yang memberi kesan kepada sintesis dinding sel tidak akan memberi kesan yang serius terhadap sel-sel yang tidak mengalami pertumbuhan kerana tidak terdapat sintesis bahan-bahan dinding sel yang baru pada sel-sel ini.

Jadual 1.2: Antibiotik antibakteria dan sasaran tindakannya di dalam sel bacteria.
 (Sumber: Greenwood, 2000)

Jenis antibiotik	Sumber	Tindakan antibiotik	Sasaran tindakan di dalam sel bacteria
Basitrasin	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bakterisidal	} Merencat dinding sel
Penisilin	<i>Penicillium notatum</i>	Bakterisidal	
Sefalosporin	<i>Cephalosporium sp.</i>	Bakterisidal	
Vankomisin	<i>Streptomyces orientalis</i>	Bakterisidal	
Gramisidin	<i>Bacillus brevis</i>	Bakterisidal	} Merencat membran sel
Polimiksin	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bakterisidal	
Valinomisin	<i>Streptomyces fulvissimus</i>	Bakterisidal	
Actinomisin D	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Bakteriostatik	} Merencat sintesis asid nukleik
Mitomisin C	<i>Streptomyces caespitosus</i>	Bakterisidal	
Rifampisin	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Bakterisidal	
Gentamisin	<i>Micromonospora purpurea</i>	Bakterisidal	} Merencat sintesis protein
Kanamisin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Bakterisidal	
Kloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Bakteriostatik	
Neomisin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Bakterisidal	
Streptomisin	<i>Streptomyces griseus</i>	Bakterisidal	
Tetrasiklin	<i>Streptomyces sp.</i>	Bakteriostatik	



Rajah 1.1 Sasaran utama antibiotik.
(Sumber: Hiroshi & Ryoichi, 2006)

Petunjuk:

PBP: Protein berikat penisilin

DHP: Dihidropteroat

DHF: Dihidrofolat

THF: Tetrahidrofolat

1.3.1.2 Merencat membran sel

Semua sel dikelilingi oleh membran. Oleh itu kematian sel akan berlaku apabila fungsi membran sel ini diganggu. Kesan kekhususan polimiksin terhadap sel-sel yang sensitif bergantung kepada gabungannya dengan membran (Hancock & Chapple, 1999). Perbezaan sensitiviti ini bergantung kepada membran yang kaya dengan lipid yang terdapat pada bakteria Gram negatif.

1.3.1.3 Merencat sintesis protein

Perencat yang merencat sintesis protein sel bakteria akan bergabung dengan ribosom sel bakteria kerana ribosom merupakan tempat berlakunya sintesis protein di dalam sel. Apabila sintesis protein diganggu, proses pembiakan bakteria akan terhalang akibat salah kod genetik. Kloramfenikol bertindak pada subunit ribosom 50S pada bakteria dan menghalang penggabungan mRNA kepada ribosom bakteria (Schlunzen *et al.*, 2001).

Antibiotik aminoglikosida dan tetrasiklin pula bertindak pada subunit ribosom 30S pada bakteria lalu mengakibatkan perencatan sintesis protein di dalam sel bakteria (Carter *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2000). Antibiotik aminoglikosida akan terikat dengan ribosom dan menyebabkan bacaan kod-kod genetik yang tidak tepat. Rantai peptida yang dibina akan mengandungi asid amino yang tidak sepatutnya ada dalam rantai peptida ini. Bentuk protein yang berlainan terbina dan keadaan ini boleh menyebabkan kematian sel bakteria

tersebut. Tetrasiklin merencatkan sintesis protein dengan menghalang gabungan aminoasil-tRNA kepada kompleks ribosom-mRNA.

1.3.1.4 Merencat sintesis asid nukleik

Rifampisin ialah antibiotik semisintetik daripada rifamisin B yang dipencilkan daripada *Amycolatopsis mediterranea* (sebelum ini dikenali sebagai *Streptomyces mediterranes* atau *Nocardia mediterranes*). Rifampisin berkesan sebagai agen dalam pengubatan tibi.

Rifampisin merencat sintesis RNA dalam sel bakteria dan tidak mempengaruhi sintesis DNA secara *in vitro*. Rifampisin ini bertindak dengan mempengaruhi fungsi enzim RNA polymerase bergantung DNA (Spratt, 1994; Campbell *et al.*, 2001).

1.3.1.5 Merencat metabolisme sel

Metabolime mikroorganisma menjadi terencat apabila sejenis analog digunakan untuk menggantikan faktor pertumbuhan yang diperlukan tetapi tidak menggantikan fungsi faktor pertumbuhan tersebut. Antimetabolit seperti sulfonamida merupakan analog kepada faktor pertumbuhan asid p-amino-benzoik (PABA) yang diperlukan oleh asid folik. Sulfonamida ini bersaing dengan PABA untuk bergabung dengan molekul folat. Asid folik ini diperlukan untuk pertumbuhan sel-sel bakteria dan bakteria perlu mensintesis asid folik ini

secara intrasel. Bakteria yang mensintesisasikan asid folik daripada PABA akan direncat oleh sulfonamida.

1.4 SEBATIAN SEMULA JADI YANG BERSIFAT ANTIBAKTERIA

Menurut Kementerian Sumber Asli dan Alam Sekitar (NRE), sehingga tahun 2000, terdapat 600 spesis tumbuhan yang telah dikenal pasti sebagai tumbuhan yang berpotensi untuk tumbuhan ubatan di Malaysia (Anonymous, Kementerian Sumber Asli dan Alam Sekitar, 2006). Sebahagian besar daripada tumbuhan di negara kita masih belum diselidik secara saintifik. Usaha dalam penyelidikan perlu dipertingkatkan dan diperkukuhkan lagi agar tumbuh-tumbuhan ini dapat diselidiki sepenuhnya dalam bidang bioteknologi dan farmaseutikal. Jadual 1.3 menunjukkan beberapa jenis tumbuhan yang biasa digunakan dalam perubatan tradisional. Tumbuh-tumbuhan ini mudah ditemui dan senang digunakan, malah juga mengandungi sebatian semula jadi yang bersifat antibakteria.

1.5 SEBATIAN BIOAKTIF DARIPADA MARIN

Terdapat banyak kajian telah dijalankan ke atas organisma marin dan melaporkan bahawa sebatian bioaktif yang diperolehi daripada organisma marin ini menunjukkan bioaktiviti yang menggalakkan (Tziveleka *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003; Yim *et al.*, 2004; Iken & Baker, 2003; Tsoukatou *et al.*, 2002; Bhosale *et al.*, 2002; de Nys & Steinberg, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Wilsanand *et al.*, 2001; Armstrong *et al.*, 2000).

Jadual 1.3: Jenis tumbuhan yang mengandungi sebatian semula jadi bersifat antibakteria.

<p>(1) Bereksa</p> <p>Nama botani: <i>Cassia fistula</i> L. Famili: Leguminosae (Caesalpiniaseae) Bioaktiviti: Ekstrak kasar menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Kumar <i>et al.</i>, 2006; Senthil <i>et al.</i>, 2006).</p>
<p>(2) Dukung anak</p> <p>Nama botani: <i>Phyllanthus niruri</i> L. Famili: Euphorbiaceae Bioaktiviti: Kehadiran alkaloid dalam tumbuhan ini menunjukkan kesan antibakteria dan penghalang HIV (Khatoon <i>et al.</i>, 2006; Naik & Juvekar, 2003).</p>
<p>(3) Ekor anjing</p> <p>Nama botani: <i>Plantago major</i> L. Famili: Plantaginaceae Bioaktiviti: Sebatian bioaktif yang terkandung dalam pokok ekor anjing seperti alkaloid, flavonoid dan terpenoid menunjukkan kesan antibakteria (Samuelsen, 2000).</p>
<p>(4) Gajus</p> <p>Nama botani: <i>Anacardium occidentale</i> L. Famili: Anacardiaceae Bioaktiviti: Ekstrak gajus bertindak sebagai agen antibakteria terhadap <i>Escherichia coli</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Kudi <i>et al.</i>, 1999; Akinpelu <i>et al.</i>, 2001) serta <i>Helicobacter pylori</i> (Kubo <i>et al.</i>, 1999).</p>
<p>(5) Gelam</p> <p>Nama botani: <i>Melaleuca cajuputi</i> Powell Famili: Myrtaceae Bioaktiviti: Minyak gelam menunjukkan kesan antibakteria terhadap <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Salmonella choleraesuis</i>, <i>Shigella flexneri</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (Harkenthal <i>et al.</i>, 1999).</p>
<p>(6) Gelang susu</p> <p>Nama botani: <i>Euphorbia hirta</i> L. Famili: Euphorbiaceae Bioaktiviti: Ekstrak etanol gelang susu menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap <i>Escherichia coli</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> (Sudhakar <i>et al.</i>, 2006).</p>

Jadual 1.3: Sambungan.

<p>(7) Gelenggang kecil</p> <p>Nama botani: <i>Cassia tora</i> L. Famili: Leguminosae Bioaktiviti: Kandungan aloe emodin, emodin dan rein menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> rintang metisilin (MRSA) (Hatano <i>et al.</i>, 1999).</p>
<p>(8) Kacang kota</p> <p>Nama botani: <i>Cassia occidentalis</i> L. Famili: Leguminosae Bioaktiviti: Ekstrak daripada daun kacang kota didapati mengandungi antrakuinon yang menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Bacillus subtilis</i> (Jain <i>et al.</i>, 1998; Samy & Ignacimuthu, 2000)</p>
<p>(9) Kenanga</p> <p>Nama botani: <i>Cananga odorata</i> (Lamk) Hook. F. & Thompson Famili: Annonaceae Bioaktiviti: Benzil dan benzoat yang terkandung dalam kenanga menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap bakteria Gram positif dan Gram negatif (Rahman <i>et al.</i>, 2005).</p>
<p>(10) Koko</p> <p>Nama botani: <i>Theobroma cacao</i> L. Famili: Sterculiaceae Bioaktiviti: Sebatian polifenol daripada biji koko menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap beberapa jenis bakteria patogen seperti <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> (Arlorio <i>et al.</i>, 2001).</p>
<p>(11) Paku lipan</p> <p>Nama botani: <i>Blechnum orientale</i> L. Famili: Blechnaceae Bioaktiviti: Paku lipan menunjukkan kesan antibakteria terhadap <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Micrococcus luteus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> (Irudayaraj <i>et al.</i>, 2000).</p>
<p>(12) Pegaga</p> <p>Nama botani: <i>Centella asiatica</i> Famili: Umbelliferae Bioaktiviti: Ekstrak kasar matanol daripada daun pegaga menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> rintang metisilin (MRSA) (Zaidan <i>et al.</i>, 2005).</p>

Sebatian bioaktif daripada marin atau produk semulajadi marin merupakan sebatian organik yang dihasilkan oleh mikroorganisma marin, span marin, alga marin dan organisma marin lain. Sebatian metabolit sekunder yang disintesis oleh organisma marin ini dengan tujuan untuk melindungi diri sendiri dan mengekalkan tahap homeostasis di dalam tubuhnya supaya dapat menyesuaikan diri dalam keadaan persekitaran yang sentiasa berubah.

Menurut Harvey (2000), hanya 10% daripada 25 000 jenis tumbuhan dikaji tentang aktiviti biologinya. Lebih daripada 80% daripada jumlah spesies tumbuhan dan haiwan di dunia berasal dari laut (McCarthy & Pomponi, 2004). Sejak kebelakangan ini, banyak sebatian yang bersifat bioaktif telah diekstrakkan daripada pelbagai invertebrat marin seperti tunikat, bryozoa dan mikroorganisma marin (Donia & Hamann, 2003; Haefner, 2003). Span (37%), selenterat (21%), dan mikroorganisma (18%) merupakan sumber utama dalam menghasilkan sebatian yang bersifat bioaktif diikuti dengan alga (9%), ekinoderma (6%), tunikat (6%), moluska (2%), bryozoa (1%) dan lain-lain lagi (Blunt *et al.*, 2004).

Jadual 1.4 menunjukkan keputusan laporan mengenai penyelidikan praklinikal terhadap aktiviti antibakteria, antikoagulan, antikulat, antihelmin, antiplatelet, antiprotozoa atau antivirus daripada 30 jenis sebatian marin yang diperolehi daripada 4 jenis kumpulan organisma marin. Fakta yang menarik perhatian daripada Jadual 1.4 ialah span marin mampu menghasilkan 10 jenis sebatian manakala 20 jenis sebatian yang lain dihasilkan oleh batu karang, siput marin, kupang, selenterat, timun laut, tunikat, kulat, alga marin

Jadual 1.4: Sebatian marin yang menunjukkan aktiviti antibakteria, antikoagulan, antikulat, antihelmin, antiplatelet, antiprotozoa dan antivirus. (Sumber: Mayer & Lehmann, 2000)

Kelas Drug	Nama Sebatian	Organisma	Kelas Kimia	Rujukan
Antibakteria	Flexibilid / Sinulariolid	Batu karang	Diterpenoid	Aceret <i>et al.</i> , 1998.
	Asid Heksadekenoid	Sintetik	Asid lemak	Carballeira <i>et al.</i> , 1998.
	Indolequinon	Siput	Indol	Fukuyama <i>et al.</i> , 1998.
	Lektin	Kupang	Protein	Tunkijjanukij & Olafsen, 1998.
Antikoagulan	Halisulfat / Suvanin	Span	Terpenoid	Kimura <i>et al.</i> , 1998.
	Kondroitin	Timun laut	Polisakarida	Mourao <i>et al.</i> , 1998.
Antikulat	Polilaktone Lipodepsipeptida	Kulat	Poliketida Depsipeptida	Abbanat <i>et al.</i> , 1998.
	Siklolithistida A	Span	Depsipeptida	Clark <i>et al.</i> , 1998.
	Loban	Batu karang	Diterpenoid	Edrada <i>et al.</i> , 1998.
	Dolastatin 10	Tunikat	Peptida	Pettit <i>et al.</i> , 1998.
	Spongistatin	Span	Makrolida	Pettit <i>et al.</i> , 1998.
	Lipodepsipeptida	Kulat	Depsipeptida	Schlingmann <i>et al.</i> , 1998.
	Akanthosterol	Span	Sterol	Tsukamoto <i>et al.</i> , 1998.
Antihelmin	Tetrahidrofuran	Alga perang	Asid lemak	Capon <i>et al.</i> , 1998a.
	Kondriamida C	Alga merah	Indol	Davyt <i>et al.</i> , 1998.

Jadual 1.4: Sambungan.

Kelas Drug	Nama Sebatian	Organisma	Kelas Kimia	Rujukan
Antiplatelet	Mikalolida-B	Span	Makrolida	Sugidachi <i>et al.</i> , 1998.
Antimalaria	Papuanolat	Span	Terpenoid	D' Ambrosio <i>et al.</i> , 1998.
	Bistramida	Tunikat	Amino	Gautret <i>et al.</i> , 1998.
	Kalihinol A	Span	Diterpenoid	Miyaoka <i>et al.</i> , 1998.
Antiplasmodia	Oroidin	Span	Pyrrol	Konig <i>et al.</i> , 1998.
Antivirus	Didemnaketol	Tunikat	Polisakarida kompleks	Fan <i>et al.</i> , 1998.
	Frondosin	Span	Terpenoid	Hallock <i>et al.</i> , 1998.
	Polisakarida bersulfat	Alga perang	Polisakarida	Hoshino <i>et al.</i> , 1998.
	Gimmokrom D	Selenterat	Poliketida kompleks	Laille <i>et al.</i> , 1998.
	Sianovirin-N	Bakteria	Protein	Mori <i>et al.</i> , 1998.
	Adosiavirin	Span	Protein	O'Keefe <i>et al.</i> , 1998.
	Sulfoquinovosil diacilgliserol	Alga merah	Asid lemak	Ohta <i>et al.</i> , 1998.

dan sianobakteria. Produk semula jadi marin yang disenaraikan dalam Jadual 1.4 mewakili 4 kelas kimia iaitu poliketida, terpenoid, sebatian bernitrogen dan polisakarida. Walaupun kajian farmakologi praklinikal mengelaskan sebatian marin yang disenaraikan dalam Jadual 1.4 dibahagikan kepada beberapa kelas drug, iaitu antibakteria, antikoagulan, antikulat, antihelmin, antiplatelet, antiprotozoa atau antivirus, tetapi kajian mengenai mekanisme tindakan drug tersebut tidak dilaporkan dengan lebih lanjut.

1.5.1 Mikroorganisma marin

Bermula dengan penemuan Penisilin pada tahun 1929 hingga memperolehi Taq DNA daripada *Thermus aquaticus* pada tahun 1989, hampir 50 000 produk semula jadi diperolehi daripada mikroorganisma. Lebih 10 000 daripada produk ini dilaporkan mempunyai aktiviti biologi dan kebanyakkan digunakan sebagai antibiotik (Carte, 1996).

Rosenfeld dan Zobell (1947) berjaya menunjukkan bahawa bakteria marin berupaya menghasilkan sebatian antimikrob. Selain itu, Burkholder dan rakan-rakannya juga berjaya memencilkan sejenis bakteria daripada permukaan *Thalassia*, rumpai laut yang tumbuh di laut Caribbean (Burkholder *et al.*, 1966). Metabolit yang dihasilkan oleh bakteria ini telah dikenal pasti dan menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap bakteria Gram positif secara *in vitro* (Lovell, 1966). Namun demikian, metabolit ini tidak menunjukkan sebarang aktiviti terhadap bakteria Gram negatif.

Kajian yang dijalankan oleh Scripps telah menunjukkan bahawa bakteria marin berupaya menghasilkan sebatian bioaktif yang tidak terdapat pada bakteria daratan (Fenical, 1993). Selain itu, beberapa kajian juga menunjukkan bahawa toksik marin seperti terodotoxin, saxitoxin, ciguatoxin dan brevetoxin yang dihasilkan oleh mikroorganisma marin memainkan peranan yang penting dalam bidang farmokologi (Kodama *et al.*, 1988; Simudu *et al.*, 1990).

Mikroorganisma marin masih kurang mendapat perhatian jika dibandingkan dengan mikroorganisma daratan walaupun para penyelidik berjaya memperolehi antibiotik daripada mikroorganisma. Masalah utama yang menghalang para penyelidik mendapatkan metabolit daripada mikroorganisma marin ialah kebanyakan mikroorganisma marin ini sangat sukar dikulturkan di dalam makmal (Hugenholtz & Pace, 1996).

1.5.2 Span marin

Sumber marin semula jadi mula menjadi pilihan para penyelidik dalam usaha untuk mendapatkan drug baru pada 4 dekad yang lepas. Sehingga kini, lebih daripada 5000 jenis sebatian yang berbeza telah berjaya dipencilkan daripada lebih kurang 500 spesies span marin (Muller *et al.*, 2004).

Lebih kurang 10 000 span yang telah dikenali di dalam dunia ini kebanyakan hidup di dalam laut. Metabolit yang bersifat bioaktif telah berjaya diperolehi daripada 11 genus (Proksch *et al.*, 2003). Tiga genus daripada 11 genus ini iaitu *Haliclona*, *Petrosia* dan *Discodemia* menghasilkan agen

antikanser dan antiinflamasi yang amat berguna (Blunt *et al.*, 2004). Namun demikian, cara untuk mengkulturkan span marin ini tidak dikaji dengan lebih mendalam.

1.5.3 Invertebrata marin

1.5.3.1 Selenterat (filum Cnidaria)

Penemuan prostaglandin daripada bunga karang pada akhir 1960-an telah memberi galakan dalam pembangunan bidang produk semula jadi marin (Carte, 1996). Metabolit bersifat antibakteria telah berjaya dipencilkan daripada *Lobophytum crassum* (bunga karang) melalui bioasai berperingkat (Vanisree & Subbaraju, 2002).

1.5.3.2 Moluska

Lebih daripada 2600 kajian saintifik telah dijalankan pada 20 tahun yang lepas untuk mengkaji kepentingan toksik yang diekstrak daripada moluska agar toksik ini dapat digunakan dalam bidang perubatan. Hingga sekarang, hanya sebahagian kecil toksik berjaya diekstrakan dan dianalisiskan (Pickrell, 2003). Chromodorolide-A yang dipencilkan daripada *Chromocloris cavae* menunjukkan aktiviti antimikrob secara *in vitro* dan aktiviti sitotoksik yang baik (Morris *et al.*, 1990).

1.5.3.3 Krustasia

Beberapa krustasia termasuk udang kara, ketam dan udang telah didapati berupaya menunjukkan aktiviti antibakteria oleh beberapa penyelidik (Schwab *et al.*, 1966; Stewart & Zwicker, 1972; Chisholm & Smith, 1992; Chisholm & Smith, 1995; Noga *et al.*, 1996a; Ueda *et al.*, 1996; Jayasankar & Subramoniam, 1999; Sritunyalucksana *et al.*, 1999; Alabi *et al.*, 2000). Namun demikian, faktor antimikrob krustasia yang bersifat semula jadi ini masih belum diketahui lagi. Hanya sebahagian sebatian telah berjaya dikenalpasti. Sejenis lektin antimikrob yang bernama scyllin telah berjaya diperolehi daripada sejenis ketam, *Scylla serrata* oleh Chattopadhyay *et al.* (1996).

Peptida yang bersifat antibakteria juga berjaya diperolehi daripada dua jenis ketam, iaitu *Carcinus maenas* (Schnapp *et al.*, 1996) dan *Callinectes sapidus* (Khoo *et al.*, 1999) serta daripada sejenis udang, iaitu *Penaeus vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997). Peptida-peptida tersebut dipercayai memainkan peranan yang penting dalam memberi perlindungan dalam semua organisma hidup, termasuk bakteria, tumbuhan, invertebrata dan vertebrata (Boman, 1995). Di samping itu, ekstrak daripada empat jenis krustasia marin iaitu *Pandalus borealis* (udang), *Pagurus bernhardus* (ketam), *Hyas araneus* (ketam) and *Paralithodes camtschatica* (ketam) juga didapati menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Corynebacterium glutamicum* and *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* (Haug *et al.*, 2002).