

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: BIOAKTIVITI EKSTRAK KLOROFORM ZINGIBER OTTENSIIIjazah: IJAZAH SARJANA MUDA SAINSSESI PENGAJIAN: 2002/2005Saya NORUL BAKHS EINTI MD. YUSOFF

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Silatandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh


 (TANDATANGAN PENULIS)

 (TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

 Alamat Tetap: NO. 6, JLN. GUDANG RASAU 1,
JALAN GUDANG RASAU AMAN 2,
25150, KUANTAN, PAHANG
PROF Madya DR. MASHITAH MOHD.
 Nama Penyelia YUSOFF
Tarikh: 29. MAC 2005

Tarikh: _____

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



BIOAKTIVITI EKSTRAK KLOOROFORM *ZINGIBER OTTENSII*.

NORUL BALKIS BINTI MD. YUSOFF

DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN

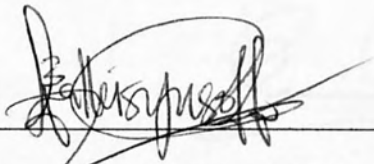
PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
KOTA KINABALU

Mac 2005

PENAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

31 Mac 2005



Norul Balkis Binti Md. Yusoff
HS 2002 - 3094

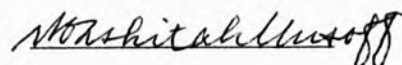


DIPERAKUKAN OLEH

TANDATANGAN

1. PENYELIA

PROFESOR MADYA DR. MASHITAH MOHD. YUSOFF



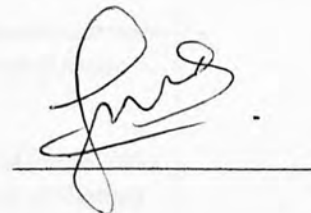
2. PEMERIKSA 1

PROFESOR DR. PERUMAL RAMASAMY



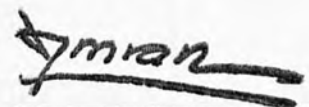
3. PEMERIKSA 2

DR. JUALANG @ AZLAN ABDULLAH BIN GANSAU



4. DEKAN SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI

PROFESOR MADYA DR. AMRAN AHMED



PENGHARGAAN

Saya bersyukur ke hadrat Ilahi, kerana dengan limpah kurniaNya telah dapat memberi kekuatan untuk menjalankan tanggungjawab saya sebagaimana yang dikehendaki. Tanpa berkat dan rahmat dari Allah, saya tidak mungkin dapat menyelesaikan projek ini dengan sebaik mungkin.

Saya dengan segala hormatnya mengucapkan jutaan terima kasih kepada Profesor Madya Dr. Mashitah Mohd. Yusoff selaku penyelia projek ini. Beliau telah banyak memberikan sokongan kepada saya dalam melaksanakan projek ini. Penghargaan ini juga ditujukan kepada Cik Naransa atas bantuan tunjuk ajar dan pandangan beliau terhadap kerja-kerja saya di dalam makmal sepanjang dua semester ini. Selain itu diucapkan terima kasih kepada pembantu penyelidik di Institut Biologi Tropika dan Pemuliharaan serta pelajar- pelajar pascasiswazah terutamanya Cik Nurul Husna.

Ribuan terima kasih ditujukan kepada kedua ibu bapa saya yang telah sekian lama memberi dorongan serta doa dan kasih sayang mereka. Dengannya saya dapat menumpukan sepenuh perhatian dan tenaga saya di dalam pembelajaran selama tahun pengajian saya di Universiti Malaysia Sabah ini. Saya amat berhutang jasa dan budi di atas segalanya. Tidak lupa juga kepada teman-teman seperjuangan yang sama-sama berpenat lelah di dalam makmal, terima kasih di atas bantuan, teguran dan galakan yang kalian berikan. Terima kasih ditujukan kepada semua pihak yang terlibat secara langsung atau tidak di atas bantuan yang diberikan.

Akhir kata, setulus ikhlas dari saya, ribuan terima kasih untuk semua.

Sekian, terima kasih.

ABSTRAK

Kajian ini dilakukan menggunakan ekstrak kloroform *Z.ottensii*, salah satu spesis Zingiberaceae. Ujian yang dijalankan adalah untuk membandingkan aktiviti antioksidan, sitotoksik dan antibakteria bagi bahagian yang berlainan pada tumbuhan ini. Tumbuhan yang dikaji dibahagikan kepada tiga bahagian iaitu rizom, batang dan daun. Sampel kemudian diekstrak dengan n-heksana dan seterusnya kloroform. Ekstrak kloroform *Z.ottensii* bagi rizom menunjukkan sifat antioksidan yang tinggi (1 %- 41.57) berbanding batang (9.52 %) dan daun (13.81 %). Dalam menjalankan ujian ini, kaedah perlekatan radikal bebas menggunakan DPPH digunakan. Untuk ujian sitotoksik, ujian dilakukan berdasarkan pendedahan ekstrak kloroform *Z.ottensii* bagi lima kepekatan yang berbeza terhadap *Artemia salina*. Untuk LC₅₀ akut, nilai ketoksikan relatif bagi rizom adalah 1.00, daun (0.94) dan batang (0.89). Untuk LC₅₀ kronik, ketoksikan batang adalah 1.32 berbanding rizom (0.99) dan daun (0.64). Ketoksikan ini dibandingkan dengan piawai kalium dikromat. Untuk ujian antibakteria, semua keputusan adalah negatif bagi bahagian yang berbeza pada kepekatan 50 mg/ml. Bakteria yang digunakan adalah *Escherichia coli* (gram negatif), *Bacillus subtilis* (gram positif) dan *Staphylococcus aureus* (gram positif).



ABSTRACT

BIOACTIVITIES OF CLOROFORM EXTRACT *ZINGIBER OTTENSII*.

This research was conducted using cloroform extract of *Z.ottensii*, one of the Zingiberaceae species. The test was done to compare the antioxidant, cytotoxicity and antibacterial activity between different parts of the plant. The plant was divided into three parts, that are the rhizome, stems and leaves. Sample were extracted with n-hexane and then chloroform. Rhizome shows high antioxidant activity (I %- 41.57) compared to stem (9.52 %) and leaves (13.81 %). In this research, free radical scavenging using DPPH method was used. As for cytotoxicity activity, it was based on the exposure of five concentrations of the extracts against *Artemia salina*. For LC₅₀ acute, the relative toxicity (RT) for rhizome is 1.00, more toxic then leaves (0.94) and stem (0.89). As for LC₅₀ chronic, RT for stem is 1.32 compared to rhizome (0.99) and leaves (0.64). This toxicity was compared with potassium dichromate as positive standard. For antibacterial activity, all the observation was negative for different parts at the concentration of 50 mg/ml. The bacteria used in this test were *Escherichia coli* (gram-negative), *Bacillus subtilis* (gram-positive) and *Staphylococcus aureus* (gram-positive).

KANDUNGAN

	Muka Surat
HALAMAN JUDUL	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI JADUAL	viii
SENARAI RAJAH	ix
SENARAI FOTO	x
SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 KAJIAN PERPUSTAKAAN	4
BAB 3 METODOLOGI	
3.1 Pengumpulan sampel	14
3.2 Pengekstrakan sampel	14
3.3 Biocerakinan	
3.3.1 Ujian antioksidan	16
3.3.2 Ujian sitotoksik	17
3.3.3 Ujian antibakteria	20
BAB 4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	22
BAB 5 KESIMPULAN	46
RUJUKAN	48
LAMPIRAN	51



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
4.2	22
4.3	32
4.4	32
4.5	41
4.6	45
4.7	46
4.8	47
4.9	47
4.10	47
4.11	47
4.12	47
4.13	47
4.14	47
4.15	47
4.16	47
4.17	47



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
4.1 Min peratus penahanan pengoksidaan.	23
4.2 LC ₅₀ akut, Kalium Dikromat.	25
4.3 LC ₅₀ kronik, Kalium Dikromat.	26
4.4 LC ₅₀ akut, Rizom.	27
4.5 LC ₅₀ kronik, Rizom.	27
4.6 LC ₅₀ akut, Stem.	28
4.7 LC ₅₀ kronik, Stem.	29
4.8 LC ₅₀ akut, Daun.	30
4.9 LC ₅₀ kronik, Daun.	31
4.10 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ akut, Kalium Dikromat.	33
4.11 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ kronik, Kalium Dikromat.	34
4.12 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ akut, Rizom.	35
4.13 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ kronik, Rizom.	36
4.14 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ akut, Stem.	37
4.15 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ kronik, Stem.	38
4.16 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ akut, Daun.	39
4.17 Kuartil peratus kematian untuk LC ₅₀ kronik, Daun.	40



SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN.

BHT	Butylated hydroxytoluena
PG	Propyl gallate
BHA	Tert-butyl hydroxyanisole
DNA	Asid deoksiribonukleik
LC ₅₀	Kepekatan yang menyebabkan kemautan sebanyak 50%
LC ₂₅	Kepekatan yang menyebabkan kemautan sebanyak 25%
LC ₇₅	Kepekatan yang menyebabkan kemautan sebanyak 75%
sp.	Spesis
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
Abs	Serapan
SD	Sisihan piawai
I %	Peratus penahanan antioksidan
ppm	Bahagian per juta
A ₀	Min serapan DPPH
A _s	Serapan sampel
NB	Sup nutrisi
NA	Agar nutrisi
Ø	Diameter
IC ₅₀	Peratus penghalangan pengoksidaan sebanyak 50%



BAB 1

PENDAHULUAN

Zingiberaceae adalah sebahagian daripada order Zingiberales merupakan tumbuhan monokotiledon. Tumbuhan ini mempunyai kepentingan sejagat sebagai tumbuhan hiasan, herba dan komponen dalam penyediaan ubatan tradisional. Walaupun morfologi kebanyakan jenis halia ini terutamanya yang terdapat di Semenanjung Malaysia dan Singapura telah dikenalpasti melalui penyelidikan yang telah dijalankan, kandungan kimia dalam jenis halia ini tidak banyak yang didokumentasikan (Larsen *et al.*, 1999).

Zingiber ottensii (Foto 1.1) dikenali sebagai “lempoyang hitam” oleh masyarakat Melayu di Semenanjung Malaysia dan “lempoyang” oleh orang Brunei di Sabah. Daun *Zingiber ottensii* ini digunakan oleh orang Brunei Sabah sebagai ulaman dalam makanan harian. Pemakanan ini juga adalah salah satu cara untuk menghalang pertumbuhan kanser. Komponen tumbuhan ini boleh digunakan sebagai ubatan anti-inflamatori dan antipasmodik

Ciri utama yang dapat membandingkan *Z.ottensii* dengan kumpulan Zingiber yang lain adalah melalui pengecaman pelepah bunga. Pelepah bunga bagi spesis ini akan berwarna merah dari muda sehingga layu. Berbanding spesis terdekat iaitu *Z.zerumbet* yang akan berwarna hijau kekuningan pada peringkat awal. Selain itu rizom bagi *Z.ottensii* berwarna ungu tua di bahagian dalam. Batangnya akan berwarna kemerahan di bahagian pangkal.



Foto 1.1 *Zingiber ottensii*.

Pencirian yang ingin dijalankan adalah mengenai aktiviti antioksidan, sitotoksik dan antibakteria. Dalam menjalankan ujian sitotoksik ini, apa yang diinginkan adalah untuk mendapatkan komponen novel dalam kuantiti yang banyak dari tumbuhan yang mudah diperolehi dan pada masa yang sama dapat menjadikannya sebagai satu perawatan untuk penyakit seperti kanser, malaria dan penyakit-penyakit lain yang boleh menyebabkan kematian. Ujian yang dijalankan adalah ujian sitotoksik yang menguji ketoksikan terhadap sel.

Dalam ujian antioksidan, komponen yang dicari dapat melindungi sel daripada kesan kerosakan akibat spesies oksigen reaktif seperti oksigen tunggal, radikal hidroksil dan radikal peroksil. Ketidakseimbangan antara agen antioksidan dan spesies oksigen reaktif ini akan menyebabkan tekanan oksidatif yang kemudiannya menjurus ke arah kerosakan selular seperti kanser. Flavonoid adalah salah satu dari jenis polifenol yang membantu untuk menyediakan perlindungan terhadap penyakit dengan menjadi penyumbang bersama enzim dan vitamin antioksidan untuk membentuk sistem pertahanan antioksidan pada tubuh manusia.

Dalam ujian antibakteria, ia perlu untuk menghalang pembiakan bakteria terutamanya pada luka-luka ataupun kesan terbakar pada badan manusia. Jika ujian menunjukkan keputusan positif, maka sampel tersebut boleh dikomersilkan untuk tujuan ubatan komersial. Bakteria yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

Objektif utama projek ini dijalankan adalah untuk :

- Menjalankan ujian antioksidan menggunakan DPPH dan membandingkan kesannya pada bahagian yang berbeza bagi ekstrak kloroform *Zingiber ottensii*.
- Menjalankan ujian sitotoksik - biocerakanan anak udang (*Artemia salina*) dan membandingkan kesannya pada bahagian yang berbeza bagi ekstrak kloroform *Zingiber ottensii*.
- Menjalankan ujian antibakteria dan membandingkan pada bahagian yang berbeza bagi ekstrak kloroform *Zingiber ottensii*.

BAB 2

KAJIAN PERPUSTAKAAN

Zingiberaceae adalah di kalangan famili tumbuhan yang mana ia tersebar secara meluas di beberapa bahagian tropika terutamanya di Asia Tenggara. Di Semenanjung Malaysia, Zingiberaceae ini adalah satu komponen flora herba di dalam hutan hujan tropika. Adalah dianggarkan, terdapat lebih 150 spesis halia yang dimiliki oleh 23 genera yang boleh ditemui di Semenanjung Malaysia (Habsah *et al.*, 2000).

Spesis Zingiberaceae ini tumbuh secara semulajadi dalam keadaan yang lembab, di bahagian yang terlindung, tanah rendah ataupun kaki-kaki bukit atau pergunungan. Ia berada dalam kelompok yang bertaburan ataupun tumbuh dalam kumpulan-kumpulan kecil secara berasingan.

Ahli kumpulan famili Zingiberaceae ini mudah dikenali berdasarkan ciri-ciri daun dan rizomnya yang beraroma apabila dikisar dan juga oleh daunnya yang berbentuk oblong-elliptik yang disusun dalam dua jalur pada pucuk daun. Di Asia Tenggara, sesetengah spesis Zingiberaceae digunakan sebagai rempah ratus, ubatan, agen

perisa dan juga sebagai sumber untuk pewarna (Habsah *et al.*, 2000).

Beberapa spesis dari genera *Alpinia*, *Amomum*, *Curcuma*, *Costus*, *Kaempferia* dan *Zingiberaceae* adalah ramuan utama dalam tonik yang disediakan secara tradisional yang juga dikenali masyarakat tempatan sebagai jamu. Jamu ini boleh diperolehi secara komersial di pasaran. Ubatan tradisional ini mudah dikenalpasti berdasarkan aroma yang terbit dari jamu tersebut yang biasanya diproses dengan mengambil bahagian daun dan rizomnya.

Terdapat jujuk semi-polar seperti curcuminoids, kava pyrines dan gingeroles yang dipencilkan dari tumbuhan *Zingiberaceae* telah dilaporkan menunjukkan aktiviti biologi seperti antifungi, antioksidan, insektisidal dan aktiviti anti-inflamatori (Habsah *et al.*, 2000). Oleh yang demikian, sifat antioksidan dan antimikrobial yang terdapat pada ekstrak *Zingiberaceae* inilah yang menyebabkan ia digunakan sebagai ramuan penting dalam penyediaan jamu. Herba dan rempah ratus adalah antioksidan semulajadi (Demo *et al.*, 1998). Ini adalah kerana kehadiran kompon fenolik polar dan minyak pati.

Walaupun terdapat beberapa laporan mengenai jujukan tumbuhan *Zingiberaceae* di Malaysia, kajian ini tidak pula melaporkan mengenai aktiviti biologi isolosi kompon ataupun ekstrak kasar. Adalah diketahui bahawa beberapa spesis daripada *Zingiberaceae* menunjukkan aktiviti antioksidan dan antimikrobial (Habsah *et al.*, 2000).

Pencarian ciri aktiviti biologi seperti antioksidan penting kerana agen antioksidan diperlukan untuk mengekalkan perisa dan pewarna serta untuk menghalang pemusnahan vitamin. Cara lain untuk mengawet ataupun mengekalkan makanan adalah secara sintetik. Butylated hydroxytoluena (BHT), propyl gallate (PG) dan tert-butyl hydroxyanisole (BHA) adalah di antara bahan kimia sintetik yang digunakan untuk pengawetan makanan (Moure *et al.*, 2001).

Walaupun bagaimanapun, terdapat laporan yang menyatakan bahawa BHA dan BHT mungkin mempunyai sifat toksik. Selain itu, ia juga memerlukan kos yang tinggi. Oleh yang demikian, agen antioksidan semulajadi seperti tokoferol, ditambah pula dengan kesedaran pengguna terhadap keselamatan makanan yang diambil menyebabkan satu keperluan untuk mengenalpasti alternatif semulajadi dan juga sumber yang lebih selamat untuk antioksidan makanan (Moure *et al.*, 2001).

Sayuran mempunyai banyak kompon dengan aktiviti antioksidan. Beberapa pokok tumbuhan telah dilaporkan sebagai sumber yang berpotensi bagi agen antioksidan semulajadi untuk kegunaan industri makanan. Pelbagai kompon telah dipencilkan dan kebanyakan dari kompon tersebut adalah polifenol. Terdapat lingkungan tinggi dan rendah yang meluas terhadap jisim molekul polifenol tumbuhan yang mengandungi kepentingan antioksidan telah dikaji dan telah diutarakan sebagai perlindungan terhadap oksidasi lipid (Moure *et al.*, 2001).



Kajian saintifik telah membuktikan bahawa agen antioksidan mampu untuk melindungi sel dari kerosakan akibat radikal bebas dan ditambah pula dengan aktiviti fisiologikal lain antioksidan semulajadi seperti antibakteria, antiviral, antimutagenik (Moure *et al.*, 2001).

Sumber semulajadi antioksidan selain vitamin C, vitamin E dan karotenoid adalah dalam bentuk jujuk dietari. Sebagai contohnya, aktiviti antioksidan boleh ditemui pada buah beri, ceri, kiwi, prun dan zaitun. Minyak zaitun dan jus buahan mempunyai aktiviti antioksidan yang tinggi. Halia juga mempunyai aktiviti antioksidan (Moure *et al.*, 2001).

Semasa oksidasi lipid, agen antioksidan bertindak dalam pelbagai mekanisme seperti pengikatan ion logam, pelekatan (scavenging) radikal dan pereputan peroksida. Kadangkala, mekanisme ini boleh berlaku serentak dalam satu-satu masa. Dalam sistem berkaitan makanan, aktiviti antioksidan bermaksud pemutusan rantai penahanan peroksidaan lipid. Dalam sistem *in vivo*, radikal bebas boleh memusnahkan protein, DNA dan molekul kecil yang lain.

Antioksidan boleh diklasifikasikan ke dalam tiga bahagian iaitu (1) radikal antioksigen (1O_2 dan 3O_2), penurunan bahan (asid askorbik), antioksidan seperti karotenoid, (2) antiradikal dan antioksidan primer, (3) chelator logam. Klasifikasi lain yang digunakan secara meluas mengambilkira antioksidan primer atau sekunder, pengurangan kadar pemulaan rantai, juga kompoun yang mempunyai kedua-dua aktiviti

primer dan sekunder antioksidan. Tetapi kebanyakan produk yang diukur adalah konjugasi diena hidroperoksida untuk oksidasi primer dan kompon mudah meruap untuk oksidasi sekunder (Moure *et al.*, 2001).

Oleh yang demikian, aktiviti antioksidan boleh dinilai menggunakan kaedah yang berlainan untuk mekanisme yang berbeza. Kaedah yang selalu digunakan untuk mengukur tahap kemusnahan oksidatif pada manusia adalah seperti (1) pemusnahan oksidatif keseluruhan DNA, (2) tahap antioksidan enzim, tahap antioksidan jisim molekul rendah, (3) pemusnahan oksidatif lipid, (4) pemusnahan protein (Moure *et al.*, 2001).

Aktiviti antioksidan bagi kompon fenolik dipengaruhi oleh struktur kimia mereka. Perkaitan antara struktur dan aktiviti inilah yang digunakan sebagai kaedah teorikal untuk menjangkakan aktiviti antioksidan dan cara ini digunakan oleh beberapa ahli saintis. Polimerik polifenol lebih berpengaruh daripada monomerik polifenol yang ringkas.

Aktiviti antioksidan juga bergantung kepada jenis dan kepolaran larutan ekstraksi, kaedah pemencilan, ketulenan kompon aktif, sistem ujian dan juga substrat yang ingin dilindungi oleh agen antioksidan. Telah dicadangkan faktor untuk menentukan aktiviti antioksidan adalah sifat molekul yang lipofilik dan sifat afiniti antioksidan bagi lipid (Moure *et al.*, 2001).

Faktor yang mempengaruhi aktiviti antioksidan adalah penting untuk diambilkira kerana kualiti ekstrak semulajadi dan kebolehan antioksidan bergantung bukan sahaja terhadap tumbuhan yang diambil, keadaan geografi, cuaca masa, masa tuaian dan penyimpanan, tetapi juga faktor persekitaran dan teknologi yang digunakan memberikan kesan terhadap aktiviti antioksidan sumber residu.

Kandungan polifenol dan aktiviti antioksidan adalah berbeza bagi bahagian tumbuhan yang berlainan seperti daun, floem, kulit kayu (Moure *et al.*, 2001). Batang dan rizom juga akan menunjukkan aktiviti antioksidan dan kandungan polifenol yang berbeza. Usia bahagian tumbuhan juga berbeza contohnya bagi daun (daun muda dan daun tua). Tetapi bagi sesetengah tumbuhan, usia tidak memainkan peranan penting.

Larutan yang digunakan untuk proses pengestrakan juga memainkan peranan penting dalam mendapatkan kumpoun fenolik dan seterusnya dalam penentuan aktiviti antioksidan. Kedua-dua hasil ekstraksi dan aktiviti antioksidan bagi ekstrak adalah sangat bergantung kepada larutan, kerana potensi kumpoun antioksidan berbeza dengan kepolaran yang berlainan (Moure *et al.*, 2001).

Etil asetat dan dietil eter telah digunakan untuk mengekstrak fenol jisim molekul rendah dari pokok oak dan polifenol yang diekstrak dengan etil asetat dari bahan semulajadi telah dilaporkan mempunyai aktiviti antioksidan yang tinggi (Moure *et al.*, 2001). Oleh kerana aktiviti bergantung kepada kumpoun polifenol dan esei antioksidan,

perbandingan perlu dilakukan untuk memilih larutan yang optima untuk memaksimumkan aktiviti antioksidan bagi setiap substrat.

Saiz partikel semasa pengekstrakan juga memainkan peranan yang penting. Ini kerana saiz partikel yang lebih kecil memudahkan pengekstrakan oleh larutan. Kompoun polifenol lebih mudah untuk dikeluarkan. Jika saiz partikel adalah besar, maka proses pengekstrakan akan memakan masa yang agak lama berbanding dengan hanya menggunakan saiz partikel yang kecil. Oleh itu, semasa proses kisanan, saiz partikel perlu ditetapkan.

Suhu semasa proses pengeringan dan semasa proses pengekstrakan juga memberi kesan terhadap kestabilan kompoun akibat dari degradasi kimia dan enzim serta pereputan oleh haba dengan pereputan termal adalah mekanisma utama yang dapat mengurangkan kandungan polifenol. Pendedahan berterusan terhadap suhu serata juga mampu untuk memusnahkan fenolik. Suhu dan kesan cahaya juga memainkan peranan penting semasa proses penyimpanan. Ia memberikan kesan yang berbeza bagi kompoun yang berlainan (Moure *et al.*, 2001).

Untuk ujian sitotoksik, ia adalah kajian aktiviti sebatian bioaktif yang cepat dan ringkas. Kaedah ujian sitotoksik ini mudah dijalankan, kos murah dan hanya memerlukan kuantiti sampel yang sedikit sahaja. Ujian sitotoksik ini mengambil kira peratus kemautan kerana mudah dan hanya menggunakan parameter hidup atau mati (Colegate *et al.*, 1993).

Laporan pertama penggunaan anak udang, *Artemia salina* adalah pada tahun 1965. Dan sejak itu penggunaan organisma ini berleluasa dalam pengkajian sekitaran, dan pengesanan toksin semulajadi (Colegate *et al.*, 1993). Sista yang digunakan adalah dalam fasa rehat kerana ketiadaan air. Keadaan ini boleh bertahan dalam masa yang agak lama sehinggalah sista tersebut dibekalkan dengan air.

Apabila dibekalkan dengan air, sista tersebut akan menyerap air dan ini membenarkan berlakunya proses embriogenesis anak udang. Embriogenesis ini akan selesai dalam lingkungan masa 16 sehingga 36 jam. Selepas inilah sista akan menetas untuk menjadi nauplii. Nauplii ini akan berwarna kemerahan kerana kehadiran kantung makanan yang berwarna. Sampai pada satu tahap dimana bekalan makanan tiada, *Chlorella* boleh dibekalkan sebagai sumber makanan (Colegate *et al.*, 1993). Walaubagaimanapun, untuk menjalankan ujian sitotoksik, nauplii tidak diberikan sebarang makanan.

Nauplii udang tidak menerima sebarang makanan sepanjang ujian. Untuk memastikan kemautan nauplii yang diperhatikan adalah hanya disebabkan oleh ketoksikan bahan ekstrak dan bukannya akibat ketiadaan makanan, satu set pengawalan nauplii disediakan. Nauplii boleh hidup tanpa makanan melebihi 48 jam kerana mereka bergantung kepada kantung makanan.

Ekstrak-ekstrak dengan kepekatan yang berbeza digunakan dalam ujian ini. Kepekatan yang disediakan adalah 10, 100, 500, 1000 dan 2000 $\mu\text{g/ml}$. Selepas 6 jam,

kemautan nauplii diperhatikan dan dikira untuk mendapatkan LC_{50} akut iaitu kepekatan membunuh bagi 50% kadar kematian selepas 6 jam pendedahan. Selepas 24 jam pula, kemautan nauplii diperhatikan dan dikira untuk mendapatkan LC_{50} kronik iaitu kepekatan membunuh bagi 50% kadar kematian selepas 24 jam pendedahan. Untuk ujian ketoksikan ini, perbandingan ketoksikan relatif perlu dilakukan. Kalium dikromat paling sesuai digunakan sebagai kawalan positif.

Untuk ujian aktiviti antibakteria, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (gram-positif) dan *Escherichia coli* (gram-negatif) digunakan sebagai organism ujian. Bakteria ini diinokulasi di dalam agar nutrisi. Kesan aktiviti antibakteria diuji dengan kaedah disk-difusi. Disk 6 mm dititiskan dengan 10 μ l ekstrak. Untuk disk kawalan pula, disk dititiskan dengan metanol (10 μ l/disk) untuk kawalan negatif dan untuk kawalan positif, disk dititiskan dengan Amoxycillin (10 μ l/disk). Plat diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Selepas semalaman, zon penyekatan (inhibition) diukur.

Grosvenor *et al.* (1995) menyatakan bahawa bakteria gram-positif kekurangan membran luar walaupun mempunyai lapisan peptidoglikan yang lebih tebal berbanding bakteria gram-negatif. Faktor ini jugalah yang menyebabkan bakteria tersebut tidak mampu untuk menghalang penyekatan ekstrak tumbuhan. Selain itu, menurut beliau, tannin yang mempunyai jisim molekul relatif yang tinggi adalah toksik kepada *S.aureus* tetapi tidak kepada *E.coli*.

RUJUKAN

- Adel M. Mahasneh dan Ahmad A. El-Oqlah, 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology* **64** (3), 271-276.
- Alzoreky N. S. dan Nakahara K., 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology* **80** (3), 223-230.
- Braca A., Fico G., Morelli I., De Simone F., Tome F. dan De Tommasi N., 2003. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. *Journal of Ethnopharmacology* **86**, 63-67.
- Braca A., Sortino C., Politi M., Morelli I. dan Jeannette Mendez, 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology* **79**, 379-381.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* **94** (3), 223-253.
- Chang L. W., Yen W. J, Huang S. C. dan Duh P. D, 2002. Antioxidant activity of sesame coat. *Journal of Food Chemistry* **78**, 347-354.
- Colegate S. M. dan Molyneux R. J., 1993. *Bioactive natural products: Detection, Isolation, and structural determination*. CRC Press, Boca Roton, 421-460.
- Demo A., Petrakis C., Kefalas P. dan Boskou D., 1998. Nutrient antioxidant in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International* **31** (5), 351-354.
- Dobner M. J., Schwaiger S., Jenewein I. H. and Stuppner H, 2003. Antibacterial activity of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss). *Journal of Ethnopharmacology* **89** (2-3), 301-303.
- Fennell C. W., Lindsey K. L., McGaw L. J., Sparg S.G., Stafford G. I., Elgorashi E. E., Grace O. M. dan Staden J. V., 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* **94** (2-3), 205-217.



- Grosvenor P. W., Supriono A. dan Gray D. O., 1995. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology* **45**, 97-111.
- Habsah M., Amran M., Mackeen M. M., Lajis N. H., Kikuzaki H., Nakatani N., A.A. Rahman A. A., Ghafar dan Ali A. M., 2000. Screening of Zingiberacea extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 403-410.
- Hwang J. K., Chung J. Y., Baek N. I dan Park J. H., 2004. Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **23** (4), 377-381.
- Langfield R. D., Scarano F. J., Heitzman M. E., Kondo M., Hammond G. B. dan Neto C. C., 2004. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology* **94** (2-3), 279-281.
- Larsen K, Ibrahim H, Shaw SH dan Saw LG, 1999. *Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore*. Kota Kinabalu: Natural History Publication (Borneo).
- Lee L. M. dan Hasnah M. Sirat, 2000. Kandungan Kimia dan Bioaktiviti daripada Dua Spesies *Zingiber*. *Proceeding of the 16th National Seminar on Natural Products*, 24-25 October, Skudai, Johor, 28-32.
- Mackeen M. M., Ali A. M., Lajis N. H., Kawazu K., Hassan Z., Amran M., Habsah M., Mooi L. Y. and Mohamed S. M., 2000. Antimicrobial, antioxidant, antitumour promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. *Journal of Ethnopharmacology* **72** (3), 395-402.
- Mohd Zin Z., Abdul-Hamid A. dan Osman A., 2002. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Journal of Food Chemistry* **78**, 227-231.
- Moure A., Cruz J. M., Franco D., Domínguez J. M., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M. dan Parajó J. C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Journal of Food Chemistry* **72**, 145-171.
- Siddhuraju P., Mohan P. S. dan Becker K., 2002. Studies on the activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Journal of Food Chemistry* **79**, 61-67.



Solis, P N., Wright, C W., Anderson, M M., Gispsta M P., dan Phillipson, J D (1993), *Plant Medica*, **59**, 250-252.

Voravuthikunchai S., Lortheeranuwat A, Jeeju W., Sririrak T., Phongpaichit S. dan Supawita T., 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 . *Journal of Ethnopharmacology* **94** (1) , 49-54.

Plant	Log CFU/ml	CFU/ml	Zone of Inhibition (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₉₀ (µg/ml)	IC ₉₅ (µg/ml)
1	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
2	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
3	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
4	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
5	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
6	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
7	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
8	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
9	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
10	7.0	10 ⁷	15	10	20	30

Table 1: In vitro activity of medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.

Plant	Log CFU/ml	CFU/ml	Zone of Inhibition (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₉₀ (µg/ml)	IC ₉₅ (µg/ml)
1	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
2	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
3	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
4	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
5	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
6	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
7	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
8	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
9	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
10	7.0	10 ⁷	15	10	20	30

Table 2: In vitro activity of medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.

Plant	Log CFU/ml	CFU/ml	Zone of Inhibition (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₉₀ (µg/ml)	IC ₉₅ (µg/ml)
1	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
2	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
3	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
4	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
5	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
6	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
7	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
8	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
9	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
10	7.0	10 ⁷	15	10	20	30

Table 3: In vitro activity of medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.

Plant	Log CFU/ml	CFU/ml	Zone of Inhibition (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₉₀ (µg/ml)	IC ₉₅ (µg/ml)
1	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
2	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
3	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
4	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
5	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
6	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
7	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
8	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
9	7.0	10 ⁷	15	10	20	30
10	7.0	10 ⁷	15	10	20	30