

**Kertas Asli/Original Article**

**Aktiviti Antibakteria Ekstrak *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach  
ke Atas Bakteria Gram Positif dan Negatif**

(Antibacterial Activity of *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach Extracts against  
Gram Positive and Negative)

NURAMIRA AZIZAN, NIHAYAH MOHAMAD & AHMAD ZORIN SAHALAN

ABSTRAK

Bunga *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach merupakan salah satu jenis tumbuhan liar boleh ditemui di hutan tanah rendah di Semenanjung Malaysia dan digunakan secara meluas dalam ubatan tradisional. Objektif utama dalam kajian ini adalah untuk menguji keberkesanan ekstrak tumbuhan ini sebagai agen aktiviti antibakteria. *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach dieskrak dengan menggunakan tiga kaedah pengekstrakan berperingkat iaitu petroleum eter (PE) diikuti dengan etil asetat (EA) dan berakhir dengan etanol. Kesemua ekstrak ini kemudiannya diuji terhadap beberapa bakteria ujian iaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella typhimurium* dengan menggunakan kaedah resapan telaga. Hasil keputusan menunjukkan ekstrak etil asetat dan etanol mempunyai kesan perencatan bakteria yang baik, manakala ekstrak petroleum eter langsung tidak menunjukkan sebarang aktiviti antibakteria. Hasil kajian juga mendapati bahawa ekstrak etil asetat lebih ketara merencat kesemua bakteria yang diuji berbanding dengan ekstrak ethanol. Dua ujian lain yang dijalankan iaitu ujian penentuan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) dan nilai kepekatan minimum bakterisidal (MBC) didapati menyokong keputusan ujian kaedah resapan telaga di mana nilai MIC yang diperolehi bagi ekstrak etil asetat adalah lebih rendah iaitu dalam julat 6.25 hingga 12.5 mg/ml dan nilai MBC pula dalam julat 25.0 hingga 50.0 mg/ml berbanding ekstrak etanol dengan nilai MIC yang lebih besar iaitu dalam julat 25.0 hingga 50.0 mg/ml dan nilai MBCnya adalah 100.0 mg/ml.

**Kata kunci:** *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach, petroleum ether, ethyl acetate, ethanol, antibacterial MIC, MBC

ABSTRACT

*Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach is a wild plant found in lowland Peninsular of Malaysia and used widely in traditional medicines. The main objective is to screen antibacterial activity of *Rafflesia cantleyi* extract. The plant was extracted with cold extraction involving three stages of extraction with solvents such as petroleum ether, ethyl acetate and finally ethanol. All extracts were tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium* using well diffusion method. As a result, ethyl acetate and methanol extract showed antibacterial inhibition against tested bacteria whereas petroleum ether failed to show any. Most bacteria are more susceptible to ethyl acetate compared to ethanol extract. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Microdilution test and minimum bactericidal concentration (MBC) was carried out on both of the extract. Ethyl acetate extract has MIC ranging between 6.25 – 12.5 mg/ml and MBC between 25.0 – 50.0 mg/ml. Ethanolic extract has much higher MIC and MBC value, which ranges between 25.0mg/ml to 50.0 mg/ml for its MIC and has the MBC of 100.0 mg/ml.

**Keywords:** *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach, petroleum ether, ethylacetate, ethanol, antibacterial MIC, MBC

PENGENALAN

Hutan hujan tropika dengan ciri-ciri seperti taburan hujan yang mencukupi dan suhu yang sesuai biasanya boleh ditemui di negara-negara beriklim tropika di benua Asia seperti Malaysia dan Indonesia. Pelbagai kajian telah dijalankan untuk membuktikan bahawa lebih banyak tumbuhan bersumberkan hutan hujan tropika yang mempunyai kualiti *materia medica* dapat diterokai dan seterusnya dibangunkan sebagai ubat atau penawar

bagi pelbagai jenis penyakit akut, kronik atau berjangkit termasuklah berperanan dalam kemoterapi antimikrob sama ada bersifat antibakteria, antiparasit atau antikulat.

Bunga *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach yang merupakan salah satu jenis tumbuhan liar boleh ditemui di hutan tanah rendah di Semenanjung Malaysia. *Rafflesia* merupakan tumbuhan parasit obligat (Nickrent & Musselman 2004). Ia tumbuhan berbunga yang tidak berakar dan tidak boleh menjalankan fotosintesis serta besar dengan berukuran 30 cm hingga 55 cm lebar.

Rupa bunga *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach adalah ia mempunyai bintil-bintil putih yang halus di kelopak bunganya (Jamili Nais 2001).

Tumbuhan ini dipercayai telah digunakan untuk tujuan perubatan tradisional sejak turun-temurun oleh masyarakat orang asli dan tempatan di kawasan-kawasan pedalaman negara ini (Baily et al. 1989). Pucuknya telah digunakan untuk menghentikan pendarahan dalaman dan pengecutan rahim selepas bersalin oleh kaum ibu. Manakala untuk lelaki, air rebusan pucuk digunakan sebagai penguat tenaga batin (Kanchanapoom et al. 2007).

Walaupun terdapat beberapa kajian saintifik yang aktif dijalankan untuk tumbuhan ini, namun penggunaannya sebagai agen antibakteria serta aktiviti khusus dalam menggunakan ekstrak bunga *Rafflesia cantleyi* untuk perencatan bakteria dan fungus maupun protozoa patogen masih kurang.

Justeru itu satu kajian untuk melihat potensi penggunaannya sebagai bahan antimikrobial dilakukan dalam kajian ini. Kajian awalan di sini adalah untuk melihat keberkesannya merencat atau memusnahkan bakteria patogen biasa seperti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*.

Tahap keberkesanan ekstrak pula diterjemah dengan cara mengkaji nilai kepekatan perencatan minimumnya (MIC) ekstrak-ekstrak *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach yang juga disokong oleh nilai kepekatan bakterisidal minimumnya (MBC). Nilai ini membantu penyelidik untuk memahami tahap kepekatan ekstrak yang perlu untuk memerencat atau memusnahkan bakteria patogen yang ada. Secara amnya kepekatan MIC dan MBC yang terlalu tinggi biasanya akan mengurangkan potensi penggunaan bahan ini sebagai agen antibakteria dan sebaliknya.

## BAHAN DAN KAEDAH

### *RAFFLESIA CANTLEYI* SOLMS-LAUBACH

Bunga *Rafflesia cantleyi* telah dikutip daripada Taman Hutan Belum di Hulu Perak dengan kebenaran Jabatan Hutan Malaysia. Taman hutan Belum ini meliputi keluasan 290,000 hektar dengan 146,000 hektar merupakan hutan dara. Ia merangkumi kawasan dari sempadan Malaysia-Thai dan merangkumi keseluruhan kawasan hutan Temenggor di Perak.

### PENGEKSTRAKAN TUMBUHAN KAJIAN

Teknik pengekstrakan yang digunakan adalah kaedah rendaman sejuk. Proses pengekstrakan *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach melibatkan 3 jenis pelarut yang dijalankan secara berterusan mengikut tertib menaik darjah kepolaran setiap pelarut bermula dengan pelarut tak polar iaitu petroleum eter (PE) diikuti dengan pelarut semipolar iaitu etil asetat (EA) dan berakhir dengan pelarut polar iaitu etanol (Et) (Lalitha 2008).

Sebanyak 100 g sampel tumbuhan kajian yang telah kering dan dikisar halus dicampurkan dengan satu liter petroleum eter segar di dalam kelalang. Sampel diletakkan pada suhu bilik (27°C) di atas pengacau bermagnet selama 2 hari berturut-turut untuk memastikan proses pengekstrakan yang sempurna berlaku.

Selepas dua hari, larutan dituras menggunakan kertas turas Whatman No. 1 dan hasil turasan bunga dipekat dengan menyejatkan hingga kering larutan turasan di dalam rotawap bervakum pada suhu 37°C. Kemudian hasil ekstrak ini dibiarkan di pengering beku untuk dikeringkan dengan sempurna menjadi serbuk bagi mendapatkan hasil ekstrak yang lebih pekat, stabil dan bersih daripada pelarut.

Kaedah yang sama diulang untuk proses pengekstrakan menggunakan pelarut ekstrak semipolar iaitu etil asetat dan pelarut polar iaitu etanol.

### KULTUR BAKTERIA

Kultur bakteria diperolehi daripada stok bakteria Makmal Jabatan Sains Bioperubatan, Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu (FSKB), Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Kampus Kuala Lumpur. Strain bakteria yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella typhimurium*.

### UJIAN PENYARINGAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA, MIC DAN MBC

Hasil daripada pengekstrakan dilarutkan dalam pelarut yang ditetapkan, khasnya seperti pengekstrakan petroleum eter dan etil asetat, hasil ekstrak dilarutkan didalam 8% DMSO, manakala untuk ekstrak etanol pula, produk hasilnya dilarutkan dalam air suling. Semua kerja dilakukan secara teknik aseptik. Plat agar Mueller-Hinton diinokulasi dengan bakteria berkepekatan  $10^8$  CFU/ml. Sebanyak 5 lubang telaga dibuat pada satu plat agar dan dimasukkan 50 µl ekstrak ke dalam telaga masing-masing. Kawalan positif yang digunakan adalah antibiotik *Gentamicin*. Kesemua plat agar dieram selama 18 hingga 24 jam dalam inkubator dengan kelembapan yang optimum pada suhu 37°C.

Selepas tempoh pemerhatian, pemerhatian dibuat ke atas plat agar dan zon perencatan diukur dan dicatat. Jika hasil yang diperolehi positif (terdapat kehadiran zon perencatan), sampel diteruskan dengan ujian perencatan minimum (MIC). Kaldu Muller Hinton digunakan dalam ujian ini. Nilai MIC ekstrak ini ditentukan dengan menggunakan kaedah plat mikrotiter pencairan berperingkat. Kepekatan ekstrak adalah antara 100 mg/ml sehingga 0.391 mg/ml iaitu dengan menggunakan sebanyak sembilan peri mikrotiter (Jorgensen & Turnidge 2003).

Kepekatan bakterisidal minimum (MBC) ditentukan dengan menitiskan kultur yang tidak menunjukkan kekeruhan pada ujian MIC ke atas agar Mueller-Hinton. Plat dieram pada 37°C dan bacaan dicatat pada keesokan harinya.

## HASIL

### HASIL PENYARINGAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA EKSTRAK *RAFFLESIA CANTLEYI* SOLMS LAUBACH MENGGUNAKAN KAEDAH RESAPAN TELAGA

Keputusan yang diperolehi daripada ujian penyaringan kehadiran aktiviti antibakteria ekstrak petroleum eter (PE), etil asetat (EA) dan etanol (Et) *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach menggunakan kaedah resapan telaga ke atas

empat jenis bakteria kajian iaitu *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* dan *S. typhimurium* ditunjukkan dalam Jadual 1.

### NILAI MIC DAN MBC UNTUK EKSTRAK ETIL ASETAT DAN ETHANOL *RAFFLESIA CANTLEYI* SOLMS-LAUBACH

Nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) dijalankan ke atas keempat-empat bakteria kajian pada ekstrak yang terlibat iaitu etil asetat (EA) dan etanol (Et) Jadual 2.

JADUAL 1. Diameter zon perencatan ekstrak petroleum eter (PE), etil asetat (EA) dan etanol (Et) *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach terhadap bakteria Gram positif dan bakteria Gram negatif

Bakteria	Diameter zon perencatan <sup>Δ</sup> (mm)				
	PE	Ekstrak EA	Et	Kawalan Positif*	Negatif <sup>#</sup>
<i>S. aureus</i>	-	17.0 ± 1.0	12.0 ± 2.0	20.0 ± 1.0	-
<i>S. epidermidis</i>	-	13.0 ± 3.0	12.0 ± 4.0	19.0 ± 1.0	-
<i>E. coli</i>	-	18.0 ± 2.0	13.0 ± 3.0	20.0 ± 1.0	-
<i>S. typhimurium</i>	-	14.0 ± 1.0	11.0 ± 0	19.0 ± 1.0	-

Petunjuk:

<sup>Δ</sup> Nilai purata ± SEM dengan tiga kali ulangan (*Standard Error of Mean*).

\* Kawalan positif (cakera antibiotik *Gentamicin*).

<sup>#</sup> Kawalan negatif (50 µl larutan PBS 0.1 M pH 7.3).

Kawalan negatif (50 µl larutan DMSO 8%).

- Tiada zon perencatan

JADUAL 2. Nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) ekstrak etil asetat *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach

Bakteria	Nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) (mg/ml)			
	Ekstrak EA	Ekstrak Et	Kawalan Positif*	Negatif <sup>#</sup>
<i>S. aureus</i>	6.25	25.0	+	-
<i>S. epidermidis</i>	12.5	50.0	+	-
<i>E. coli</i>	6.25	25.0	+	-
<i>S. typhimurium</i>	12.5	25.0	+	-

Petunjuk:

\* Kawalan positif (50 µl kaldu Mueller-Hinton + 50 µl inokulum bakteria)

<sup>#</sup> Kawalan negatif (100 µl kaldu Mueller-Hinton dan 100 µl larutan ekstrak)

+ Kehadiran pelet atau pertumbuhan bakteria

- Ketidakhadiran pelet atau pertumbuhan bakteria

Ujian lanjutan seterusnya adalah ujian penentuan nilai kepekatan bakterisidal minimum (MBC) yang dijalankan setelah ujian penentuan nilai MIC dijalankan di mana ujian ini akan menggunakan sampel daripada ujian tersebut.

JADUAL 3. Nilai kepekatan bakterisidal minimum (MBC) ekstrak etil asetat dan ethanol *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach

Bakteria	Nilai Kepekatan Bakterisidal Minimum (MBC) (mg/ml)	
	Ekstrak EA	Ekstrak Eth
<i>S. aureus</i>	25.0	100
<i>S. epidermidis</i>	25.0	100
<i>E. coli</i>	50.0	100
<i>S. typhimurium</i>	25.0	100

## PERBINCANGAN

Keputusan ujian yang dilakukan menunjukkan bahawa ekstrak etil asetat dan etanol *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach, kedua-duanya mempamerkan aktiviti antibakteria yang lebih konsisten dan berpotensi untuk merencat pertumbuhan bakteria. Ini adalah berdasarkan kepada keputusan ujian penyaringan yang menunjukkan kewujudan diameter zon perencatan yang signifikan ekstrak etil asetat dan etanol ekstrak *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach. Kawalan positif *Gentamicin* (10 µg/ml), menunjukkan bahawa bakteria yang digunakan dalam kajian adalah mampu direncat dan bukannya merupakan strain rintang antibiotik.

Hasil uji kaji penyaringan ini juga menunjukkan bahawa bahan aktif daripada ekstrak etil asetat dan metanol ini mampu merencat kedua-dua jenis bakteria

iaitu Gram positif (*S. Aureus* dan *S. epidermidis*) dan negatif (*E. coli* dan *S. typhimurium*). Ini menunjukkan bahan antibakteria ini mempunyai spektrum yang luas. Pengenalpastian identiti bahan aktif masih lagi awal untuk dikenal pasti, namun secara amnya terdapat dua komponen aktif didalam ekstrak *Rafflesia cantleyi* ini. Komponen pertama aktif antibakteria adalah daripada bahan semi polar. Ianya di pencil atau diekstrak daripada pengkstrakan yang menggunakan etil asetat (Atish et al. 2008). Komponen yang kedua adalah dipencil daripada pengekstrakan menggunakan etanol. Komponen ini bersifat larut air atau lebih dikenali sebagai komponen berpolar. Oleh kerana di dalam tumbuhan terlalu banyak komponen semipolar dan berpolar ini, maka untuk mengesan identiti komponen ini secara khusus adalah sukar dan memerlukan kajian yang lebih lanjut.

Ekstrak petroleum eter pula tiada memberikan sebarang pembentukan zon perencatan untuk semua bakteria yang dikaji. Hasil kajian menunjukkan bahan tidak polar atau komponen larut lipid *Rafflesia cantleyi* bukan merupakan komponen aktif dalam perencatan bakteria.

Nilai MIC yang diperoleh dinilai secara kuantitatif menunjukkan nilai MIC ekstrak etil asetat *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach lebih rendah berbanding ekstrak etanol *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach. Kesimpulan awal yang boleh dibuat berkaitan ujian MIC ini ialah pada kepekatan yang serendah 6.25 mg/ml, ekstrak etil asetat *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach mampu merencat pertumbuhan bakteria kajian tetapi tidak bagi ekstrak etanol *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach yang nyata memerlukan kepekatan yang tinggi untuk bertindak sebagai agen bakteriostatik atau bakterisidal. Berdasarkan kepada nilai MIC yang diperolehi, komponen yang bersifat semi polar ini adalah tiga kali ganda jauh lebih aktif berbanding dengan koponen larut airnya. Namun begitu kedua-dua bahan ini masih menunjukkan potensi yang baik untuk digunakan sebagai antibakteria kerana kepekatan MIC adalah masih rendah dan tidak mencapai nilai ratusan mg/ml. Keputusan kepekatan minimum bakterisidal (MBC) juga menunjukkan aktiviti bakterisidal ekstrak etil asetat *Rafflesia cantleyi* berlaku pada nilai MBC yang lebih rendah daripada ekstrak etanolnya.

## KESIMPULAN

Ujian penyaringan aktiviti antibakteria ekstrak *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach menggunakan kaedah resapan telaga menunjukkan komponen semi polar dari ekstrak etil asetat dan komponen larut air dari pengekstrakan etanol mempunyai aktiviti antibakteria yang baik. Namun aktiviti antibakteria tiada pada ekstrak petroleum eter.

Nilai MIC dan MBC didapati menyokong keputusan ujian kaedah resapan telaga di mana nilai MIC yang diperolehi bagi ekstrak etil asetat adalah lebih rendah iaitu dalam julat 6.25 hingga 12.5 mg/ml dan nilai MBC pula dalam julat 25.0 hingga 50.0 mg/ml berbanding ekstrak etanol dengan nilai MIC yang lebih besar iaitu dalam julat

25.0 hingga 50.0 mg/ml dan nilai MBC adalah 100.0 mg/ml. Secara amnya, komponen aktif semi polar dan komponen larut air di dalam *Rafflesia cantleyi* Solms-Laubach boleh digunakan di dalam usaha untuk memerencat pertumbuhan bakteria atau jangkitan bakteria.

## PENGHARGAAN

Setinggi penghargaan diucapkan kepada penyumbang gran penyelidikan ini yang diketuai oleh Dr. Nihayah Mohamed (UKM-NN-03-FRGS0003-2006). Selain itu juga jutaan terima kasih diucapkan kepada pelajar PhD. dan semua kakitangan makmal Jabatan Sains Bioperubatan khususnya Cik Nor Shafurah Mohd Sha, En. Jamil Rafei, Pn. Maria, Pn. Aznida dan En. Masumi.

## RUJUKAN

- Atish T. Paula, Sanjay Vira, & Bhutani, K.K. 2008. Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum* and effect of different extraction methods on their content. *Journal of Chromatography A*. 1208(1-2): 141-146.
- Bailey, R.C., Head, G., Jenike, M., Owen, B., Rechtman, R. & Zechenter, E. 1989. Hunting and gathering in tropical rainforest: is it possible. *American Anthropologist* 91(1): 59-82.
- Barkman, T.J., Lim, S.H., Salleh, K.M. & Nais, J. 2004. Mitochondrial DNA sequences reveal the photosynthetic relatives of *Rafflesia*, the world's largest flower. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101(3): 787-792.
- Jamili Nais. 2001. *Rafflesia of the World*. Sabah: Sabah Parks.
- Kanchanapoom, T., Kamel, M.S., Picheansoonthon, C., Luecha, P., Kasai, R. & Yamasaki K. 2007. Hydrolyzable tannins and phenylpropanoid from *Rafflesia kerrii* Meijer (Rafflesiaceae). *J. Nat. Med.* 61: 478-479.
- Jorgensen, J.H. & Turnidge, J.D. 2003. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. Dlm. *Manual of Clinical Microbiology*, disunting oleh Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pealler, M.A. & Yolekn, R.H. Ed. Ke-8. Washington: ASM Press.
- Lalitha, M.K. 2008. *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Tamil Nadu: Christian Medical College.
- Nickrent, D.L. & Musselman, L.J. 2004. Introduction to parasitic flowering plants. *The Plant Health Instructor* 10(1094): 330-01.

Nuramira Azizan, Nihayah Mohamad & Ahmad Zorin Sahalan  
Department of Biomedical Science  
Faculty of Allied Health Sciences  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz  
50300 Kuala Lumpur  
Malaysia

Correspondence author: Ahmad Zorin Sahalan  
Email address: zorin@medic.ukm.my  
Tel: 603-92897175, Fax: 603-26929032

Received: September 2010  
Accepted for publication: November 2010