

Interaksi Gal *Quercus infectoria* dengan Vankomisin terhadap *Staphylococcus aureus* yang Kurang Kerentanan Terhadap Vankomisin

(Interaction of *Quercus infectoria* Gall's Extract and Vancomycin Against *Staphylococcus aureus* with Reduce Susceptibility to Vancomycin)

NORZAWANI JAFFAR, DAYANG FREDALINA BASRI* & NORAZIAH M. ZIN

ABSTRAK

Staphylococcus aureus tahan Methicillin (MRSA) adalah patogen yang mudah tersebar dan cenderung untuk menjadi multi-rintang terhadap hampir semua terapi antibiotik yang terdapat di pasaran kini. Gal daripada *Quercus infectoria* atau lebih dikenali sebagai manjakani di Malaysia telah diketahui mempunyai aktiviti anti-bakteria. Tujuan kajian ini adalah untuk mengkaji kesan kombinasi ekstrak gal daripada *Q. infectoria* dengan vankomisin terhadap lima strain MRSA dan dua strain Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA). Proses pengekstrakan dilakukan menggunakan pelarut aseton, metanol dan akues. Teknik mikro pencairan bersiri kaldu dijalankan menggunakan plat telaga 96 bagi menentukan nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Kesan interaksi di antara gal *Q. infectoria* dengan vankomisin dikaji menggunakan teknik checkerboard bagi mendapatkan nilai indek Fractional Inhibitory Concentration (FIC). Hasil kombinasi ekstrak gal dan vankomisin menunjukkan terdapat aktiviti yang sinergi pada ekstrak aseton terhadap MRSA ATCC 43300 (0.3124), Sa7 (0.3750) dan VISA U9495 (0.3750), manakala ekstrak akues terhadap MRSA Sa7 (0.4167) dan VISA U9495 (0.3958) dan N316 (0.5000). Sebaliknya kombinasi metanol dan vankomisin menunjukkan kesan yang sinergi terhadap ATCC 49476 (0.3750) sahaja manakala aditif terhadap enam lagi strain MRSA yang diuji. Kesan interaksi ini menunjukkan potensi dan kepentingannya dalam pembangunan dan modifikasi agen anti-MRSA.

Kata kunci: Anti-MRSA; gal *Quercus infectoria*; vankomisin

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a versatile pathogen widespread, and tend to be multi-resistant towards almost all of currently available antibiotics. The gall of *Quercus infectoria* or locally known as manjakani in Malaysia was known to have antibacterial activity. The aim of this study was to evaluate the interaction effect of *Q. infectoria* gall extract with vancomycin against five MRSA strains and two Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strains. The extracts were prepared using acetone, methanol and aqueous. The microbroth serial dilution technique was employed using 96-well microtiter plate for determination of MIC values. The effect of interaction between *Q. infectoria* gall extract and vancomycin was evaluated using the checkerboard method to obtain the Fractional inhibitory concentration (FIC) index value. The extracts combination with vancomycin displayed synergism for acetone extract against MRSA ATCC 43300 (0.3124), Sa7 (0.3750) and VISA U9495 (0.3750), while aqueous extract were synergistic against MRSA Sa7 (0.4167) and VISA U9495 (0.3958) and N316 (0.5000). On the other hand, vancomycin combination with methanol only exhibited synergistic effect towards ATCC 49476 (0.3750) but additive against 6 other strains tested. This interaction effect showed their potential and importance in development or modification of drugs against MRSA.

Keywords: Anti-MRSA; *Quercus infectoria* gall; vancomycin

PENGENALAN

Staphylococcus aureus adalah salah satu patogen utama yang berkaitan dengan kedua-dua infeksi nosokomial dan perolehan komuniti di seluruh dunia. Ia menyebabkan bakteremia, infeksi bahagian pembedahan, pneumonia dan lain-lain infeksi nosokomial (Kuehnert et al. 2005). MRSA menyebabkan jangkitan serius dengan kadar mortaliti dan morbiditi yang tinggi beserta peningkatan bilangan strain bakteria yang mempamerkan kerentanan terhadap metisilin atau oksasilin. Strain-strain ini diistilahkan sebagai *Staphylococcus aureus* tahan Methicillin (MRSA) walaupun metisilin bukan lagi menjadi dadah pilihan dalam

perawatan infeksi yang disebabkan oleh MRSA. Ianya mempamerkan kerentanan terhadap hampir semua dadah β -laktam seperti penisilin, sefalosporin, karbapenem dan kombinasi dengan perencat beta laktamase.

Center for Disease Control and Prevention (CDC) melaporkan bahawa sebanyak 59.5% dari seluruh unit kesihatan di Amerika Syarikat yang berasosiasi dengan infeksi *S. aureus* adalah disebabkan oleh MRSA (NNIS 2004). Kadar infeksi aliran darah melibatkan pencilan MRSA juga dilaporkan telah meningkat daripada 22% pada tahun 1995 kepada 57% pada tahun 2001 (Wisplinghoff et al. 2004). Disepakati bahawa persekitaran juga memainkan peranan

penting dalam infeksi dan kontaminasi MRSA. Ianya boleh didapati di seluruh hospital haiwan, di atas permukaan lantai, di kawasan kontak oleh kakitangan hospital dan di kawasan kontak oleh pesakit (Loeffler et al. 2005, Oie et al. 2002; Sexton et al. 2005; Weese et al. 2004). Kini vankomisin dan lain-lain antibiotik glikopeptida masih lagi digunakan dalam terapi perawatan infeksi MRSA.

Pada Mei 1996, kes infeksi *Vancomycin-intermediate S. aureus* (VISA) pertama telah didokumenkan pada pesakit-pesakit di Jepun. Kemudian, kes penemuan VISA mula meningkat di Eropah, Asia dan Amerika Syarikat (CDC 2006). Kerentanan terhadap vankomisin menjadi masalah dalam dunia perubatan moden dan menyebabkan rawatan terhadap MRSA menjadi lebih mencabar kepada ahli perubatan. Produk semula jadi telah menunjukkan kepelbagaian potensi terhadap bakteria yang patogen. Produk dari tumbuhan dipercayai mampu bergandingan dengan antibiotik sedia ada untuk mempamerkan aktiviti anti-bakteria yang sinergi dan sangat berguna untuk perawatan infeksi melalui kaedah terapi kombinasi.

Oleh yang demikian dalam kajian ini, gal daripada *Quercus infectoria* Oliv. (Fagaceae) atau nama tempatannya manjakani diketengahkan untuk diuji potensinya sebagaimana yang dilaporkan mempunyai kesan antimikrob yang signifikan terhadap MRSA (Dayang & Fan 2004; Dayang et al. 2005a, 2005b). Tumbuhan ini tumbuh rendah dengan ketinggian sehingga 1.8 m. Gal terhasil daripada aktiviti sejenis serangga penyengat iaitu *Adleria gallae-tinctoria* yang mendeposisikan telurinya di bahagian-bahagian pokok *Q. infectoria* (Samuelsson 1999). Gal daripada *Q. infectoria* ini sangat astringen dan digunakan dalam amalan perubatan tradisional untuk merawat diare kronik, disenteri, pendarahan, leukorea, impetigo dan ekzema (Supayang et al. 2008).

BAHAN DAN KAEDAH

STRAIN BAKTERIA

Sebanyak tujuh strain MRSA yang digunakan di dalam kajian ini iaitu tiga strain rujukan (ATCC 33591, ATCC 49476, dan ATCC 43300), satu strain aruhan makmal; Sa7 dan tiga isolat klinikal (HUKM (sampel darah), N316 (sampel urin) dan U9495 (sampel nanah)) daripada Institut Penyelidikan Perhutanan Malaysia (FRIM). Semua strain bakteria disimpan di atas agar nutrien condong.

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)

Nilai MIC bagi vankomisin dan ekstrak aseton, metanol dan akues daripada gal *Q. infectoria* ditentukan dengan menggunakan teknik mikropencapaian bersiri menggunakan plat telaga 96 menggunakan kaldu Mueller Hinton yang diperkaya dengan 2% NaCl (CLSI 2005). Julat kepekatan ekstrak yang digunakan adalah antara 0.024 mg/mL dan 10 mg/mL. Air suling digunakan sebagai pelarut untuk ekstrak. Semua ekstrak disterilkan menggunakan penuras picagari 0.45 μm . Saiz inokulum bakteria

untuk setiap strain diselaraskan menjadi 10^8 bakteria/mL. Penyediaan inokulum bakteria dilakukan dengan menyelaras *ketumpatan optik* (O.D) suspensi bakteria dengan menambah kaldu pada turbiditi agar setara dengan 0.08 pada panjang gelombang 625 nm.

Selepas pengerman selama 24 jam pada suhu 37°C , pertumbuhan bakteria dinilai melalui pemerhatian menggunakan mata kasar bagi meneliti kadar pertumbuhan bakteria. Kehadiran pertumbuhan bakteria ditunjukkan oleh dengan kadar kekeruhan atau kehadiran pelet pada dasar telaga manakala perencatan dinilai pada telaga yang jernih dan mengekalkan warna asalnya. Selain itu, bagi mengesahkan kehadiran pertumbuhan bakteria di dalam telaga, sebanyak 10 μL larutan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dengan kepekatan 5 mg/mL ditambahkan ke dalam setiap telaga dan diinkubasi selama 2 jam.

Telaga yang mengandungi bakteria hidup akan mengaruh penukaran warna kuring larutan reagen MTT kepada warna biru kehitaman. Enzim dehidrogenase di dalam sel bakteria viabel akan menurunkan warna kuning garam tetrazolium kepada warna biru kehitaman (Marion et al. 2007). Telaga yang mengandungi suspensi bakteria sahaja digunakan sebagai kawalan positif, manakala campuran larutan ekstrak dan kaldu tanpa suspensi bakteria digunakan sebagai kawalan negatif sebagai indikasi sampel telaga yang jernih tanpa pertumbuhan bakteria.

FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION (FIC)

Di dalam penentuan aktiviti sinergistik ekstrak dan vankomisin, teknik mikropencapaian kaldu *Chequerboard* (Sato et al. 2004). Kepekatan yang digunakan untuk kedua-dua ekstrak dan vankomisin adalah dalam julat lima kali ganda pencairan daripada nilai MIC. Setiap telaga mikrotiter diinokulasi dengan 50 μL inokulum bakteria (10^8 bakteria/ml) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. FIC ditentukan daripada kepekatan kombinasi ekstrak dan antibiotik yang tidak menunjukkan pertumbuhan pada bakteria yang diuji (Mandal et al. 2004). Indeks FIC dikira menggunakan formula berikut; $\text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \text{Indeks FIC}$. $\text{FIC}_A = \text{MIC}$ dadah A dalam kombinasi/MIC dadah A sahaja tanpa kombinasi, and $\text{FIC}_B = \text{MIC}$ dadah B dalam kombinasi/MIC dadah B sahaja tanpa kombinasi. Kombinasi adalah sinergi apabila nilai indeks FIC adalah ≤ 0.5 , aditif apabila indeks $\text{FIC} > 0.5$ to ≤ 1 , tiada perbezaan apabila indeks $\text{FIC} 1 \leq 4$ dan antagonistik apabila indeks $\text{FIC} > 4$ (Chang et al. 2007).

HASIL DAN PERBINCANGAN

Ekstrak gal daripada *Q. infectoria* banyak dilaporkan mempunyai pelbagai aktiviti terhadap kedua-dua jenis bakteria Gram negatif (Supayang et al. 2004) dan Gram positif (Hwang et al. 2004). Dalam kajian ini aktiviti anti-MRSA dipamerkan melalui kombinasi vankomisin dengan ekstrak *Q. infectoria* terhadap tujuh strain MRSA (Jadual 1). Hasil ujian menunjukkan nilai min bagi indeks FIC dengan

JADUAL 1. Kepekatan mencegah pecahan (FIC) bagi vankomisin sahaja dan kombinasi dengan ekstrak daripada gal *Quercus infectoria* terhadap strain-strain *Staphylococcus aureus* tahan *Methicillin* (MRSA)

Strain MRSA	Vankomisin sahaja(µg/mL)	Kombinasi (µg/mL)											
		Aqueus			Metanol			Aseton					
		[#] MIC dalam kombinasi (µg/mL)	V*	A*	[#] MIC dalam kombinasi (µg/mL)	V*	M*	Indeks FIC	[#] MIC dalam kombinasi (µg/mL)	V*	AC*	Indeks FIC	
ATCC 43300	1.5625	0.0976	2500	0.5625(A) ±0.00	0.1953	2500	0.6249(A) ±0.00	0.0976	1250	0.3124(S) ±0.00			
ATCC 49476	1.5625	0.0976	5000	1.5625(A) ±0.00	0.1953	1250	0.3750(S) ±0.00	0.0976	2500	0.5625(A) ±0.00			
ATCC 33591	0.3909	0.0325	2500	0.5833(A) ±0.04	0.0244	2500	0.5625(A) ±0.00	0.0244	2500	0.5625(A) ±0.00			
Sa7	6.2500	0.5208	1250	0.4167(S) ±0.13	0.3906	2500	0.5625(A) ±0.00	0.7812	1250	0.3750(S) ±0.00			
HUKM (darah)	6.2500	1.1719	2500	0.6042(A) ±0.13	0.5208	2500	0.5625(A) ±0.00	1.1719	2500	0.6042(A) ±0.13			
N316(urin)	12.5000	1.0416	5000	0.5000(S) ±0.11	0.5208	5000	0.8750(A) ±0.22	4.1667	2500	0.6667(A) ±0.14			
U9495(nanah)	12.5000	1.8229	2500	0.3958(S) ±0.09	0.7812	2500	0.5625(A) ±0.00	0.7812	2500	0.3750(S) ±0.00			

*V = Vankomisin

*A = Aqueus

*M = Metanol

*AC = Aseton

µ = Purata MIC dalam kombinasi (µg/mL)

nilai kurang daripada 0.5 iaitu indikasi bagi interaksi yang sinergi dapat dilihat pada semua hasil kombinasi ekstrak gal *Q. infectoria* (akues, metanol dan aseton) dengan vankomisin terhadap semua strain MRSA kecuali ATCC 33591 dan strain klinikal HUKM.

Menggunakan kaedah kajian yang sama, Dayang et al. (2008) melaporkan bahawa semua interaksi yang sinergistik di antara fitokimia (kecuali *quacertin*) dan oksasilin mempamerkan penurunan 20 kali ganda dari MIC oksasilin terhadap VISA. Selain itu, kombinasi oksasilin dan vankomisin juga menunjukkan kesan sinergi terhadap 3 daripada 6 pencilan MRSA (Beth et al. 2000). Dalam kajian ini kesan sinergi dapat dilihat masing-masing pada kombinasi vankomisin dengan ekstrak aseton dan akues terhadap strain Sa7 dengan nilai indeks FIC 0.3750 dan 0.4167. Ekstrak metanol daripada *Q. infectoria* hanya memberikan kesan yang sinergi terhadap ATCC 49476 (0.3750) dan aditif terhadap lain-lain strain MRSA. Manakala kombinasi ekstrak aseton dengan vankomisin mempamerkan aktiviti sinergi ke atas strain MRSA ATCC 43300 (0.3124).

Ini adalah suatu yang menarik dan selain sinergi terhadap strain MRSA aruhan makmal, ekstrak akues gal *Q. infectoria* juga mempamerkan penurunan nilai MIC vankomisin sebanyak 12 kali ganda dan 6.85 kali ganda masing-masing terhadap dua strain VISA; N316 dan U9495. Daripada keputusan ujian ini dapat disimpulkan bahawa, ekstrak aseton dan akues mempamerkan aktiviti sinergi yang paling ketara dan konsisten terhadap strain MRSA rujukan, aruhan makmal dan klinikal. Ini selaras dengan laporan Sasitorn dan Supayang (2008), ekstrak akues, aseton, etil asetat, dan etanol daripada *Q. infectoria* menunjukkan aktiviti antibakteria yang signifikan terhadap semua strain MRSA yang digunakan dalam kajiannya.

Kandungan tanin yang tinggi (50-70%) sebahagian kecil asid galik bebas dan elagik bebas (Wiar et al. 2001), yang terdapat di dalam gal tumbuhan ini juga mungkin menjadi sebatian aktif sebagai anti-MRSA (Kaur et al. 2008). Akiyama et al. (2001) mendapati permingkatan terhadap aktiviti anti-stafilokokus oleh antibiotik β -laktam dengan kehadiran asid tanik pada 100 mg L^{-1} dan asid elagik pada 5000 mg L^{-1} . Asid tanik adalah galotanin yang penting, dan ia adalah ester kepada asid galik dan glukosa manakala asid elagik dibentuk melalui laktonisasi elagitanin (Chung et al. 1993).

Kombinasi vankomisin dan ekstrak gal *Q. infectoria* ini mungkin berguna sebagai terapi alternatif dalam perawatan melibatkan infeksi MRSA dengan adanya penurunan nilai MIC vankomisin. Ini secara tidak langsung mengurangkan kesan sampingan vankomisin terhadap pesakit dan mengurangkan potensi berlakunya perkembangan mutasi bakteria yang menyebabkan kerentanan terhadap antibiotik. Kesan sampingan akibat penggunaan vankomisin juga menjadi isu dalam penggunaannya di seluruh dunia. Kajian sebegini perlu dilakukan melibatkan kombinasi antibiotik komersil dengan sebatian aktif yang terdapat di dalam tumbuhan. Agen antibakteria daripada tumbuhan secara

amnya bertindak secara lemah secara individu, tetapi mampu bertindak secara sinergi melalui kombinasi dengan antibiotik sedia ada (Lewis & Ausubel 2006).

KESIMPULAN

Kombinasi ekstrak daripada *Q. infectoria* dan vankomisin menunjukkan kesan sinergi dengan penurunan nilai MIC vankomisin sebanyak 6.85 sehingga 16 kali ganda daripada nilai MIC terhadap ATCC 43300, ATCC 49476, Sa7, N316 (urin) dan U9495 (nanah). Ekstrak *Q. infectoria* mempamerkan interaksi yang aditif dengan vankomisin terhadap strain MRSA HUKM dan ATCC 33591. Walau bagaimanapun, tiada interaksi yang antagonis dapat dilihat dalam semua kombinasi. Kajian yang lebih terperinci perlu dilakukan bagi melihat mekanisme aktiviti anti-MRSA yang terdapat pada kombinasi ini.

PENGHARGAAN

Penghargaan buat Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah menaja penyelidikan ini di bawah Geran Penyelidikan Universiti; UKM-OUP-TKP-21-99/2009.

RUJUKAN

- Akiyama, H., Kazayasu, F., Osamu, Y., Takashi, O. & Keiji, I. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48(4): 487-491.
- Beth, E.D., Ann, M.E. & Richard, A.V. 2000. Vancomycin and oxacillin synergy for Methicillin-resistant Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(5): 1394-1396.
- CDC. 2006. *Investigation and Control of Vancomycin Intermediate and Resistant Staphylococcus aureus (VISA/VRSA)*. Division of Healthcare Quality Promotion Centers for Disease Control and Prevention. Last updated September 2006.
- Chung, K.T., Steven, S.E. Jr., Lin W.F. & Wei, C.I. 1993. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology* 17: 29-32.
- Chang, P.C., Li, H.Y., Tang, H.J., Liu, J.W., Wang, J.J. & Chuang, Y.C. 2007. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 40: 56-61.
- CLSI. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. *Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pa.*
- Dayang, F.B. & Fan, S.H. 2004. In vitro antibacterial activity of the galls of *Quercus infectoria*. *Tropical Biomedicine* 21(1): 39-46.
- Dayang, F.B., Fan, S.H., Noraziah, M.Z. & Ibrahim, J. 2005a. Antibacterial activity of the galls of *Quercus infectoria*. *Malaysian Journal of Science* 24(1): 257-262.
- Dayang, F.B., Hikmah, M.I. & Mastura, M. 2005b. An alternative phytotherapeutic agent for treatment of hospital-acquired MRSA infections. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 12(1): 168.
- Dayang, F.B., Noraziah, M.Z., Nur S.B., Faralisa, R. & Mastura, M. 2008. Synergistic effects of phytochemicals and oxacillin

- on Laboratory Passage-Derived Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Strain. *Journal of Medical Sciences* 8(2): 131-136.
- Hwang, J.K., Shim, J.S. & Chung, J.Y. 2004. Anticariogenic activity of some tropical medicinal plants against *Streptococcus mutans*. *Filoterapia* 75: 596-598.
- Kaur, G., Athar, M. & Alam, M.S. 2008. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chemico- biological Interactions* 171: 272-282.
- Kuehnert, M.J., Hill, H.A., Kupronis, B.A., Tokars, J.I., Solomon, S.L. & Jernigan, D.B. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. *Emerging Infectious Disease Journal* 11: 868-872.
- Lewis, K. & Ausubel, F. 2006. Prospectd for plant-derived antibacterial. *Nature Biotechnology* 24(12): 1504-1507.
- Loeffler, A., Boag, A.K., Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Smith, H., Stevens, K.B. & Lloyd, D.H. 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 592-597.
- Mandal, S., Mandal, M.D. & Pal, N.K. 2004. Evaluation of combination effect of ciprofloxacin and cefazolin against *Salmonella enterica* serovar *typhi* isolates by *in vitro* methods. *Calicut Medical Journal* 2(2): e2.
- Marion, G., Maxime, M., Stephane, F. Jean-Bernard, R.D.V., Chantal, F. & Raphael, E.D. 2007. In vitro activity of para-guanidinoethylcalix(4)arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Sep 60(3): 575-81.
- NNIS System. 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control* 32: 470-485.
- Oie, S., Hosokawa, I. & Kamiya, A. 2002. Contamination of door handles by methicillin-sensitive/ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection* 51: 140-143.
- Samuelsson, G. 1999. *Drugs of Natural Origin*. 4th Ed. Sweden: Swedish Pharmaceutical Press.
- Sasitorn, C. & Supayang, P.V. 2008. *Quercus infectoria*: A Candidate for the Control of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Phytotherapy Research* 22: 560-562.
- Sato, M., Tanaka, H., Yamaguchi, R., Kato, K. & Etoh, H. 2004. Synergistic effects of mupirocin and an isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(3): 241-246.
- Sexton, T., Clarke, P., O'Neill, E., Dillane, T. & Humphreys, H. 2005. Environmental reservoirs of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: Correlation with patient isolates and implication for hospital hygiene. *Journal of Hospital Infection* 62: 187-194.
- Supayang, P.V., Sasitorn, C. & Sakol, S. 2008. *Quercus infectoria* Oliv. *Pharmaceutical Biology* 46(6): 367-372.
- Supayang, V., Amornrat, L., Wanpen, J., Trechada, S., Souwalak, P. & Thanomjit, S. 2004. Effective medicinal plants against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Ethnopharmacology*: 49-54.
- Weese, J.S., Goth, K., Ehtier, M. & Boehnke, K. 2004. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from the environment in a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18: 468-470.
- Wuart, C. & Kumar, A. 2001. *Practical Handbook of Pharmacognosy*. Selangor: Pearson Education Malaysia Sdn Bhd.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. & Edmond, M.B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39: 309-317.

Jabatan Sains Bioperubatan
Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: mfillah14@yahoo.com

Diserahkan: 3 Mac 2010
Diterima: 25 Mei 2010