

Sains Malaysiana 40(5)(2011): 457–466

Kesan Sitotoksik dan Aktiviti Anti-MRSA Ekstrak Metanol *Phyllanthus gracilipes* dan *Phyllanthus columnaris*

(Cytotoxic Effect and Anti-MRSA Activity of Methanolic Extracts of *Phyllanthus gracilipes* and *Phyllanthus columnaris*)

G. M. FAZARI, A. AZILAWATY, I. NAZLINA* & W. A. YAACOB

ABSTRAK

Satu kajian telah dijalankan untuk menguji kesan sitotoksik dan aktiviti antibakteria ekstrak metanol dari bahagian berbeza tumbuhan *Phyllanthus gracilipes* dan *P. columnaris*. Pengekstrakan dilakukan pada suhu bilik dan menggunakan alat-radas Soxhlet untuk menghasilkan 22 ekstrak. Ujian fitokimia ke atas ekstrak Soxhlet menunjukkan kehadiran saponin dalam semua ekstrak manakala steroid terdapat dalam ekstrak semua bahagian *P. gracilipes* dan 3 daripada ekstrak *P. columnaris*. Ujian sitotoksik ke atas kultur sel Vero menunjukkan hanya empat ekstrak yang sitotoksik dengan nilai LC_{50} di bawah $20 \mu\text{g/mL}$ iaitu ekstrak suhu bilik kulit-batang *P. gracilipes*, ekstrak Soxhlet kayu-batang dan daun *P. gracilipes* serta ekstrak suhu bilik kayu-akar *P. columnaris*. Ekstrak suhu bilik dan Soxhlet kayu-batang *P. gracilipes* serta semua ekstrak suhu bilik *P. columnaris* merencat pertumbuhan 13 pencilan *Staphylococcus aureus* Rintang-Metisillin (MRSA) yang diuji.

Kata kunci: Aktiviti antibakteria; kesitotoksikan; *Phyllanthus columnaris*; *Phyllanthus gracilipes*; sel Vero

ABSTRACT

A study was carried out to test the cytotoxic effect and antibacterial activity of methanol extracts from different parts of *Phyllanthus gracilipes* and *P. columnaris*. The extraction was done at room temperature and using a Soxhlet apparatus to produce 22 extracts. Phytochemical test on the extracts produced using Soxhlet showed the presence of saponins in all the extracts whilst steroids were found in all *P. gracilipes* parts and only in 3 extracts of *P. columnaris*. Cytotoxic tests on Vero cell culture revealed four extracts were cytotoxic with LC_{50} values below $20 \mu\text{g/mL}$ i.e. room temperature extract of *P. gracilipes* stem-bark, Soxhlet extracts of *P. gracilipes* stem-wood and leaves, and room temperature extract of *P. columnaris* root-wood. Room temperature and Soxhlet extracts of *P. gracilipes* stem-wood, and all room temperature extracts of *P. columnaris* inhibited the growth of 13 isolates of MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) tested.

Keywords: Antibacterial activity; cytotoxicity; *Phyllanthus columnaris*; *Phyllanthus gracilipes*; Vero cell

PENGENALAN

Phyllanthus dengan lebih daripada 700 spesies merupakan antara genus terbesar dalam famili Euphorbiaceae dan mereka tersebar luas di kawasan tropika dan subtropika (Holm-Nielsen 1979). Dua-puluh spesies *Phyllanthus* terdapat di Semenanjung Malaysia menurut Turner (1995) yang terdiri daripada *P. albidiscus*, *P. amarus*, *P. chamaepeuce*, *P. columnaris*, *P. debilis*, *P. elegans*, *P. emblica*, *P. filicifolius*, *P. gomphocarpus*, *P. gracilipes*, *P. oxyphyllus*, *P. pachyphyllus*, *P. pulcher*, *P. reticulatus*, *P. ridleyanus*, *P. roseus*, *P. sikkimensis* dan *P. urinaria* dengan *P. filicifolius* dan *P. watsonii* adalah endemik. Beberapa spesies *Phyllanthus* digunakan secara meluas dalam perubatan tradisional di negara tropika dan subtropika. Menurut de Padua dan Bunyapraphatsara (1999), *Phyllanthus* spp. digunakan dalam amalan Ayurveda sejak 2000 tahun lalu untuk merawat konjunktivitis, cirit-birit, diabetes dan penyakit kelamin. Menurut

Mitra dan Jain (1987) pula, tiga spesies *Phyllanthus* iaitu *P. amarus*, *P. fraternus* dan *P. maderaspatensis* digunakan oleh masyarakat di India sebagai astringen untuk mengecutkan tisu dan saluran darah.

Beberapa kajian saintifik dilakukan ke atas spesies *Phyllanthus* bagi membuktikan kehadiran bahan bioaktif yang mempunyai nilai perubatan. Ujian antivirus oleh Unander et al. (1990) menjelaskan bahawa ekstrak akuas *P. amarus*, *P. debilis*, *P. fraternus*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. mimicus* dan *P. odontadenius* mengandungi bahan bioaktif yang merencat aktiviti DNA polimerase hepadnavirus seperti virus Hepatitis B (HBV) dan virus lain yang menyebabkan hepatitis kepada haiwan. Selain itu Yang et al. (2005) menyatakan bahawa ekstrak aseton, etanol dan metanol *P. urinaria* menghalang jangkitan HSV-2 secara *in vitro*. Sureban et al. 2006 pula menjalankan kajian kesan *in vitro* ekstrak *P. urinaria*, *P. amarus* dan *P. debilis* ke atas pengawalan pembahagian sel dan pengekspresan gen HepG2 sel karsinoma. Sebatian yang aktif sebagai

anti-HIV-1 telah dipencilkan daripada *P. gracilipes* (Bowornkienkai et al. 2009).

Berdasarkan kajian yang dijalankan terhadap tumbuhan spesies *Phyllanthus*, kebanyakan spesies yang dikaji terbukti mempunyai potensi besar dalam bidang perubatan. Justeru itu, kajian ini dijalankan bagi menguji ekstrak dua spesies *Phyllanthus* tempatan iaitu *P. gracilipes* dan *P. columnaris*. Kajian dilakukan untuk mengetahui kehadiran bahan fitokimia, aktiviti antibakteria dan kesan sitotoksik terhadap sel normal kedua-dua spesies *Phyllanthus* ini yang diekstrak menggunakan metanol.

BAHAN DAN KAEDAH

TUMBUHAN KAJIAN

Kedua-dua tumbuhan *Phyllanthus gracilipes* dan *P. columnaris* diperolehi dari Pulau Langkawi, Kedah Darul Aman pada Jun 2007. Spesimen tumbuhan masing-masing dengan nombor baucer WYA 129 dan WYA 131 disimpan di Herbarium Universiti Kebangsaan Malaysia. Empat bahagian tumbuhan yang setara digunakan daripada kedua-dua *P. gracilipes* dan *P. columnaris* adalah kayu-batang, daun, kulit-batang dan bilah-daun manakala akar bagi *P. gracilipes* terbahagi kepada kayu-akar manakala kulit-akar bagi *P. columnaris*. Perbezaan ini berlaku kerana bahagian akar *P. columnaris* mempunyai kulit-akar tebal yang boleh dipisahkan dengan mudah dari kayu-akar. Kesemua 11 bahagian tumbuhan ini dikeringkan di tempat teduh dan berperedaran udara selama dua minggu sebelum dikisar (Disk Mill FFC-23, Rizhao Peakrising International, China) sehingga menjadi serbuk halus.

PENGEKSTRAKAN *Phyllanthus Gracilipes* DAN *Phyllanthus Columnaris*

Pengekstrakan dilakukan dengan metanol 99.8% (System) pada suhu bilik dan dengan menggunakan alat-radas *Soxhlet*. Dalam pengekstrakan pertama, serbuk bahagian tumbuhan direndam dalam metanol sambil digoncang selama 48 jam menggunakan alat penggoncang automatik (Orbital Shaker S01, Stuart Scientific, UK). Bagi keadaan pengekstrakan kedua pula, serbuk kering bahagian tumbuhan diekstrak dengan metanol menggunakan alat-radas *Soxhlet* (Büchi, Jerman) selama 16 jam. Larutan pengekstrakan dituras dan cecair turasan dipekatkan menggunakan pengewap berputar (Büchi Rotavapor R-124, Jerman) sebelum dikeringkan pada suhu bilik bagi memperolehi ekstrak.

PENYARINGAN FITOKIMIA

Ujian saringan fitokimia dijalankan untuk menentukan kehadiran alkaloid, triterpena, steroid dan saponin dalam ekstrak *Phyllanthus gracilipes* dan *P. columnaris*. Penyaringan alkaloid dilakukan ke atas sedikit ekstrak metanol sebagai ganti bahan tumbuhan mengikut kaedah yang dicadangkan oleh Culvenor dan Fitzgerald (1963) menggunakan reagen Mayer. Ujian kimia Liebermann-

Burchardt bagi menguji kehadiran steroid dan terpenoid melibatkan kemunculan warna hijau bagi kehadiran steroid dan merah jambu ke merah bagi kehadiran triterpena (Vani et al. 1997). Kehadiran saponin dalam ekstrak ditentukan menggunakan kaedah Simes et al. (1959). Baki ekstrak yang tidak larut dalam pelarut dietil eter ditambahkan 10 mL air suling dan digoncang selama 30 saat. Kehadiran saponin disahkan apabila terdapat pembentukan buih dalam tempoh tersebut.

PENSUBKULTURAN SEL

Proses pensubkulturan sel ujian iaitu sel Vero (sel ginjal monyet hijau Afrika, *Cercopithecus aethiops*) yang diperolehi daripada simpanan kultur Makmal Virologi, Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia dibuat mengikut seperti apa yang dicadangkan oleh Freshney (2005). Pertumbuhan sel berlaku dengan kehadiran medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Flowlab, Australia) yang ditambah 10% (i/i) serum janin lembu (fetal bovine serum, FBS) (Flowlab, Australia) dan dieram pada 37°C dengan kehadiran CO₂ 5% sehingga sel ekalapis diperolehi.

Bagi tujuan pensubkulturan dan pemiringan sel, bilangan sel perlu mencapai 2.5×10^5 sel/mL dengan menggunakan hemasitometer jenis Neubauer (Hawksley, England). Pewarnaan sel dilakukan dengan tripan biru (Gibco) bagi mewarnakan sel mati tanpa mewarnakan sel hidup. Cerapan sel dibuat melalui mikroskop cahaya terbalik (Olympus CKX31, Japan). Semua uji kaji berkaitan kultur sel dijalankan di dalam kebuk aliran laminar jenis II (Model Nu-425-400, Nuaire, Amerika Syarikat).

UJIAN KESITOTOKSIKAN

Kepekatan stok larutan ekstrak *Phyllanthus* adalah 1.0 mg/mL yang disediakan dengan melarutkan 1 mg ekstrak dalam 50 µL metanol dan 950 µL DMEM 5% FBS. Alat sonikasi jenis Branson 5200 (Amerika Syarikat) digunakan untuk mengemulsi ekstrak selama 40 min sebelum pencairan dua kali ganda dilakukan dalam DMEM 5% FBS bagi menghasilkan larutan ekstrak pada kepekatan 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.016 dan 0.008 mg/mL.

Bagi tujuan pemiringan sel Vero, piring mikrotiter 96 telaga digunakan. Sebanyak 50 µL ampai sel dengan kepekatan berbeza ditambahkan ke dalam setiap telaga. Telaga pertama hingga ketiga dijadikan kawalan positif dengan masing-masing ditambahkan sel pada kepekatan 2.5×10^5 , 1.25×10^5 dan 0.625×10^5 sel/mL. Bagi kawalan negatif (100% kematian sel, LC₁₀₀), 50 µL DMEM tanpa sel ditambahkan ke dalam telaga kedua belas. Sel pada kepekatan 2.5×10^5 sel/mL dimasukkan ke dalam telaga keempat hingga telaga kesebelas. Piring dieram selama 48 jam pada 37°C dengan CO₂ 5% agar lapisan ekalapis terbentuk. Sebanyak 50 µL larutan ekstrak ujian dimasukkan ke dalam setiap telaga yang mengandungi sel ekalapis manakala 50 µL garam berpenimbal fosfat

(phosphate buffered saline, PBS) dimasukkan ke dalam setiap telaga kawalan sel dan kawalan negatif (LC_{100}) dan dieram selama 24 jam pada $37^{\circ}C$ dengan CO_2 5%.

Teknik pewarnaan sel adalah mengikut kaedah pewarnaan dengan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] berdasarkan Andrighetti-Fröhner et al. (2003). Enzim dehidrogenase mitokondria pada sel hidup akan memotong gelang tetrazolium menyebabkan terbentuknya hablur ungu formazan yang tidak larut dalam larutan akuas. Selepas eraman, larutan MTT dikeluarkan dengan perlahan dan ditambah 100 μ L DMSO ke dalam setiap telaga sebelum digoncang dengan perlahan selama lima minit. DMSO berfungsi sebagai bahan kimia pelarut formazan. Nilai serapan optik dibaca dari alat pembaca piring mikrotiter (Laboratory System Multiscan, Finland) pada jarak gelombang 540 nm.

Nilai LC_{50} merupakan kepekatan ekstrak yang menyebabkan kematian 50% sel hidup, diperolehi secara terus dari graf peratus kemandirian sel melawan kepekatan ekstrak. Peratus kemandirian sel boleh dikira melalui rumus yang dicadangkan oleh Semple et al. (1998):

$$\text{Peratus kemandirian sel} = \frac{\text{Serapan Optik}_{\text{ujian}} - \text{Serapan Optik}_{\text{kawalan negatif}}}{\text{Serapan Optik}_{\text{sel}} - \text{Serapan Optik}_{\text{kawalan negatif}}} \times 100.$$

Nilai 50% kematian sel (LC_{50}) ekstrak ditetapkan sebagai titik tengah di antara kawalan sel hidup sepenuhnya (LC_0) dan kawalan telaga kosong atau kematian sel 100% (LC_{100}).

UJIAN PENYARINGAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA

Ujian aktiviti antibakteria dijalankan ke atas 24 sampel bakteria menggunakan kaedah resapan cakera (Bauer et al. 1966). Ini melibatkan tujuh belas bakteria Gram-positif (G+) yang terdiri daripada *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Staphylococcus epidermidis* (S618), *Streptococcus faecalis* (S454), *Bacillus subtilis* (B145) serta 13 pencilan klinikal MRSA (G+) dan tujuh bakteria Gram-negatif (G-) iaitu *Escherichia coli* (E113), *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* (S913), *Vibrio cholerae* (V63), *Salmonella typhi* (S1179), *Salmonella typhimurium* (S1243), *Klebsiella pneumoniae*, dari simpanan kultur Makmal Mikrobiologi Patogen, Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Kepekatan stok ekstrak *Phyllanthus* adalah 50 mg/mL yang disediakan dengan melarutkan 50 mg ekstrak dalam 50 μ L metanol dan ditambah 950 μ L PBS. Stok kemudiannya dicairkan kepada 20, 10 dan 5 mg/mL. Bacteria ujian dengan kepekatan 10^7 sel/mL disebarkan ke atas agar Mueller-Hinton (MHA) menggunakan putik kapas steril dan dibiarkan selama lima belas minit. Cakera kosong steril berdiameter 6 mm dicelup dengan ekstrak *Phyllanthus* berkepekatan 50, 20, 10 atau 5 mg/mL. Antibiotik komersial digunakan sebagai kawalan positif manakala cakera yang dicelup dengan PBS digunakan sebagai kawalan negatif. Diameter zon perencatan

pertumbuhan bakteria dan kepekatan perencatan minimum (MIC) dicerap selepas eraman selama 24 jam pada $37^{\circ}C$.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Pengekstrakan metanol bahagian berbeza *P. gracilipes* dan *P. columnaris* pada suhu bilik dan menggunakan alat-radas Soxhlet menghasilkan 22 ekstrak dengan peratusan yang berbeza (Jadual 1 & 2). Pelarut polar metanol digunakan untuk mengekstrak kedua-dua tumbuhan ini bagi mengeluarkan hampir kesemua sebatian yang terdapat di dalam sampel (Eloff 1998). Jika diperhatikan pada setiap bahagian tumbuhan yang digunakan, pengekstrakan metanol menggunakan alat radas Soxhlet lebih berkesan daripada pengekstrakan biasa pada suhu bilik dengan menghasilkan peratus berat ekstrak yang lebih besar. Selain daripada itu, bahagian lembut tumbuhan (daun, kulit-batang dan bilah-daun) *P. gracilipes* menghasilkan lebih banyak ekstrak berbanding bahagian keras (kayu-batang dan akar). Keadaan sama juga berlaku bagi *P. columnaris* kecuali bahagian bilah-daun yang memberi hanya sedikit hasil ekstrak.

Analisis penyaringan bahan kimia menunjukkan kesemua ekstrak daripada kedua-dua spesies *Phyllanthus* tidak mengandungi alkaloid dan triterpena. Sebaliknya, saponin didapati hadir dalam semua ekstrak *P. gracilipes* dan *P. columnaris* manakala steroid pula hadir dalam semua ekstrak kecuali pada ekstrak kayu-batang, kayu-akar dan kulit-akar *P. columnaris* (Jadual 1 & 2). Ramesh et al. (2004) melaporkan kehadiran saponin dalam ekstrak metanol *P. singampattiana*. Saponin mempunyai ciri-ciri permukaan yang terdiri dari bahagian larut air dan bahagian larut lemak sama ada dari saponin steroid atau saponin triterpenoid (Cheeke 2000). Terdapat banyak aktiviti farmakologi saponin yang bertindak sebagai antibiotik, antikulat, antivirus, perlindungan hati, anti-keradangan dan anti-ulser yang dilaporkan oleh Soetan et al. (2006). McRae et al. (2007) menyifatkan, saponin tidak perlu dikaji secara meluas kerana ianya mempunyai ciri hemolitik. Saponin mendapat perhatian semula apabila sesetengah tumbuh-tumbuhan yang mempunyai ciri perubatan termasuk ginseng mempunyai saponin yang dapat digunakan dengan selamat dalam industri farmaseutikal. Oliveira et al. (2007) pula melaporkan beberapa tumbuhan ubatan seperti *Biden pilosa*, *Kalanchoe* sp., *Sambucus nigra* dan *Smilax* sp. yang diekstrak menggunakan metanol mengandungi steroid.

Bowornkiengkai et al. (2009) mendapati sebatian terbitan ardimerin dan asid ellagik serta lignan dapat dipisahkan daripada bahagian atas pokok *P. gracilipes*. Sebatian taiwanin C didapati mempunyai aktiviti anti-HIV-1 yang aktif tetapi anti-sinsitium yang lemah. Bahagian akar *P. columnaris* yang diekstrak dengan etil asetat pula didapati mengandungi lupenone, stigmasterol, sitosterol dan bergenin (Jamal et al. 2009)

Ujikaji kesitotoksikan yang dijalankan ke atas sel Vero menunjukkan empat ekstrak yang memberi nilai LC_{50} di bawah 20 μ g/mL iaitu ekstrak metanol suhu bilik kulit-batang *P. gracilipes* (A3), ekstrak Soxhlet kayu-batang (B1)

JADUAL 1. Ciri hasil pengekstrakan dan kandungan bahan aktif ekstrak metanol pelbagai bahagian *Phyllanthus gracilipes* serta kepekatan yang menyebabkan 50% kematian sel Vero (nilai LC₅₀)

Sampel ekstrak	Kod ekstrak	*Hasil ekstrak (% b/b)	Warna	Kehadiran		Nilai LC ₅₀ (µg/mL)
				Saponin	Steroid	
Suhu bilik						
Kayu-batang	A1	2.06	coklat	td	td	262
Daun	A2	14.72	hijau	td	td	770
Kulit-batang	A3	9.40	coklat	td	td	19
Bilah-daun	A4	8.80	hijau	td	td	96.8
Akar	A5	4.04	merah	td	td	438
Soxhlet						
Kayu-batang	B1	3.46	coklat	1+	+	12
Daun	B2	18.88	hijau	2+	+	10
Kulit-batang	B3	16.41	coklat	4+	+	27.5
Bilah-daun	B4	13.32	hijau	1+	+	109
Akar	B5	7.19	merah	2+	+	188

* Berat kering ekstrak (g)/100 g serbuk kering

td – Tidak diuji

JADUAL 2. Ciri hasil pengekstrakan dan kandungan bahan aktif ekstrak metanol pelbagai bahagian *Phyllanthus columnaris* serta kepekatan yang menyebabkan 50% kematian sel Vero (nilai LC₅₀)

Sampel ekstrak	Kod ekstrak	*Hasil ekstrak (% b/b)	Warna	Kehadiran		Nilai LC ₅₀ (µg/mL)
				Saponin	Steroid	
Suhu bilik						
Kayu-batang	C1	3.25	coklat	td	td	94
Daun	C2	9.78	hijau	td	td	188
Kulit-batang	C3	10.87	coklat	td	td	500
Bilah-daun	C4	4.00	hijau	td	td	500
Kayu-akar	C5	4.74	merah	td	td	18
Kulit-akar	C6	10.96	merah	td	td	65
Soxhlet						
Kayu-batang	D1	3.90	coklat	1+	-	850
Daun	D2	13.98	hijau	1+	+	750
Kulit-batang	D3	18.91	coklat	1+	+	375
Bilah-daun	D4	6.54	hijau	1+	+	750
Kayu-akar	D5	7.08	merah	1+	-	250
Kulit-akar	D6	14.46	merah	1+	-	94

* Berat kering ekstrak (g)/100 g serbuk kering

td – Tidak diuji

dan daun *P. gracilipes* (B2) serta ekstrak suhu bilik kayu-akar *P. columnaris* (C5) (Jadual 1 & 2). Menurut Wall et al. 1987, bahan uji dianggap toksik apabila nilai LC₅₀ kurang daripada 20 µg/mL. Berdasarkan kajian ini, kebanyakan ekstrak daripada kajian ini sesuai untuk digunakan sebagai agen terapeutik antibakteria berikutan sifatnya yang tidak toksik terhadap sel Vero yang merupakan sel ginjal normal pada kepekatan melebihi 20 µg/mL.

Nilai LC₅₀ bagi ekstrak suhu bilik *P. gracilipes* iaitu A1, A2, A5 didapati sangat besar berbanding ekstrak Soxhlet (B1, B2 dan B5). Begitu juga terdapat perbezaan nilai LC₅₀ bagi ekstrak suhu bilik dan Soxhlet *P. columnaris*. Perbezaan kaedah pengekstrakan mengakibatkan kandungan bahan aktif berbeza terlarut didalam bahan-bahan yang diuji dalam kajian ini. Penguraian sebahagian

sebatian tumbuhan pada suhu yang tinggi boleh berlaku (Ramesh et al. 2004). Akibatnya kepelbagaian nilai LC₅₀ bagi bahan uji telah dapat dilihat.

Kajian kesan sitotoksik ekstrak metanol daripada tumbuhan *P. piscatorum* ke atas sel HeLa memberikan nilai LC₅₀ pada kepekatan 18 µg/mL setelah diuji selama 72 jam (Gertsch et al. 2004). Nilai ini menunjukkan ekstrak yang diperolehi daripada *P. piscatorum* sangat toksik terhadap sel HeLa yang merupakan sel kanser serviks dan menunjukkan potensi sebagai bahan antikanser. Dalam kajian ini, ujian kesitotoksikan terhadap sel kanser tidak dilakukan. Potensi antikanser bagi *P. gracilipes* dan *P. columnaris* boleh dikaji dengan lebih lanjut.

Dalam ujian aktiviti antibakteria, ekstrak A3, B3 dan C3 menunjukkan perencatan terhadap kesemua

JADUAL 3. Diameter zon perencatan-DZP (mm) bakteria oleh antibiotik komersil sebagai kawalan positif dan ekstrak metanol pelbagai bahagian *Phyllanthus gracilipes* pada kepekatan 50 mg/ml dan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) (mg/mL) terhadap bakteria ujian

Bakteria ujian	V		P		K		A1		A2		A3		A4		A5		
	DZP	DZP	DZP	DZP	DZP	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC
<i>S. aureus</i>	21	TD	TD	TD	TD	TD	>50	6	>50	6	>50	18	20	6	>50	10	50
<i>S. epidermidis</i>	TD	16	TD	6	6	6	>50	9	20	20	16	20	20	6	>50	6	>50
<i>E. coli</i>	TD	TD	25	6	6	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>P. aeruginosa</i>	TD	TD	15	6	6	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. marcescens</i>	TD	TD	15	8	6	6	50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. thyphimurium</i>	TD	TD	22	6	6	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	50/8	6	>50
<i>S. thypi</i>	TD	TD	22	6	6	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>V. cholerae</i>	TD	TD	23	6	6	6	>50	10	20	20	10	20	20	6	>50	6	>50
<i>B. subtilis</i>	10	TD	TD	6	6	6	>50	8	50	50	8	20	20	6	>50	6	>50
<i>K. pneumoniae</i>	TD	TD	16	6	6	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. faecalis</i>	TD	14	TD	6	6	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
MRSA HUKM 01	16	TD	TD	6	6	6	>50	12	5	5	11	5	5	6	>50	6	>50
MRSA S921WHO QC	15	TD	TD	6	6	6	>50	6	>50	6	13	10	10	11	10	9	50
MRSA HS 01	16	TD	TD	11	6	6	>50	6	>50	6	11	10	10	6	>50	6	>50
MRSA HS 02	18	TD	TD	10	10	10	10	11	5	5	12	5	5	13	5	11	10
MRSA HS 03	17	TD	TD	6	6	6	>50	10	10	10	13	10	10	11	10	11	10
MRSA HS 04	16	TD	TD	6	6	6	>50	6	>50	6	20	5	5	10	10	10	10
MRSA HS 05	15	TD	TD	6	6	6	>50	17	5	5	17	5	5	13	10	11	10
MRSA HTJ 01	20	TD	TD	6	6	6	>50	14	20	20	15	5	5	6	>50	6	>50
MRSA HTJ 02	19	TD	TD	10	10	10	10	14	5	5	14	5	5	6	>50	6	>50
MRSA HTJ 03	13	TD	TD	11	6	6	50	14	5	5	13	5	5	6	>50	11	50
MRSA HTJ 04	14	TD	TD	9	6	6	50	12	5	5	14	5	5	6	>50	12	50
MRSA HTJ 05	15	TD	TD	11	6	6	10	12	5	5	11	10	10	6	>50	12	10
MRSA HTJ 06	15	TD	TD	6	6	6	>50	12	10	10	12	10	10	6	>50	6	>50

Petunjuk : V = vankomisin (30 UI), P=Penisilin (10 UI), K= Kloramfenikol (30 UI) A1=Ekstrak suhu bilik kayu-batang; A2=Ekstrak suhu bilik daun; A3=Ekstrak suhu bilik kulit-batang; A4=Ekstrak suhu bilik bilih-daur; A5=Ekstrak suhu bilik akar. DZP= 6 iaitu saiz cakera 6mm - tiada perencatan ditunjukkan. TD= tidak diuji

JADUAL 4. Diameter zon perencatan-DZP (mm) bakteria oleh ekstrak metanol pelbagai bahagian *Phyllanthus gracilipes* pada kepekatan 50 mg/ml dan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) (mg/mL) terhadap bakteria ujian

Bakteria ujian	B1			B2			B3			B4			B5		
	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	
<i>S. aureus</i>	8	50	6	>50	14	>50	20	8	50	6	>50	6	>50		
<i>S. epidermidis</i>	6	>50	6	>50	15	>50	20	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>E. coli</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>P. aeruginosa</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>S. marcescens</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>S. thyphimurium</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>S. thypi</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>V. cholerae</i>	6	>50	6	>50	15	>50	20	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>B. subtilis</i>	6	>50	6	>50	9	>50	20	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>K. pneumoniae</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
<i>S. faecalis</i>	6	>50	6	>50	6	>50	>50	6	>50	6	>50	6	>50		
MRSA HUKM 01	6	>50	11	10	18	10	5	15	10	10	10	10	10		
MRSA S921WHO QC	11	10	11	10	13	10	10	6	>50	6	>50	6	>50		
MRSA HS 01	6	>50	11	10	12	10	10	6	>50	6	>50	6	>50		
MRSA HS 02	11	10	10	10	11	10	10	13	10	6	>50	6	>50		
MRSA HS 03	6	>50	6	>50	14	>50	10	11	>50	6	>50	6	>50		
MRSA HS 04	6	>50	6	>50	19	>50	5	6	>50	11	>50	11	10		
MRSA HS 05	10	10	6	>50	16	>50	5	13	5	6	5	6	>50		
MRSA HTJ 01	6	>50	6	>50	14	>50	10	6	>50	6	>50	6	>50		
MRSA HTJ 02	6	>50	6	>50	11	>50	10	11	10	8	10	8	50		
MRSA HTJ 03	11	20	11	20	11	10	10	6	>50	11	>50	11	20		
MRSA HTJ 04	12	10	6	>50	14	>50	5	11	10	13	10	13	10		
MRSA HTJ 05	6	>50	6	>50	13	>50	10	13	10	6	10	6	>50		
MRSA HTJ 06	6	>50	6	>50	12	>50	10	6	6	6	6	6	>50		

Petunjuk : B1=Ekstrak *Soxhlet* kayu-batang; B2=Ekstrak *Soxhlet* kulit-batang; B3=Ekstrak *Soxhlet* bilah-daun; B4=Ekstrak *Soxhlet* akar; DZP= 6 iaitu saiz cakera 6mm - tiada perencatan ditunjukkan.

JADUAL 5. Diameter zon perencatan-DZP (mm) bakteria oleh ekstrak metanol pelbagai bahagian *Phyllanthus columnaris* pada kepekatan 50 mg/ml dan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) (mg/mL) terhadap bakteria ujian

Bakteria ujian	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC
<i>S. aureus</i>	6	>50	9	40	12	30	10	40	6	>50	13	30
<i>S. epidermidis</i>	6	>50	10	40	15	20	9	40	6	>50	14	20
<i>E. coli</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>P. aeruginosa</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. marcescens</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. thyphimurium</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. typhi</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>V. cholerae</i>	6	>50	6	>50	11	30	6	>50	6	>50	11	40
<i>B. subtilis</i>	6	>50	8	40	10	30	8	40	6	>50	9	30
<i>K. pneumoniae</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. faecalis</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
MRSA HUKM 01	6	>50	11	30	16	20	10	30	6	>50	14	30
MRSA S921WHO QC	6	>50	11	20	15	10	9	40	6	>50	13	20
MRSA HS 01	6	>50	6	>50	14	20	6	>50	6	>50	10	20
MRSA HS 02	6	>50	12	30	15	20	8	40	6	>50	12	20
MRSA HS 03	9	50	10	30	16	20	15	30	8	50	13	20
MRSA HS 04	15	10	9	40	17	10	15	30	13	20	15	10
MRSA HS 05	10	50	9	40	13	10	11	30	8	50	10	10
MRSA HTJ 01	6	>50	10	30	15	20	10	20	8	50	12	10
MRSA HTJ 02	6	>50	11	30	14	20	6	>50	6	>50	14	20
MRSA HTJ 03	6	>50	6	>50	10	40	6	>50	6	>50	6	>50
MRSA HTJ 04	8	50	10	30	16	20	8	50	9	40	10	50
MRSA HTJ 05	6	>50	9	50	12	20	9	40	6	>50	11	30
MRSA HTJ 06	11	40	6	>50	11	20	6	>50	6	>50	9	20

Petunjuk : C1=Ekstrak suhu bilik kayu-batang; C2=Ekstrak suhu bilik daun; C3=Ekstrak suhu bilik kulit-batang; C4=Ekstrak suhu bilik bilah-daun; C5=Ekstrak suhu bilik kayu-akar; C6=Ekstrak suhu bilik kulit-akar; DZP= 6 iaitu saiz cakera 6mm - tiada perencatan ditunjukkan.

JADUAL 6. Diameter zon perencatan-DZP (mm) bakteria oleh ekstrak metanol pelbagai bahagian *Phyllanthus columnaris* pada kepekatan 50 mg/ml dan nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) (mg/mL) terhadap bakteria ujian

Bakteria ujian	D1		D2		D3		D4		D5		D6	
	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC	DZP	MIC
<i>S. aureus</i>	6	>50	14	30	14	20	14	30	6	>50	11	30
<i>S. epidermidis</i>	6	>50	10	30	12	30	10	30	6	>50	12	20
<i>E. coli</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>P. aeruginosa</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. marcescens</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. thyphimurium</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. thypi</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>V. cholerae</i>	6	>50	10	20	14	20	10	20	6	>50	6	>50
<i>B. subtilis</i>	6	>50	9	50	9	30	9	50	9	50	9	40
<i>K. pneumoniae</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
<i>S. faecalis</i>	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
MRSA HUKM 01	6	>50	12	30	15	30	10	30	6	>50	14	20
MRSA S921WHO QC	6	>50	10	30	15	20	9	30	6	>50	13	20
MRSA HS 01	6	>50	9	30	13	20	6	>50	8	50	10	40
MRSA HS 02	6	>50	8	30	14	20	8	40	8	50	12	20
MRSA HS 03	6	>50	10	40	13	20	15	30	6	>50	13	30
MRSA HS 04	6	>50	15	30	17	20	15	10	12	40	15	10
MRSA HS 05	6	>50	6	>50	13	10	11	20	6	>50	10	40
MRSA HTJ 01	6	>50	10	30	14	20	10	30	11	40	12	20
MRSA HTJ 02	6	>50	9	40	16	20	6	>50	6	>50	14	20
MRSA HTJ 03	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50	6	>50
MRSA HTJ 04	6	>50	8	50	11	30	8	50	6	>50	10	40
MRSA HTJ 05	6	>50	9	40	11	30	9	40	6	>50	11	40
MRSA HTJ 06	6	>50	8	50	10	20	6	>50	6	>50	9	30

Petunjuk : D1=Ekstrak *Soxhlet* kayu-batang; D2=Ekstrak *Soxhlet* kulit-batang; D3=Ekstrak *Soxhlet* daun; D4=Ekstrak *Soxhlet* bilah-daun; D5=Ekstrak *Soxhlet* kayu-akar; D6=Ekstrak *Soxhlet* kulit-akar. DZP= 6 iaitu saiz cakera 6mm - tiada perencatan ditunjukkan.

pencilan klinikal MRSA yang diuji dengan diameter lebih besar daripada 9 mm yang merupakan diameter penentu bagi kerintang terhadap MRSA terutamanya apabila vankomisin digunakan (Jadual 3, 4, 5 & 6). MRSA adalah bakteria *Staphylococcus aureus* yang rintang terhadap antibiotik metisillin dan menjadi masalah utama dalam pengawalan jangkitan nosokomi. Hiramatsu et al. (2001), menyatakan terdapat pencilan MRSA klinikal yang didapati semakin rintang terhadap antibiotik vankomisin yang merupakan antibiotik utama dalam pengawalan jangkitan MRSA. Keupayaan ketiga-tiga ekstrak *Phyllanthus* ini merencat pertumbuhan MRSA dengan diameter yang besar menunjukkan bahawa ekstrak ini berpotensi tinggi untuk dijadikan sebagai bahan alternatif bagi merawat jangkitan MRSA. Walaupun begitu, berdasarkan ujian kesitotoksikan terhadap sel normal menunjukkan ekstrak A3 mempunyai nilai LC_{50} 19 $\mu\text{g/mL}$ iaitu kurang daripada nilai ambang selamat iaitu 20 $\mu\text{g/mL}$ (Jadual 1) manakala ekstrak B3 dan C3 mempunyai nilai LC_{50} melebihi nilai tersebut iaitu masing-masing 27.5 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$ (Jadual 1 & Jadual 2). Berdasarkan hasil yang diperolehi ini, aktiviti anti-MRSA dan mungkin kesitotoksikan B3 dengan nilai LC_{50} menghampiri 20 $\mu\text{g/mL}$ besar kemungkinan disumbangkan oleh kandungan saponin yang tinggi (Jadual 1). Kajian oleh Soetan et al. (2006) menunjukkan saponin yang diekstrak daripada *Sorghum bicolor* mempunyai aktiviti antibakteria terhadap bakteria gram positif yang menepati hasil yang diperolehi dalam kajian ini. Ekstrak B3 dan terutamanya C3 berpotensi untuk dibuat kajian lanjutan bagi mengenalpasti kehadiran bahan aktif sebenar dan mekanisme perencatan MRSA oleh ekstrak kulit-batang pokok *Phyllanthus* sp. ini.

Selain daripada itu, ekstrak kulit akar *P. columnaris* iaitu C6 dan D6 juga menunjukkan kebolehan untuk merencat hampir kesemua pencilan MRSA yang diuji termasuk 3 bakteria gram positif. Berdasarkan kandungan bahan kimia yang terdapat pada bahagian akar *P. columnaris* oleh Jamal et al. (2009), kehadiran lupenone, stigmaterol dan sitosterol berupaya menunjukkan kesan antibakteria seperti mana yang dilaporkan oleh Manríquez-Torres et al. (2007).

Kajian aktiviti antibakteria ekstrak metanol *P. singampattiana* menunjukkan perencatan terhadap bakteria gram positif (Ramesh et al. 2004). Manakala Kaur et al. (2005) pula menunjukkan ekstrak *P. amarus* berupaya menindas pertumbuhan beberapa patogen yang rintang terhadap dadah komersial. Hasil yang diperolehi daripada kajian ini dan juga dua kajian diatas, aktiviti antibakteria daripada genus *Phyllanthus* adalah amat aktif terhadap bakteria gram positif dan penentuan bahan aktif yang menyumbang kepada aktiviti ini akan dikaji dengan lebih lanjut. Selain daripada itu, potensinya terhadap virus dan sel kanser juga boleh dilakukan.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, ekstrak metanol bahagian berbeza tumbuhan *Phyllanthus gracilipes* dan *P. columnaris*

mempunyai aktiviti perencatan pertumbuhan bakteria terutamanya terhadap bakteria Gram-positif. Dua ekstrak yang menunjukkan kebolehan merencat pertumbuhan semula pencilan MRSA yang diuji tetapi tidak toksik terhadap sel Vero adalah ekstrak kulit-batang *Phyllanthus gracilipes* (B3) dan *P. columnaris* (C3). Hasil kajian ini menunjukkan bahawa ekstrak tumbuhan yang diuji mengandungi bahan aktif antibakteria yang tidak toksik kepada sel normal dan berpotensi sebagai agen terapeutik alternatif bagi menangani jangkitan MRSA atau amnya bakteria gram positif.

PENGHARGAAN

Terima kasih kepada Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia di atas bantuan kewangan bagi melakukan penyelidikan ini di bawah Skim Geran Penyelidikan Fundamental UKM-ST-01-FRGS0039-2006 dan geran Dana OUP (UKM-OUP-KPB-31-156/2010) serta Universiti Kebangsaan Malaysia di atas kemudahan penyelidikan yang disediakan.

RUJUKAN

- Andrighetti-Frohner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. & Simões, C.M.O. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(6): 843-848.
- Bowornkiengkai, T., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Pohmakotr, M. & Yoosook, C. 2009. Isolation and structure identification of compounds with anti-HIV-1 activity from anti-HIV-1 active *Phyllanthus gracilipes* (Euphorbiaceae). *Proceedings of the 35th. Congress on Science and Technology of Thailand*. http://www.scisoc.or.th/stt/35/sec_c/paper/STT35_C3_C0099.pdf. 1-6.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4): 493-496.
- Cheeke, P.R. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* 45: 241-254.
- Culvenor, C.C.J. & Fitzgerald, J.S. 1963. A field method for alkaloid screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52: 303-304.
- de Padua, L.S. & Bunyapraphatsara, N. (ed.). 1999. *Plant resources of South-East Asia*. Bogor: Prosea Foundation.
- Eloff, J.N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60(1): 1-8.
- Freshney, R.I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Ed. ke-5. Ottawa: Wiley-Liss.
- Gertsch, J., Niowame, Gertsch-Roost, K. & Sticher, O. 2004. *Phyllanthus piscatorum*, ethnopharmacological studies on a women's medicinal plant of the Yanomami Amerindians. *Journal of Ethnopharmacology* 91(2-3): 181-188.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 9(10): 486-493.

- Holm-Nielsen, L.B. 1979. Comments on the distribution and evolution of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). Dlm. *Tropical Botany*, disunting oleh Larsen, K. & Holm-Nielsen, L.B. New York: Academic Press.
- Jamal, A.K., Yaacob, W.A. & Din, L.B. 2009. A chemical study on *Phyllanthus columnaris*. *European Journal of Scientific Research* 28(1): 76-81.
- Kaur, S., Michael, H., Arora, S., Haerkoenen, P.L. & Kumar, S. 2005. The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala – an Indian herbal drug. *Journal of Ethnopharmacology* 97(1): 15-20.
- Manrriquez-Torres, J.J., Zúñiga-Estrada, A., González-Ledesma, M. & Torres-Valencia, J.M. 2007. The antibacterial metabolites and proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *J. Mex. Chem. Soc.* 51(4): 228-231.
- McRae, J., Yang, Q., Crawford, R. & Palombo, E. 2007. Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. *The Environmentalist* 27(1): 165-174.
- Mitra, R.L. & Jain, S.K. 1987. Concept of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) in Indian floras. *Bulletin of Botanical Survey of India* 27: 161-176.
- Oliveira, D.F., Pereira, A.C., Figueiredo, H.C.P., Carvalho, D.A., Silva, G., Nunes, A.S., Alves, D.S. & Carvalho, H.W.P. 2007. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia* 78(2): 142-145.
- Ramesh, N., Viswanathan, M.B., Selvi, V.T. & Lakshmanaperumalsamy, P. 2004. Antimicrobial and phytochemical studies on the leaves of *Phyllanthus singampattiana* from India. *Medicinal Chemistry Research* 13(6/7): 348-360.
- Semple, S.J., Reynolds, G.D., O'Leary, M.C. & Flower, R.L.P. 1998. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 60(2): 163-172.
- Simes, J.J.H., Tracey, J.G., Webb, L.J. & Dunstan, W.J. 1959. Australian phytochemical survey. III. Saponins in Eastern Australian flowering plants. *Bulletin No. 281*. CSIRO: Melbourne, Australia.
- Soetan, K.O., Oyekunle, M.A., Aiyelaagbe, O.O. & Fafunso, M. A. 2006. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor*. *African Journal of Biotechnology* 5(23): 2405-2407.
- Sureban, S.M., Subramaniam, D., Rajendran P., Ramanujam, R.P., Dieckgraefe, B.K., Houchen, C.W. & Anant, S. 2006. Therapeutic effect of *Phyllanthus* species: induction of TNF- α -mediated apoptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 1(4): 65-71.
- Turner, I.M. 1995. A catalogue of the vascular plants of Malaya. *The Gardens' Bulletin Singapore* 47(1): 1-346.
- Unander, D.W., Venkateswaran, P.S., Millman, I. Bryan, H.H. & Blumberg, B.S. 1990. *Phyllanthus* species: sources of new antiviral compounds. Dlm. *Advances in new crops*, disunting oleh Janick J. & Simon J.E. Portland: Timber Press.
- Vani, T.M., Rajani, S. & Sarkar, S. & Shishoo, C.J. 1997. Antioxidant properties of the Ayurvedic formulation Triphala and its constituents. *Int. J. Pharmacog.* 35(5): 313-317.
- Wall, M.E., Taylor, H. & Wani, M.C. 1987. Plant antitumor agents. 24. Rapid 9-KB assay. *Journal of Natural Products* 50(4): 764-766.
- Yang, C.M., Cheng, H.Y., Lin, T.C., Chiang, L.C. & Lin, C.C. 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection *in vitro*. *Antiviral Research* 67(1): 24-30.
- G.M. Fazari, A. Azilawaty & I. Nazlina*
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor D.E.
Malaysia
- W.A. Yaacob
Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor D.E.
Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: nazlina@ukm.my
- Diserahkan: 1 April 2010
Diterima: 1 September 2010