

**PENCIRIAN SEBATIAN BIOAKTIF DARIPADA *Triphasia trifolia*
(Burm. f.) P. Wilson (LIMAU KAYA) SEBAGAI BAHAN
ANTIBAKTERIA DAN BAHAN PENYINGKIR RADIKAL BEBAS**

oleh

KUEH BING LING

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

OKTOBER 2007

**PENCIRIAN SEBATIAN BIOAKTIF DARIPADA
Triphasia trifolia (Burm. f.) P. Wilson (LIMAU
KAYA) SEBAGAI BAHAN ANTIBAKTERIA DAN
BAHAN PENYINGKIR RADIKAL BEBAS**

KUEH BING LING

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2007

PENGHARGAAN

Di atas kesempatan ini, saya ingin menyampaikan setinggi-tinggi ucapan terima kasih kepada beberapa pihak yang telah banyak membantu dalam proses menyempurnakan kajian dan melengkapkan tesis ini. Penghargaan yang tak terhingga kepada Prof. Madya Dr. Shaida Fariza binti Sulaiman selaku penyelia saya yang telah banyak membantu. Budi beliau dalam menjayakan penyelidikan ini serta segala bantuan, tunjuk ajar, nasihat dan sokongan, saya sanjung dengan setinggi-tinggi penghargaan dan jutaan terima kasih.

Saya juga ingin mengucapkan berbanyak terima kasih kepada penyelia bersama saya iaitu Prof. Madya Dr. Uyub bin Abdul Manaf atas segala bantuan, nasihat dan bimbingan beliau selama kajian ini dijalankan.

Saya juga ingin tujukan penghargaan kepada ibu bapa dan keluarga tercinta yang banyak memberi dorongan dan semangat kepada saya. Segala jasa tidak akan ku lupakan sepanjang hayat.

Kepada teman-teman seperjuangan saya, khususnya makmal 106 (Suh In, Marisa, Fidah, Rozi, Tini, June, Leong, Wan, Kak Faizah dan Kak Farihan), makmal 207 (Kak Wan dan Encik Azlan) serta sahabat-sahabat yang lain (Shean Yen, Hui Mian, Chew Cheen, Goik Ching, Bee Yong, Sasi, Huey Shan, Hsiao Peng, Cheah Wee, Izan dan Susie) yang sering memahami, mendorong, menghibur, memberi semangat, berkongsi idea serta berkongsi masalah dengan saya, ribuan terima kasih saya ucapkan.

Tidak dilupakan juga ucapan terima kasih ditujukan kepada semua kakitangan Pusat Pengajian Sains Kajihayat khasnya Kak Nurul, En. Khairul, En. Muthu, En. Johari, Kak Jamilah, En. Rashid, En. Teoh dan Kak Sabariah kerana banyak membantu dan

memudahkan segala urusan dalam pelaksanaan kajian saya ini. Terima kasih juga kepada Dr. Mohd. Nizam Mordi dan En. Rahim dari Pusat Dadah Dan Ubat-Ubatan (LC-MS) serta En. Ariffin dari Pusat Pengajian Sains Kimia (UV spektrum) atas sokongan teknikal mereka.

Saya juga ingin merakamkan jutaan terima kasih kepada Universiti Sains Malaysia atas segala pembiayaan biasiswa (Skim Siswazah Pembantu) dan kemudahan yang diberikan sepanjang penyelidikan ini.

Akhir sekali, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada semua pihak yang terlibat secara langsung atau tidak langsung dalam pelaksanaan penyelidikan ini.

KUEH BING LING

Pusat Pengajian Sains Kajihayat, USM

Oktober 2007

KANDUNGAN

	Muka surat
PENGHARGAAN	ii
KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI PLAT	xiii
SENARAI RINGKASAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvii
BAB SATU : PENGENALAN	1
1.1 Pendahuluan	2
1.2 <i>Triphasia trifolia</i>	3
1.2.1 Pengenalan	3
1.2.2 Kegunaan <i>Triphasia trifolia</i>	5
1.2.3 Penyelidikan Ke Atas <i>Triphasia trifolia</i>	5
1.3 Antibakteria	6
1.3.1 Bahan Antibakteria	6
1.3.2 Mekanisme Tindakan Bahan Antibakteria	8
1.3.3 Bakteria <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i>	10
1.3.4 Potensi Tumbuhan Sebagai Bahan Antibakteria	12
1.3.5 Bahan Antibakteria Daripada Tumbuhan Dalam Famili Rutaceae	14
1.4 Antioksidan	16
1.4.1 Radikal Bebas	16
1.4.2 Bahan Antioksidan Dan Mekanisme Penyingkiran Radikal Bebas	17
1.4.3 Potensi Tumbuhan Sebagai Bahan Antioksidan	19
1.4.4 Bahan Antioksidan Daripada Tumbuhan Dalam Famili Rutaceae	21
1.5 Fitoaleksin	23
1.6 Objektif Kajian	26
BAB DUA : BAHAN DAN KAEDAH	27
2.1 Persampelan <i>Triphasia trifolia</i>	28
2.2 Pengekstrakan	28
2.3 Aktiviti Antibakteria Ekstrak <i>Triphasia trifolia</i>	29
2.3.1 Penyediaan Bakteria Patogen	29

2.3.2	Penyediaan Inokulum	30
2.3.3	Penyediaan Stok Ekstrak	30
2.3.4	Penyaringan Pelbagai Ekstrak <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap Bakteria	30
2.3.5	Kajian Ke Atas Ekstrak Dengan Aktiviti Antibakteria Terbaik	32
2.3.5.1	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC)	32
2.3.5.2	Kesan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit Ke Atas Profil Pertumbuhan Bakteria	35
2.3.5.3	Pemerhatian Struktur Sel Bakteria Melalui Mikroskop Elektron	36
2.3.5.3.1	Mikroskop Elektron Imbasan (SEM)	36
2.3.5.3.2	Mikroskop Elektron Transmisi (TEM)	37
2.4	Ujian Ketoksikan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i>	39
2.4.1	Ujian Ketoksikan Dengan Menggunakan Anak Udang Brin <i>Artemia salina</i>	39
2.4.2	Ujian Ketoksikan Dengan Menggunakan Darah Kambing	41
2.5	Ujian Antibakteria Ke Atas Sebatian Tersisih Plat Kromatografi Lapisan Nipis	42
2.6	Fraksinasi Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit Dengan Kromatografi Turus	43
2.6.1	Ujian Pembauran Cakera Setiap Fraksi Ke Atas Bakteria Terpilih	45
2.6.2	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) Terhadap Dua Fraksi Terbaik	46
2.6.3	Perbandingan Komponen Dalam Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit Dan Daun Tidak Berpenyakit	46
2.6.4	Penyaringan Fitokimia	46
2.6.4.1	Ujian Monoterpenoid	47
2.6.4.2	Ujian Diterpenoid	47
2.6.4.3	Ujian Triterpenoid	47
2.7	Aktiviti Antioksidan Ekstrak <i>Triphasia trifolia</i>	48
2.7.1	Penskrinan Ekstrak Dengan Menggunakan 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	48
2.7.2	Penulenan Sebatian Bioaktif Ekstrak Metanol Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i>	49
2.7.2.1	Penyisihan Ekstrak Menggunakan Pelarut BAW	49

2.7.2.2	Penyisihan Fraksi Menggunakan Pelarut Asid Asetik 15%	50
2.7.2.3	Penyisihan Fraksi Menggunakan Pelbagai Pelarut	51
2.8	Pengenalpastian Komponen Bioaktif Dalam Subfraksi Terpilih	51
2.8.1	Ujian Flavonoid Aglikon	51
2.8.2	Penentuan Struktur Berdasarkan Ujian Anjakan Spektrum UV	52
2.8.3	Kromatografi Cecair Dan Spektrofotometer Jisim (LC-MS)	53
2.9	Penentuan EC ₅₀ Bagi Sebatian Flavonoid Tulen Yang Telah Disisihkan	54
2.10	Analisis Statistik	54
BAB TIGA : KEPUTUSAN		56
3.1	Aktiviti Antibakteria Ekstrak <i>Triphasia trifolia</i>	57
3.1.1	Penyaringan Pelbagai Ekstrak Dari <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap Bakteria	57
3.1.2	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i>	63
3.1.3	Kesan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Ke Atas Profil Pertumbuhan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i>	64
3.1.4	Perubahan Morfologi Dan Struktur Sel <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i> Selepas Ditindak Dengan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i>	66
3.1.4.1	SEM	66
3.1.4.2	TEM	68
3.2	Ujian Ketoksikan	71
3.2.1	Ketoksikan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap Anak Udang Brin <i>Artemia salina</i>	71
3.2.2	Ketoksikan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Ke Atas Darah Kambing	75
3.3	Ujian Antibakteria Ke Atas Sebatian Tersisih Dari Plat Kromatografi Lapisan Nipis (TLC)	76
3.4	Fraksinasi Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Melalui Kaedah Kromatografi Turus	78
3.4.1	Ujian Pembauran Cakera Ke Atas <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i> Dengan Setiap Fraksi	78

3.4.2	Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) Fraksi c5 Dan Fraksi c8 Terhadap <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i>	81
3.4.3	Perbandingan Komponen Dalam Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit Dan Daun Tidak Berpenyakit	82
3.4.4	Pengesanan Terpenoid Di Dalam Fraksi c5 Dan Fraksi c8	83
3.5	Aktiviti Antioksida Ekstrak <i>Triphasia trifolia</i>	87
3.5.1	Penskrinan Ekstrak Dengan Menggunakan Radikal Bebas 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	87
3.5.2	Penulenan Sebatian Bioaktif Ekstrak Metanol Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i>	89
3.5.2.1	Penskrinan Fraksi Selepas Disisihkan Oleh Pelarut BAW Dengan Ujian DPPH	89
3.5.2.2	Penskrinan Fraksi Kedua Yang Terpilih Selepas Disisihkan Oleh Pelarut Asid Asetik 15% Dengan Ujian DPPH	93
3.6	Pengenalpastian Komponen Bioaktif Dalam Subfraksi Terpilih	98
3.6.1	Subfraksi 3c2	98
3.6.2	Subfraksi 4c3	105
3.6.3	Subfraksi 5b4	112
3.7	Penentuan EC ₅₀ Bagi Tiga Sebatian Tulen Yang Telah Disisihkan	118
BAB EMPAT : PERBINCANGAN		120
4.1	Penyaringan Pelbagai Ekstrak Dari <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap Bakteria	121
4.2	Aktiviti Antibakteria Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i>	126
4.3	Ketoksikan Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Terhadap <i>Artemia salina</i> Dan Darah Kambing	131
4.4	Penyisihan Komponen Ekstrak Kloroform Daun Berpenyakit <i>Triphasia trifolia</i> Dan Ujian Antibakteria Terhadap <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Dan <i>Bacillus licheniformis</i>	132
4.5	Pengesanan Bahan Kimia Dalam Fraksi c5 Dan Fraksi c8	135
4.6	Aktiviti Antioksida Ekstrak Dan Fraksi-Fraksi <i>Triphasia trifolia</i>	136
4.7	Pengenalpastian Komponen Bioaktif Dalam Subfraksi Terpilih	139

BAB LIMA : KESIMPULAN	144
RUJUKAN	148
PENERBITAN	168

SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
1.1	Beberapa contoh penyakit manusia yang disebabkan oleh bakteria	7
2.1	Perhitungan bagi isipadu yang dikehendaki untuk penentuan MIC	34
2.2	Perhitungan bagi isipadu yang dikehendaki untuk ujian ketoksikan dengan menggunakan udang brin	41
2.3	Perhitungan bagi isipadu yang dikehendaki untuk ujian ketoksikan dengan menggunakan darah kambing	42
2.4	Spesifikasi LC-MS	53
3.1	Kesan perencatan ekstrak krud daripada daun <i>T. trifolia</i> (20 mg/ml) ke atas bakteria-bakteria ujian	58
3.2	Kesan perencatan ekstrak krud daripada batang <i>T. trifolia</i> dan antibiotik tetrasiklin (20 mg/ml) ke atas bakteria-bakteria ujian	59
3.3	Kesan perencatan ekstrak daripada buah <i>T. trifolia</i> (20 mg/ml) ke atas bakteria-bakteria ujian	61
3.4	Penentuan nilai MIC bagi ekstrak kloroform daun berpenyakit terhadap <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> dan <i>Bacillus licheniformis</i>	63
3.5	Peratus mortaliti untuk ketoksikan akut (6 jam) ke atas udang brin	74
3.6	Peratus mortaliti untuk ketoksikan kronik (24 jam) ke atas udang brin	74
3.7	Ujian ketoksikan ekstrak kloroform daun berpenyakit terhadap darah kambing	75
3.8	Aktiviti antibakteria setiap fraksi ekstrak kloroform daripada daun berpenyakit <i>T. trifolia</i> ke atas <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> dan <i>Bacillus licheniformis</i>	79
3.9	Penentuan nilai MIC bagi fraksi c5 dan c8 terhadap <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	81
3.10	Penentuan nilai MIC bagi fraksi c5 dan c8 terhadap <i>Bacillus licheniformis</i>	82
3.11	Nilai R_f (x 100) dan perubahan warna sebatian dalam ujian monoterpenoid ke atas fraksi c5 dan fraksi c8	84
3.12	Nilai R_f (x 100) dan perubahan warna sebatian dalam ujian diterpenoid ke atas fraksi c5 dan fraksi c8	84
3.13	Nilai R_f (x 100) dan perubahan warna sebatian dalam ujian triterpenoid ke atas fraksi c5 dan fraksi c8	84

3.14	Ujian warna ke atas fraksi selepas disisihkan oleh pelarut BAW	89
3.15	Ujian warna ke atas subfraksi selepas disisihkan oleh pelarut asid asetik 15%	93
3.16	Subfraksi yang terpilih selepas penyisihan peringkat ketiga	98
3.17	Perbandingan nilai R_f (x 100) dan warna bagi subfraksi 3c2 sebelum dan selepas dihidrolisis dengan apigenin	99
3.18	Anjakan spektrum setelah penambahan reagen-reagen tertentu ke atas subfraksi 3c2	102
3.19	Perbandingan nilai R_f (x 100) dan warna bagi subfraksi 4c3 sebelum dan selepas dihidrolisis dengan sebatian isovitexin	106
3.20	Anjakan spektrum setelah penambahan reagen-reagen tertentu ke atas subfraksi 4c3	108
3.21	Perbandingan nilai R_f (x 100) dan warna bagi subfraksi 5b4 sebelum dan selepas dihidrolisis dengan sebatian trisetin	113
3.22	Anjakan spektrum setelah penambahan reagen-reagen tertentu ke atas subfraksi 5b4	115

SENARAI RAJAH

Rajah		Muka surat
2.1	Carta aliran kajian yang dijalankan	55
3.1	Kesan ekstrak kloroform berpenyakit daripada daun <i>T. trifolia</i> ke atas profil pertumbuhan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	65
3.2	Kesan ekstrak kloroform berpenyakit daripada daun <i>T. trifolia</i> ke atas profil pertumbuhan <i>Bacillus licheniformis</i>	65
3.3	Peratusan penyingkiran radikal bebas DPPH ekstrak-ekstrak <i>T. trifolia</i> (1250 µg/ml) yang diheram pada 37°C selama 30 minit	88
3.4	Peratusan penyingkiran radikal bebas DPPH fraksi-fraksi (1250 µg/ml) yang diheram pada 37°C	91
3.5	Peratusan penyingkiran radikal bebas DPPH fraksi-fraksi (1250 µg/ml) yang diheram pada 37°C selama 90 minit	92
3.6	Peratusan penyingkiran radikal bebas DPPH subfraksi-subfraksi (1250 µg/ml) yang diheram pada 37°C	95
3.7	Peratusan penyingkiran radikal bebas DPPH subfraksi-subfraksi (1250 µg/ml) yang diheram pada 37°C selama 150 minit	97
3.8	Spektrum UV subfraksi 3c2 dalam (I) metanol 80 % dan (II) setelah penambahan NaOH	101
3.9	Spektrum UV subfraksi 3c2 dalam (I) metanol 80 %, (II) setelah penambahan AlCl ₃ dan (III) setelah penambahan AlCl ₃ dan HCl	101
3.10	Spektrum UV subfraksi 3c2 dalam (I) metanol 80 %, (II) setelah penambahan NaOAc dan (III) setelah penambahan NaOAc dan H ₃ BO ₃	102
3.11	Spektrum LC-MS bagi subfraksi 3c2	103
3.12	Struktur molekul subfraksi 3c2 secara tentatif (Apigenin 5- <i>O</i> -metil eter 7- <i>O</i> -pentosilrhamnosida)	104
3.13	Spektrum UV subfraksi 4c3 dalam (I) metanol 80 % dan (II) setelah penambahan NaOH	107
3.14	Spektrum UV subfraksi 4c3 dalam (I) metanol 80 %, (II) setelah penambahan AlCl ₃ dan (III) setelah penambahan AlCl ₃ dan HCl	107
3.15	Spektrum UV subfraksi 4c3 dalam (I) metanol 80 %, (II) setelah penambahan NaOAc dan (III) setelah penambahan NaOAc dan H ₃ BO ₃	108
3.16	Spektrum LC-MS bagi subfraksi 4c3	110
3.17	Struktur molekul subfraksi 4c3 secara tentatif (Isoviteksin)	111

3.18	Spektrum UV subfraksi 5b4 dalam (I) metanol 80 % dan (II) setelah penambahan NaOH	114
3.19	Spektrum UV subfraksi 5b4 dalam (I) metanol 80 %, (II) setelah penambahan AlCl ₃ dan (III) setelah penambahan AlCl ₃ dan HCl	114
3.20	Spektrum UV subfraksi 5b4 dalam (I) metanol 80 %, (II) setelah penambahan NaOAc dan (III) setelah penambahan NaOAc dan H ₃ BO ₃	115
3.21	Spektrum LC-MS bagi subfraksi 5b4	116
3.22	Struktur molekul subfraksi 5b4 secara tentatif (Trisetin 7, 4'-O-dimetil eter)	117
3.23	Penentuan EC ₅₀ bagi subfraksi 3c2	118
3.24	Penentuan EC ₅₀ bagi subfraksi 4c3	119
3.25	Penentuan EC ₅₀ bagi subfraksi 5b4	119
4.1	Struktur flavon	142
4.2	Struktur naringenin dan narirutin	143

SENARAI PLAT

Plat		Muka surat
1.1	Pokok <i>Triphasia trifolia</i>	4
1.2	Daun <i>Triphasia trifolia</i>	4
1.3	Buah <i>Triphasia trifolia</i>	4
1.4	Bunga <i>Triphasia trifolia</i>	4
2.1	Kromatografi turus	45
3.1	Zon perencatan ekstrak <i>T. trifolia</i> terhadap bakteria ujian	62
3.2	Mikrograf SEM sel <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	67
3.3	Mikrograf SEM sel <i>Bacillus licheniformis</i>	69
3.4	Mikrograf TEM perubahan sel <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> yang telah ditindak dengan ekstrak kloroform daun berpenyakit <i>T. trifolia</i> selepas 18 jam pendedahan	70
3.5	Mikrograf TEM perubahan sel <i>Bacillus licheniformis</i> yang telah ditindak dengan ekstrak kloroform daun berpenyakit <i>T. trifolia</i> selepas 18 jam pendedahan	72
3.6	Kesan perencatan ke atas pertumbuhan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> oleh sebatian tersisih dengan TLC	77
3.7	Kesan perencatan ke atas pertumbuhan <i>Bacillus licheniformis</i> oleh sebatian tersisih dengan TLC	77
3.8	Zon perencatan fraksi c5 dan c8 terhadap bakteria ujian	80
3.9	Plat TLC bagi ekstrak kloroform daun tidak berpenyakit dan daun berpenyakit	83
3.10	Plat TLC bagi fraksi c5 dan c8 sebelum dan selepas ujian monoterpenoid	85
3.11	Plat TLC bagi fraksi c5 dan c8 sebelum dan selepas ujian diterpenoid	85
3.12	Plat TLC bagi fraksi c5 dan c8 sebelum dan selepas ujian triterpenoid	86

SENARAI RINGKASAN

AlCl_3	Aluminium klorida
ANOVA	Analisis varians
BAW	Butanol : asid asetik : air suling (4:1:5) lapisan atas
DMSO	Dimetil sulfoksida
DNA	Asid deoksiribonukleik
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
H_2O	Air suling
H_3BO_3	Asid borik
HCl	Asid hidroklorik
HOAc	Asid asetik
LC_{50}	Kepekatan membunuh 50 % populasi sampel kajian
LC-MS	Kromatografi cecair–spektrofotometer jisim
MHA	Agar Mueller Hinton
MIC	Kepekatan perencatan minimum
NA	Agar nutrien
NaOAc	Natrium asetat
NaOH	Natrium hidroksida
NH_3	Ammonia
$^{\circ}\text{C}$	Darjah Celcius
OD	Ketumpatan optik
PABA	Asid para-aminobenzoik
PTFE	Penuras membran politetrafluoretelina
R_f	Pergerakan relatif
RNA	Asid ribonukleik
SEM	Mikroskop Elektron Imbasan
TEM	Mikroskop Elektron Transmisi
TEAC	'Trolox equivalent antioxidant capacity'
TLC	Kromatografi lapisan nipis
UV	Ultralembayung

**PENCIRIAN SEBATIAN BIOAKTIF DARIPADA *Triphasia trifolia* (Burm. f.)
P. Wilson (LIMAU KAYA) SEBAGAI BAHAN ANTIBAKTERIA DAN BAHAN
PENYINGKIR RADIKAL BEBAS**

ABSTRAK

Penyaringan biologi ke atas 18 ekstrak dari tumbuhan *Triphasia trifolia* telah dilakukan terhadap 25 bakteria patogen dan radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Keputusan penyaringan antibakteria menunjukkan ekstrak kloroform daun berpenyakit memberikan diameter zon perencatan yang terbesar iaitu 11.8 ± 0.5 mm terhadap *Acinetobacter calcoaceticus* dan *Bacillus licheniformis* (10.3 ± 0.7 mm) melalui kaedah resapan agar. Ekstrak kloroform daun berpenyakit *T. trifolia* dan dua jenis bakteria, *A. calcoaceticus* dan *B. licheniformis* telah dipilih untuk kajian lanjut. Nilai MIC bagi ekstrak kloroform daun berpenyakit terhadap *A. calcoaceticus* adalah $100 \mu\text{g/ml}$ dan nilai MIC terhadap *B. licheniformis* adalah $156 \mu\text{g/ml}$. Kajian SEM dan TEM yang dilakukan ke atas *A. calcoaceticus* dan *B. licheniformis* menunjukkan berlakunya perubahan pada morfologi sel terutamanya struktur dinding sel dan terdapat tanda-tanda kebocoran sel akibat tindakan ekstrak kloroform daun berpenyakit. Ekstrak kloroform juga didapati tidak toksik dengan nilai kepekatan maut 50% (LC_{50}) akut ke atas udang brin ialah 14.47 mg/ml dan LC_{50} kronik pada 2.17 mg/ml . Keputusan ini dikukuhkan lagi dengan kajian ketoksikan menggunakan eritrosit kambing di mana sel eritrosit tidak mengalami hemolisis sehingga ke kepekatan 2 mg/ml . Kromatografi turus telah dilakukan ke atas ekstrak kloroform daun berpenyakit dengan menggunakan sistem pelarut heksana : etil asetat (1 : 1) dan sebanyak 26 fraksi telah diperolehi. Fraksi telah dikumpulkan berdasarkan warna. Fraksi yang telah disisihkan diuji aktiviti antibakterianya dan didapati fraksi c5 menunjukkan perencatan zon terbesar terhadap *A. calcoaceticus* (14.1 ± 0.1 mm) manakala fraksi c8 merencat *B. licheniformis* dengan diameter zon terbesar 16.3 ± 0.6 mm. Nilai MIC bagi fraksi c5 dan fraksi c8 adalah sama iaitu sekitar $50 \mu\text{g/ml}$ terhadap *A. calcoaceticus* dan 100

$\mu\text{g/ml}$ dan $78 \mu\text{g/ml}$ masing-masingnya terhadap *B. licheniformis*. Penyaringan fitokimia menunjukkan kehadiran terpenoid dalam fraksi c5 dan fraksi c8. Penskrinan ke atas 18 ekstrak *T. trifolia* dengan menggunakan radikal DPPH untuk menguji aktivitas antioksidasi telah dijalankan. Ekstrak metanol daun berpenyakit *T. trifolia* pada kepekatan $1250 \mu\text{g/ml}$ mempamerkan peratusan paling tinggi dalam penyingkiran radikal bebas DPPH ($70.1 \pm 0.1 \%$) berbanding dengan ekstrak yang lain. Oleh itu, ekstrak metanol daun berpenyakit telah dipilih untuk penulenan dan penyisihan sebatian bioaktif dengan pelbagai sistem pelarut dengan menggunakan kromatografi kertas. Fraksi-fraksi yang menunjukkan peratusan penyingkiran DPPH yang baik dipilih untuk pengenalpastian struktur dengan menggunakan ujian flavonoid aglikon, ujian anjakan spektrum UV dan penentuan jisim berat molekul. Berdasarkan keputusan yang diperolehi, subfraksi-subfraksi 3c2, 4c3 dan 5b4 telah dikenalpasti secara tentatif sebagai apigenin 5-O metil eter 7-O pentosilrhamnosida, isoviteksin dan trisetin 7, 4'-O-dimetil eter masing-masing.

**CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Triphasia trifolia*
(Burm. f.) P. Wilson (LIME BERRY) AS ANTIBACTERIA AND FREE RADICAL
SCAVENGING CONSTITUENTS**

ABSTRACT

Biological screening was conducted on 18 extracts of *Triphasia trifolia* against 25 pathogen bacteria and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. Results from antibacteria screening on *T. trifolia* extracts showed that chloroform extract of infected leaves gave the largest inhibition zone diameter with 11.8 ± 0.5 mm against *Acinetobacter calcoaceticus* and *Bacillus licheniformis* (10.3 ± 0.7 mm) through disc diffusion method. Chloroform extract of infected leaves of *T. trifolia* and two bacteria namely *A. calcoaceticus* and *B. licheniformis* were selected for further investigations. The MIC value of the chloroform extract of infected leaves was 100 µg/ml for *A. calcoaceticus* and 156 µg/ml for *B. licheniformis*. SEM and TEM studies on *A. calcoaceticus* and *B. licheniformis* showed morphological changes occurred on the cell particularly on the structure of cell wall and existence of cell leakage after the cell was treated with chloroform extract from infected leaves. The chloroform extract was also non-toxic with lethality concentration of 50% (LC₅₀) acute value of 14.47 mg/ml on the brine shrimp and LC₅₀ chronic of 2.17 mg/ml. The toxicity study on sheep erythrocytes also showed that there was no hemolysis occurred until the concentration of 2 mg/ml, further confirmed the non-toxicity nature of the extract. Column chromatography was conducted on chloroform extract from infected leaves using hexane : ethyl acetate (1 : 1) to gave 26 fractions which was collected based on the colour. These fractions were tested for their antibacterial activities and fraction c5 was found to inhibit *A. calcoaceticus* with the largest inhibition zone (14.1 ± 0.1 mm) while for *B. licheniformis*, fraction c8 produced the largest inhibition zone diameter of 16.3 ± 0.6 mm. The MIC values for fraction c5 and fraction c8 were both 50 µg/ml for *A. calcoaceticus* and 100 µg/ml and 78 µg/ml respectively for *B. licheniformis*. Phytochemical screening showed

the existence of terpenoids in fraction c5 and fraction c8. Eighteen extracts of *T. trifolia* were screened for their antioxidant activity using DPPH radical. Methanol extract from infected leaves of *T. trifolia* showed the highest percentage of DPPH scavenging activity (70.1 ± 0.1 %) at 1250 $\mu\text{g/ml}$ concentration as compared to other extracts. Thus, methanol extract from infected leaves was selected for isolation and fractionation using various solvent systems in the paper chromatography. Fractions which showed the best percentage of DPPH scavenging activity were selected for structural identification using aglycones flavonoid tests, UV spectrum shift reaction and determination of molecular mass. Based on the results obtained, subfractions 3c2, 4c3 and 5b4 were identified tentatively as apigenin 5-*O* methyl ether 7-*O* pentosylrhamnoside, isovitexin and tricetin 7, 4'-*O*-dimethyl ether.

BAB SATU

PENGENALAN

BAB 1 PENGENALAN

1.1 Pendahuluan

Tumbuh-tumbuhan telah membekalkan segala sumber keperluan manusia termasuk sumber kayu-kayan, gentian, makanan, perisa, pewangi dan juga ubat-ubatan. Tumbuhan merupakan asas kepada sistem perubatan tradisional Melayu, Ayurvedik, Unani, Cina dan sebagainya. Perubatan tradisional telah diamalkan secara meluas di kawasan luar bandar khususnya di kalangan orang-orang asli di seluruh dunia. Berdasarkan laporan Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO), 75 % penduduk dunia masih bergantung kepada ubat-ubatan tradisional terutamanya berasaskan tumbuhan untuk memelihara taraf kesihatan penduduk (Gilani, 2005). Produk ubatan berasaskan sumber semula jadi mewakili lebih daripada 50 % daripada ubat-ubatan yang digunakan di dunia ini (Gurib-Fakim, 2006).

Penggunaan tumbuhan sebagai ubat-ubatan masih diterima dan digemari orang ramai kerana ia lebih murah, senang didapati, kurang kesan sampingan yang boleh memudaratkan dan berkesan memulihkan penyakit. Bahagian tumbuhan yang lazim digunakan ialah bahagian akar, daun, buah serta bunga. Maklumat etnobotani dan etnofarmakologi telah digunakan sebagai panduan oleh saintis untuk menuju ke arah pencarian pelbagai sumber sebatian aktif biologi daripada tumbuhan (Gurib-Fakim, 2006). Beratus-ratus sebatian daripada tumbuhan telah berjaya disisihkan dan dicamkan setiap tahun namun penemuan aktiviti biologinya masih berkurangan. Oleh yang demikian, pelbagai penyelidikan farmaseutikal masih dijalankan untuk membuktikan secara saintifik keberkesanan tumbuhan ubatan tradisional dan sebatian bioaktif yang disisihkan daripadanya.

Dalam kajian ini, tumbuhan *Triphasia trifolia* telah dipilih untuk mengkaji potensinya sebagai agen antibakteria dan agen antioksidan.

1.2 *Triphasia trifolia*

1.2.1 Pengenalan

Triphasia trifolia adalah berasal dari Negara China (Nicholson, 1991) dan telah ditanam di Semenanjung Malaysia sebagai tumbuhan hiasan. *T. trifolia* merupakan ahli daripada famili Rutaceae. *T. trifolia* dikenali sebagai limau kaya, limau kikir atau limau kiah di kalangan masyarakat Melayu di Malaysia (Burkill, 1966). Nama Inggerisnya pula ialah 'lime berry'. *T. trifolia* banyak terdapat di kawasan tanah pamah, kawasan pergunungan, kawasan berbatu kapur, kawasan paya bakau dan hutan.

T. trifolia merupakan pohon renek dan berduri (Plat 1.1). Ia ditanam sebagai tumbuhan hiasan disebabkan oleh rantingnya yang keras dan bengkok-bengkok secara zig-zag. *T. trifolia* mempunyai daun jenis trifolia yang kecil dan berwarna hijau gelap (Plat 1.2). Daun dan buahnya berbau wangi seperti limau. Buahnya berbentuk bujur dan kecil seperti kacang hazel, buah masak pula berwarna kemerahan dan mempunyai rasa yang sedap (Nicholson, 1991) (Plat 1.3). Bunga *T. trifolia* berwarna putih dan harum (Plat 1.4).

Pengelasan *T. trifolia* berdasarkan Spiegel-Roy & Goldschmidt (1996) ditunjukkan di bawah:

Order	: Rutales
Famili	: Rutaceae
Subfamili	: Aurantioideae
Tribus	: Citreae
Subtribus	: Triphasiinae
Genus	: <i>Triphasia</i>
Spesies	: <i>trifolia</i>



Plat 1.1 Pokok *Triphasia trifolia*



Plat 1.2 Daun *Triphasia trifolia*



Plat 1.3 Buah *Triphasia trifolia*



Plat 1.4 Bunga *Triphasia trifolia*

1.2.2 Kegunaan *Triphasia trifolia*

Jones (1985) melaporkan bahawa daun *T. trifolia* boleh digunakan untuk mengubati masalah perut, sakit jantung dan sesak nafas. Daun *T. trifolia* juga telah digunakan oleh orang asli dalam perubatan tradisional untuk merawat pelbagai penyakit yang berpunca daripada bakteria seperti cirit-birit, kolik dan penyakit kulit, serta digunakan sebagai bahan kosmetik (Burkill, 1966). Infusi daripada daunnya juga digunakan untuk merawat penyakit parasitik di Perancis (Dondon *et al.*, 2006). Di Indonesia, tumbuhan ini digunakan untuk mandian aromatik dalam perubatan tradisional serta boleh menyembuhkan masalah pernafasan dan kesakitan pada abdomen dan perut (Perry, 1980). Buahnya boleh direbus dan dibuat sirap untuk diminum sebagai ubat pengeluar kahak (Perry, 1980). Buahnya juga boleh dijadikan jem. Di Eropah, buah masak *T. trifolia* direndam di dalam wain untuk menambah perasanya (Burkill, 1966). Batang *T. trifolia* pula digunakan sebagai pemegang parang, pagar dan objek-objek kecil serta dijadikan sebagai arang (Burkill, 1966).

1.2.3 Penyelidikan Ke Atas *Triphasia trifolia*

Kajian saintifik yang telah dijalankan ke atas *T. trifolia* masih berkurangan dan tumbuhan ini juga masih kurang dikenali umum. Kebanyakan kajian yang dijalankan ke atas tumbuhan ini melibatkan penyisihan sebatian kimia daripadanya. Yokoyama & White (1968) telah berjaya menyisihkan sebatian semi β -karotenon dan β -karotenon daripada buah *T. trifolia*. Sebatian ini bertanggungjawab sebagai pigmen merah bagi buah serta tidak dapat dinafikan bahawa *T. trifolia* merupakan sumber yang kaya dengan sebatian karotenon semula jadi. α - dan β -karoten serta kriptozantin yang hadir dalam buah muda akan berubah kepada semi α - dan semi β -karotenon, β -karotenon dan triphasiazantin apabila buah masak (Yokoyama & White, 1970).

Gray (1983) telah berjaya menyisihkan furokumarin isopimpinelin dan triphasiol yang merupakan sebatian fototoksik dan sitotoksik daripada biji *T. trifolia*. de

Silva *et al.* (1981) juga berjaya menyisahkan tiga sebatian kumarin iaitu umbeliferon, isomeranzin dan triphasiol daripada ekstrak metanol daun *T. trifolia*. Sebatian-sebatian lain seperti limonin dan apigenin juga telah dikenalpasti dalam spesies ini (Connolly, 1983; Dreyer, 1983). Dalam kajian lain, kumarin, heraklenol dan isomerazin juga telah dikenalpasti hadir dalam daun *T. trifolia* (Rastogi *et al.*, 1998). Selain itu, Dondon *et al.* (2006) telah melaporkan bikoumarin yang baru. Bikoumarin ini merupakan gabungan daripada dua kumarinik iaitu meksotisin dan hidrat meranzin dan didapati hadir dalam daun dan batang *T. trifolia*.

1.3 Antibakteria

1.3.1 Bahan Antibakteria

Bahan antibakteria ialah sejenis bahan kimia yang boleh membunuh atau merencat pertumbuhan bakteria secara terpilih. Bahan ini berkemungkinan diperolehi daripada sumber bahan kimia buatan atau hasil semula jadi. Bahan antibakteria yang digunakan secara komersil untuk mengubati penyakit serta tidak toksik terhadap tisu-tisu perumah dikenali sebagai agen kemoterapeutik (Black, 2002). Agen kemoterapeutik biasanya adalah lebih toksik terhadap bakteria berbanding manusia. Agen antibakteria yang membunuh bakteria disebut sebagai agen bakterisidal manakala agen yang hanya merencat pertumbuhan bakteria disebut sebagai agen bakteriostatik di mana pertumbuhan semula boleh berlaku sekiranya agen antibakteria disingkirkan (Nester *et al.*, 2007). Aktiviti antibakteria pula merupakan suatu tindakan bahan atau agen yang mampu membunuh atau merencat pertumbuhan bakteria tertentu dan tindakan ini adalah penting khususnya kepada bakteria yang merbahaya kepada manusia (Brock *et al.*, 1993).

Bakteria merupakan punca kontaminasi makanan dan kerosakan pada bahan-bahan seperti perabot, pakaian dan lain-lain. Terdapat juga pelbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteria yang boleh menyerang tumbuhan, haiwan dan manusia.

Bakteria biasanya terdapat pada badan manusia terutamanya di bahagian kulit. Jadual 1.1 menunjukkan beberapa contoh penyakit pada manusia yang disebabkan oleh bakteria (Black, 2002).

Jadual 1.1 Beberapa contoh penyakit pada manusia yang disebabkan oleh bakteria (Black, 2002)

PENYAKIT	BAKTERIA
Antrak	<i>Bacillus anthracis</i>
Ulser mulut	<i>Bacteroides</i> sp.
Gastroenteritis	<i>Campylobacter</i> sp.
Tetanus	<i>Clostridium tetani</i>
Jangkitan pada sistem urinari	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>
Jangkitan pada kulit dan luka	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>
Pneumonia	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i>
Tifoid	<i>Salmonella typhi</i>
Disenteri	<i>Shigella</i> sp.
Bisul	<i>Staphylococcus aureus</i>
Meningitis	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Taun (kolera)	<i>Vibrio cholerae</i>
Yersiniosis	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Sifilis	<i>Treponema pallidum</i>
Tuberkulosis (batuk kering)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Kusta	<i>Mycobacterium leprae</i>
Keracunan makanan	<i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium</i> sp. <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Gonorea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>

Bahan antibakteria boleh diperoleh daripada pelbagai jenis organisma seperti kulat, bakteria, alga, tumbuhan dan juga haiwan (Fasihuddin & Hasmah, 1993). Terdapat beberapa bahan antibakteria yang digunakan pada masa kini yang dikenali sebagai antiseptik, disinfektan dan antibiotik. Antiseptik ialah bahan kimia yang membunuh atau merencat pertumbuhan bakteria dan tidak berbahaya yang membolehkannya disapu pada kulit atau membran mukus. Contoh antiseptik yang paling biasa ialah alkohol dan sabun (Brock *et al.*, 1993). Disinfektan pula ditakrifkan sebagai bahan kimia yang digunakan ke atas benda yang tidak hidup untuk membunuh bakteria kerana ia mungkin berbahaya kepada badan manusia. Disinfektan yang biasa digunakan ialah formaldehid, gas klorin dan merkuri klorida (Batzing, 2002). Antibiotik pula ialah sejenis bahan kimia yang dihasilkan oleh organisma tertentu yang bertindak aktif terhadap organisma lain seperti penisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, sefalosporin dan sebagainya (Talaro & Talaro, 2002).

1.3.2 Mekanisme Tindakan Bahan Antibakteria

Pengetahuan tentang mekanisme tindakan bahan antibakteria ke atas sesuatu bakteria dapat membantu untuk mengawal penyakit yang berkaitan dengan bakteria. Terdapat lima cara tindakan bahan antibakteria iaitu perencatan sintesis dinding sel, perencatan fungsi membran sel, perencatan sintesis protein, perencatan sintesis asid nukleik dan tindakan sebagai antimetabolit (Batzing, 2002; Black, 2002; Nester *et al.*, 2007).

Kebanyakan sel bakteria mempunyai dinding sel yang terdiri daripada struktur peptidoglikan manakala sel haiwan dan manusia tidak mempunyai struktur ini. Dengan itu, perencatan sintesis dinding sel adalah memilih kepada sel bakteria, sebaliknya tidak memberi kesan kepada sel-sel manusia. Penisilin dan sefalosporin merupakan dua jenis antibiotik utama yang merencat sintesis dinding sel. Antibiotik ini mempunyai struktur kimia yang dikenali sebagai gelang β -laktam dan ia terikat kepada enzim yang

membentuk rangkai silang peptidoglikan dan menghalang pembentukan dinding sel yang sempurna. Dengan itu, dinding sel yang lemah akan pecah dan sel akan mengalami lisis (Nester *et al.*, 2007).

Kesemua sel dikelilingi oleh membran. Walaupun membran sel adalah hampir sama pada mikroorganisma dan haiwan, namun terdapat perbezaan antara keduanya yang membolehkan bahan antibakteria bertindak ke atas bakteria dan tidak membahayakan sel haiwan. Antibiotik polipeptida seperti polimiksin dan poliena bertindak terhadap membran. Polimiksin bertindak sebagai detergen untuk memusnahkan membran sel bakteria dengan mengikat kepada fosfolipid pada membran dan berkesan terutamanya pada bakteria Gram negatif yang mempunyai membran yang kaya dengan fosfolipid. Antibiotik poliena seperti amfoterisin B pula mengikat kepada sterol tertentu yang hanya terdapat pada membran sel fungi. Oleh itu, polimiksin tidak bertindak pada fungi dan poliena pula tidak bertindak pada bakteria (Talaro & Talaro, 2002; Black, 2002).

Ribosom adalah tempat berlakunya sintesis protein di dalam sel. Ribosom pada eukariot dan prokariot adalah berbeza dan ini membolehkan bahan antibakteria bertindak ke atas sel bakteria tanpa merosakkan sel haiwan serta menyediakan satu asas bagi ketoksikan pilihan (Brock *et al.*, 1993). Antibiotik yang merencat sintesis protein adalah seperti streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin dan linkomisin (Brock *et al.*, 1993; Black, 2002; Nester *et al.*, 2007).

Antibiotik yang merencat sintesis asid nukleik adalah dalam bilangan yang kecil. Perbezaan di antara enzim yang digunakan oleh bakteria dan haiwan untuk sintesis asid nukleik membolehkan bahan antibakteria bertindak secara memilih. Satu contoh antibiotik dalam kumpulan ini ialah rifampin yang mengikat pada RNA polimerase bakteria dan merencat sintesis RNA (Nester *et al.*, 2007).

Antimetabolit merupakan bahan yang mengganggu penggunaan metabolit dan menghalang sel daripada menjalankan tindak balas metabolit yang diperlukan dalam sel bakteria. Antimetabolit mempunyai struktur yang menyamai metabolit normal, maka ia dapat menggantikan metabolit normal yang diperlukan tetapi tidak menggantikan fungsi metabolit dan tindak balas yang tidak sepatutnya akan berlaku. Sulfonamida merupakan antimetabolit yang menyerupai asid para-aminobenzoik. Asid para-aminobenzoik berfungsi mensintesis asid folik yang amat diperlukan oleh sel bakteria. Apabila sulfonamida menggantikan asid para-aminobenzoik, sintesis asid folik tidak dapat berlaku (Talaro & Talaro, 2002).

1.3.3 Bakteria *Acinetobacter calcoaceticus* Dan *Bacillus licheniformis*

Acinetobacter calcoaceticus dahulunya dikenali sebagai *Achromobacter anitratus* dan ia adalah daripada organisma saprofit (Pal & Kale, 1981). *Acinetobacter calcoaceticus* muncul sebagai flora normal pada kulit dan kerongkong manusia bersama dengan saprofit lain. *Acinetobacter calcoaceticus* merupakan patogen oportunistik yang mempunyai kevirulenan yang tinggi (Pal & Kale, 1981). Ia adalah bakteria Gram negatif dan berbentuk rod pendek serta tidak motil. Dalam ujian biokimia, ia menunjukkan katalase positif, oksidase negatif, manakala ujian indol serta urease adalah negatif (Pal & Kale, 1981). Ia boleh dipencilkan daripada air, tanah, kulit normal dan membran mukus.

Bakteria *Acinetobacter calcoaceticus* mempunyai kuasa invasif yang rendah dan bergantung kepada kerosakan atau luka pada pertahanan tubuh yang normal dan kebanyakan penyakit adalah disebabkan kemasukan iatrogenik (tidak disengajakan daripada rawatan perubatan). Contohnya ialah luka pembedahan dan kelemahan pesakit atau individu yang menggunakan ubat imunosupresi atau ubat penindasan tindak balas keimunan juga memberi peluang kepada bakteria ini masuk ke dalam tisu. Beberapa laporan menyatakan bahawa bakteria ini adalah agen penyebab kepada

meningitis, jangkitan pulmonari, jangkitan pada sistem urinogenita, sinovitis kronik, penyakit kulit, dan jangkitan luka (Pal & Kale, 1981). Prakash *et al.* (1963) melaporkan bahawa organisma ini menyebabkan septisemia atau keracunan darah manakala Sujata *et al.* (1978) pula menyatakan bahawa terdapat jangkitan maut yang disebabkan oleh *Acinetobacter calcoaceticus*.

Antibiotik seperti gentamisin, streptomisin dan kloramfenikol digunakan untuk merawat penyakit yang disebabkan oleh bakteria ini (Pal & Kale, 1981). Ia selalu tidak dianggap sebagai patogen yang penting. Namun, perhatian yang lebih serius perlu diberikan kepada spesies ini yang mungkin berperanan sebagai penyerang oportunistik.

Bacillus licheniformis pula ialah bakteria Gram positif. Ia berbentuk rod, motil, dan boleh menghasilkan spora. Kapsul bagi *Bacillus licheniformis* mengandungi asid poli-D- atau -L-glutamik (Yadava *et al.*, 2006). *Bacillus licheniformis* adalah katalase positif dalam ujian kimia. Bakteria ini telah digunakan dalam perindustrian untuk menghasilkan enzim dan ia juga menunjukkan sifat patogenik (Clerck & Vos, 2004). *Bacillus licheniformis* boleh menghasilkan antibiotik basitrasin melalui pensporaan yang dapat memberi kesan terhadap bakteria Gram negatif (Halvorson, 1962).

Bacillus licheniformis adalah toksinogenik dan kebanyakannya menyebabkan keracunan makanan pada manusia seperti dalam makanan daging yang dimasak, ternakan dan pinggan mangkuk berisi sayur-sayuran (Abdou *et al.*, 2007). Keracunan makanan yang disebabkan bakteria ini ialah seperti cirit-birit dan kadang-kala menyebabkan muntah. Jangkitan *Bacillus licheniformis* biasanya berkaitan dengan trauma, kateter intravena dan penyalahgunaan dadah secara intravena (Hong *et al.*, 2004). Penyakit lain adalah bakterimia atau septisemia (Turnbull & Kramer, 1991;

Hannah & Ender, 1999; Hong *et al.*, 2004). Ada juga kes yang menunjukkan *Bacillus licheniformis* menyebabkan peritonitis, ophtalmitis dan bovina toksimia tetapi bilangannya adalah sangat sedikit (Turnbull & Kramer, 1991). *Bacillus licheniformis* mungkin merupakan salah satu patogen Gram positif yang boleh mengakibatkan penyakit serius kepada pesakit.

Jangkitan *Bacillus licheniformis* boleh dirawat dengan pemindahan kateter dan pembedahan ke atas tisu yang dijangkiti. Selain itu, penggunaan terapi antibakteria yang sesuai juga merupakan salah satu cara rawatan (Hong *et al.*, 2004). Contoh antibiotik yang sesuai bagi merawat jangkitan *Bacillus licheniformis* ialah sefepime, vankomisin dan aminoglikosida (Ozkocaman *et al.*, 2006).

1.3.4 Potensi Tumbuhan Sebagai Bahan Antibakteria

Laporan pertama yang melaporkan kegunaan tumbuhan dalam ubatan tradisional adalah dari Mesopotamia dan bertarikh tahun 2600 sebelum masihi. Antara bahan yang digunakan ialah minyak daripada *Cedrus sp.*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora sp.* dan *Papaver somniferum* di mana kesemuanya masih digunakan sehingga kini untuk rawatan pelbagai penyakit berkaitan dengan bakteria termasuk batuk, sakit perut dan radang (Gurib-Fakim, 2006).

Penggunaan agen antibakteria secara berleluasa dan tidak terkawal mengakibatkan sebahagian bakteria menjadi rintang terhadap kebanyakan antibiotik di seluruh dunia dan ini menimbulkan masalah klinikal dalam rawatan jangkitan penyakit. Tambahan pula, terdapat antibiotik yang mengakibatkan kesan sampingan kepada penggunaannya seperti hipersensitiviti, imunosupresi dan alahan (Ahmad *et al.*, 1998; Sudha *et al.*, 2001). Peningkatan fenomena rintangan oleh patogen kepada banyak antibiotik yang digunakan merupakan dorongan untuk mencari agen antibakteria yang

baru bagi menyelesaikan masalah rintangan dan kesan sampingan yang wujud akibat daripada penggunaan agen antibakteria yang sedia ada (Duru *et al.*, 2004).

Kajian terhadap beberapa spesies tumbuhan menunjukkan bahawa terdapat beberapa bahan aktif atau metabolit sekunder pada tumbuhan yang bertindak sebagai bahan antibakteria. Di antaranya adalah minyak pati, fenol, alkaloid, terpenoid, kuinon, flavonoid dan enzim proteolitik (Lee *et al.*, 2006). Sebatian antibakteria daripada tumbuhan mungkin dapat merencatkan pertumbuhan bakteria dengan pelbagai mekanisme yang berbeza daripada antibiotik yang digunakan sekarang dan mungkin juga berguna untuk merawat strain bakteria yang rintang (Barbour *et al.*, 2004). Oleh itu, adalah penting untuk menjalankan penyelidikan saintifik terhadap tumbuhan-tumbuhan yang digunakan dalam perubatan tradisional kerana potensinya dalam penemuan sebatian antibakteria yang baru (Hammer *et al.*, 1999). Tambahan pula, metabolit sekunder dari tumbuh-tumbuhan mempunyai spektrum tindakan yang luas dan tidak sitotoksik, maka dapat digunakan dalam perumusan antiseptik, disinfektan atau antibiotik dalam kemoterapi.

Contoh tumbuhan yang digunakan sebagai antiseptik bagi mulut, kulit dan vagina oleh penduduk tempatan di Oriximina, Brazil ialah minyak pati daripada *Lippia organoides*. Ia juga digunakan untuk merawat jangkitan respirasi yang berkaitan dengan bakteria (Leitao *et al.*, 2007). Selain itu, bunga *Crocus napolitanus* dan minyak pati daripada *Melaleuca alternifolia* (pokok tea) juga digunakan sebagai antiseptik di Itali dan Australia masing-masingnya (Budhiraja *et al.*, 1999; Pieroni, 2000). Minyak pati daripada *Melaleuca alternifolia* juga merupakan agen antibakteria yang efektif. Air rebusan daripada daun dan ranting *Sebastiania brasiliensis* dan *Sebastiania klotszchiana* pula merupakan antiseptik yang digunakan pada luka manakala ekstrak pokok *Polygonum punctatum* digunakan sebagai disinfektan dalam perubatan tradisional oleh kaum India di Argentina (Penna *et al.*, 2001).

Kajian Khallouki dan rakan-rakannya (2000) menunjukkan minyak pati daripada *Chrysanthemum viscidhirtum* mengandungi limonin, β -farnesin dan banyak jenis sebatian sesquiterpena yang berjaya merencat bakteria ujian terutamanya *Salmonella typhi* dan *Proteus mirabilis*. Selain itu, ekstrak kloroform daripada daun *Lantana camara* mengandungi asid 22 β -asetoksilantik yang dapat merencat *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* (Barre *et al.*, 1997). Sebatian-sebatian antibakteria lain daripada tumbuhan yang berjaya dituliskan dan dikenal pasti adalah benzoin, emetin, cherimolin, eugenol dan sebagainya (Eloff, 1999; Gurib-Fakim, 2006).

1.3.5 Bahan Antibakteria Daripada Tumbuhan Dalam Famili Rutaceae

Famili Rutaceae mengandungi sekitar 1700 spesies dan kebanyakannya tertabur di kawasan tropika (Gurib-Fakim, 2006). Genera yang terkenal ialah *Citrus* seperti oren dan limau. Buah *Citrus aurantifolia* dan *Citrus grandis* dikatakan dapat merawat batuk dan menghilangkan kahak (Mat-Salleh & Latiff, 2002). Selain itu, ekstrak daripada kulit batang *Aegle marmelos* didapati berkesan dalam mengubati disenteri, kolera dan jangkitan dalam mulut (Buenz *et al.*, 2005; Costa-Lotufo *et al.*, 2005). Buah mentahnya juga digunakan untuk mengubati kolik dan cirit-birit. Ekstrak kulit batang *Chloroxylon swietenia* pula digunakan sebagai antiseptik untuk wanita yang baru bersalin dan umumnya adalah tonik. Daunnya pula digunakan untuk merawat lecur dan luka (Parrotta, 2001). Kulit akar dan buah *Toddalia asiatica* pula digunakan dalam rawatan cirit-birit, keletihan dan batuk (Parrotta, 2001; Krief *et al.*, 2005). Dalam perubatan Ayurvedik, daun *Murraya koenigii* merupakan ramuan penting dan berguna untuk menghapuskan organisma patogen dan keracunan serta merawat penyakit kulit, disenteri dan lecur (Parrotta, 2001).

Ekstrak daun *Murraya paniculata* didapati menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap *Micrococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Parrotta, 2001). Kajian Esterhuizen dan rakan-rakan (2006) ke atas buah *Coleonema album*

pula menunjukkan ia memiliki bahan antibakteria yang kuat yang merencat dan membunuh bakteri seperti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Mycobacterium tuberculosis*. Sebatian aglikon kumarin didapati bertanggungjawab ke atas aktiviti antibakteria. Ekstrak buah *Citrus aurantifolia* dan *Citrus aurantium* juga menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Micrococcus luteus* (Melendez & Capriles, 2006).

Selain itu, dua alkaloid iaitu orisiakridon A dan B telah disisihkan daripada kulit batang *Oriciopsis glaberrima* dan mempamerkan aktiviti antibakteria yang meluas (Wansi *et al.*, 2006). Sebatian mahanina yang telah disisihkan daripada ranting *Micromelum minutum* juga mempunyai aktiviti antibakteria terhadap *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus* (Nakahara *et al.*, 2002). Sebatian alkaloid karbazola iaitu klausenol dan klausenina daripada ekstrak batang *Clausena anisata* dan klausenal daripada ekstrak daun *Clausena heptaphylla* didapati merencat dan membunuh bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Chakraborty *et al.*, 1995; Chakraborty *et al.*, 1995). Selain itu, glikozolidol yang merupakan sebatian alkaloid karbazola daripada ekstrak akar *Glycosmis pentaphylla* juga menunjukkan aktiviti antibakteria (Bhattacharyya *et al.*, 1985). Beberapa sebatian feniloksi-fenilpropanoid seperti asid 3-(4'-geraniloksifenil)-2-*trans* propanoik dan asid 3-(4'-geraniloksi-3'-metoksifenil)-2-*trans* propanoik daripada kulit kayu *Acronychia baueri*, asid boropinik daripada akar *Boronia pinnata*, asid valensik daripada buah *Citrus sinensis* dan daun *Aegle marmelos* serta geranil-oksikumarin daripada genus *Citrus* juga merupakan perencat bakteri *Helicobacter pylori* (Epifano *et al.*, 2006).

1.4 Antioksidan

1.4.1 Radikal Bebas

Oksigen amat diperlukan oleh haiwan dan manusia untuk hidup. Walau bagaimanapun, oksigen boleh bertukar menjadi bahan toksik kepada sel yang amat bergantung kepadanya untuk hidup. Oksigen boleh ditukar oleh aktiviti metabolik kepada bentuk yang lebih aktif seperti superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan lain-lain yang dikenali juga sebagai oksigen aktif (Siddhuraju *et al.*, 2002). Penyelidikan yang berkisar tentang spesies oksigen reaktif (SOR), termasuk radikal bebas giat dijalankan.

Radikal bebas merupakan bahan reaktif yang sedia menyerang sebarang sasaran termasuklah DNA, membran lipid dan protein. Setelah diserang, molekul penting ini tidak dapat lagi berfungsi seperti biasa dan seterusnya mengakibatkan kesihatan terjejas. Kerosakan akibat radikal bebas menyumbang kepada proses penuaan dan penyakit kronik seperti penyakit jantung, tumor, keradangan, diabetes, artritik, katarak, penyakit keradangan usus dan kanser (Acker *et al.*, 2000; Zainol *et al.*, 2003; Kosar *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). Sumber utama radikal bebas datangnya daripada badan kita terutamanya semasa metabolisme makanan untuk menghasilkan tenaga. Molekul ini dibentuk dalam sel hidup melalui pelbagai laluan metabolik. Molekul spesifik, pendedahan kepada udara tercemar seperti asap rokok dan pembakaran fosil, makanan hangus, sinar-x dan radiasi ultra ungu serta pencemaran seperti ozon, nitrogen oksida dan sulfur dioksida boleh mendorong dan meningkatkan lagi pembentukan radikal bebas dalam badan (Langseth, 1995). Radikal bebas bukan saja reaktif, tetapi juga mencetuskan tindak balas rangkaian yang seterusnya akan memusnahkan sel.

1.4.2 Bahan Antioksidan Dan Mekanisme Penyingkiran Radikal Bebas

Tubuh manusia mempunyai mekanisme pertahanan yang menentang kerusakan akibat pengoksidan. Senyawa antioksidan dihasilkan secara semula jadi oleh sel badan bagi mengurangkan radikal bebas dengan menukarkan radikal bebas kepada bahan yang tidak berbahaya. Oleh itu, bekalan antioksidan yang tidak mencukupi dalam tubuh akan melemahkan sistem pertahanan terhadap radikal bebas. Pada kebiasaannya, penghasilan radikal bebas dan penutralannya oleh antioksidan adalah seimbang tetapi keseimbangan ini akan terjejas apabila pengeluaran radikal bebas berlaku secara berlebihan akibat keadaan persekitaran yang tercemar dan gaya hidup yang tidak sihat. Hal ini mewujudkan situasi 'tekanan oksidasi' (Langseth, 1995). Oleh itu, bahan antioksidan tambahan adalah sangat diperlukan oleh manusia.

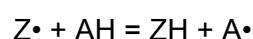
Antioksidan ialah sesuatu bahan yang melambatkan atau menghalang proses pengoksidan sesuatu substrat yang boleh teroksidakan apabila hadir dalam kepekatan yang rendah. Ia adalah molekul yang melindungi sel daripada kemusnahan akibat proses tekanan oksidasi (Makhmoor, 2003). Banyak senyawa antioksidan daripada tumbuhan bertindak sebagai penyingkir radikal bebas yang akan memutuskan mekanisme rantai radikal dan penyingkir oksigen aktif (Ahmeda *et al.*, 2005). Kehadiran antioksidan juga boleh melambatkan atau merencatkan kadar tindak balas pengoksidan lipid. Apabila atom oksigen normal yang mempunyai empat pasang elektron kehilangan elektronnya oleh metabolisme tubuh manusia, oksigen terbitan akan bertukar menjadi radikal bebas yang ingin memperoleh kembali elektron yang hilang dengan mengambil elektron daripada molekul sasaran. Jika radikal bebas ini mengambil satu elektron daripada molekul pada sel hidup, maka terbentuklah radikal bebas yang baru dan menimbulkan tindak balas radikal. Tindak balas radikal umumnya ialah tindak balas berantai (Roberfroid & Calderon, 1995). Tindak balas berantai ini akan merosakkan membran sel. Oleh itu, bahan antioksidan diperlukan

untuk menyumbang elektron kepada molekul radikal bebas dan sekaligus memutuskan tindak balas berantai yang berbahaya ini.

Bahan antioksidan memainkan peranan penting dalam pertahanan terhadap ketoksikan radikal bebas dalam sistem tubuh manusia (Makhmoor, 2003). Bahan antioksidan digunakan dalam perubatan untuk mengubati kanser, sakit jantung dan melambatkan penuaan. Antioksidan juga dikaitkan dengan pengawetan makanan kerana ia berkemampuan untuk mengelakkan makanan daripada menjadi tengik dan mengekalkan warna dan rasa semasa penyimpanan (Ahmad *et al.*, 2005). Ia juga membantu dalam pemanjangan tempoh penyimpanan sesuatu bahan.

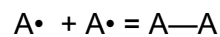
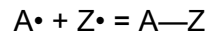
Antioksidan semula jadi yang lazim ialah seperti flavonoid, asid fenolik, asid askorbik dan ekstrak tumbuhan tertentu (Makhmoor, 2003; Kosar *et al.*, 2005). Antioksidan bukan sahaja berfungsi sebagai molekul pertahanan dalam pencegahan pelbagai ketidakstabilan patologikal tetapi juga digunakan dalam perindustrian untuk menghalang degradasi oksidatif polimer dan degradasi pigmen semula jadi dan sintetik (Makhmoor, 2003).

Mekanisme penyingkiran radikal bebas bermula dengan tindak balas permulaan iaitu pembentukan radikal aktif kepada radikal kurang aktif oleh bahan antioksidan. Bahan antioksidan yang berpotensi tinggi untuk menyingkir radikal bebas mempunyai kebolehan untuk menderma atom hidrogen atau elektron. Persamaan tindak balas permulaan (Molyneux, 2004) adalah seperti berikut:



Radikal bebas diwakili oleh $Z\cdot$ manakala bahan antioksidan diwakili oleh AH. Tindak balas ini menghasilkan molekul yang stabil iaitu ZH dan $A\cdot$ ialah radikal bebas yang baru. Radikal bebas yang baru ini mengalami perubahan untuk membentuk struktur resonans dengan mengagihkan elektron tak berpasangan dalam gelang aromatik.

Dengan itu, radikal A• menunjukkan aktiviti radikal yang lebih rendah berbanding radikal Z•. Seterusnya radikal A• akan bertindak balas seterusnya untuk membentuk sebatian yang tidak aktif atau bukan radikal melalui pergabungan radikal kepada radikal (Amic *et al.*, 2003) seperti ditunjukkan oleh persamaan berikut:



1.4.3 Potensi Tumbuhan Sebagai Bahan Antioksidan

Penggunaan antioksidan sintetik sebagai bahan penstabil makanan telah lama diamalkan. Antioksidan sintetik seperti butilated hidroksianisol (BHA), butilated hidroksitoluena (BHT) dan *tert*-butilated hidroksikuinon (TBHQ) biasanya digunakan dalam makanan yang berlemak dan berminyak untuk menghalang pengoksidaan. Walaupun BHA dan BHT merupakan bahan antikarsinogenik tetapi ia juga didapati bersifat karsinogenik ke atas haiwan (Duru *et al.*, 2007). Kebelakangan ini, minat terhadap pencarian sebatian antioksidan semula jadi untuk kegunaan dalam makanan dan ubat-ubatan untuk menggantikan antioksidan sintetik semakin meningkat.

Tumbuhan merupakan sumber antioksidan semula jadi terbaik. Tumbuhan menyerap cahaya matahari dan menghasilkan oksigen yang banyak dalam proses fotosintesis (Vimala & Adenan, 1999). Oksigen yang mempunyai dua elektron yang tidak berpasangan menyebabkannya menjadi agen radikal bebas dan senang ditindak oleh ultra ungu dan haba dari cahaya matahari untuk membentuk spesies oksigen reaktif. Oleh yang demikian, tumbuhan menghasilkan pelbagai sebatian antioksidan untuk bertindak dengan spesies oksigen reaktif untuk terus hidup (Vimala & Adenan, 1999). Kajian awal menunjukkan aktiviti antioksidan adalah tinggi dalam sayur-sayuran dan buah-buahan (Ahmad *et al.*, 2005). Diet yang mengandungi banyak sayur-sayuran dan buah-buahan akan membantu mengurangkan risiko penyakit tekanan oksidasi seperti penyakit kanser dan kardiovaskular (Seeram *et al.*, 2006). Sebagai

contoh daun daripada *Arbutus unedo* telah digunakan sebagai diuretik, astringen dan antihipertensi di Turki (Pabuccuoglu *et al.*, 2003). Selain itu, terdapat pelbagai tumbuhan ubatan yang menunjukkan aktiviti antioksidan dan digunakan sebagai bahan kosmetik dan ramuan awet muda. Antaranya adalah jus *Cucumis sativus*, rizom *Curcuma domestica* dan *Zingiber officinale*, buah *Olea europea*, bunga *Etilingera elatior* dan pucuk daun *Morinda elliptica* (Jaganath & Ng, 2000; Amro *et al.*, 2002; Nornisah *et al.*, 2005).

Kajian oleh Variyar *et al.* (2007) juga menunjukkan aril pala (*Myristica fragrans*) dan lada hijau (*Piper nigrum*) mempunyai aktiviti antioksidan yang tinggi. Penilaian aktiviti antioksidan ekstrak kesemua bahagian pokok pegaga (*Centella asiatica*) juga menunjukkan tumbuhan ini mempunyai aktiviti antioksidan yang tinggi dalam ekstrak etanol dan metanol (Abdul Hamid *et al.*, 2002; Jayashree *et al.*, 2003; Nornisah *et al.*, 2005). Selain itu, ekstrak pucuk daripada *Hypericum triquetrifolium*, ekstrak akar daripada *Onosma argentatum* dan ekstrak kulit kayu daripada *Laurus nobilis* didapati menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi (Conforti *et al.*, 2002; Ozgen *et al.*, 2003; Simic *et al.*, 2003). Ekstrak daun daripada *Rubus ulmifolius*, *Adhatoda vasica*, *Amaranthus paniculatus* dan *Mentha piperita* serta ekstrak akar daripada *Caesalpinia digyna* juga menunjukkan aktiviti antioksidan yang baik (Srinivasan *et al.*, 2007; Acqua *et al.*, 2008; Samarth *et al.*, 2008)

Sebatian fenolik seperti asid karnosik, asid rosmarinik, apigenin dan kuersetin telah berjaya disisihkan daripada rosmari dan origano dan menunjukkan aktiviti antioksidan yang baik (Cuvelier *et al.*, 1996; Exarchou *et al.*, 2002; Caverro *et al.*, 2005; Al-Dabbas *et al.*, 2006). Selain itu, ekstrak buah strawberi juga mengandungi bahan antioksidan seperti asid elagik, pelbagai antosianin glikosida, katekin, pelbagai kuersetin dan kaemferol glikosida (Rangkadilok *et al.*, 2007). Sebatian furanokoumarin iaitu 9-hidroksil-4-metoksiporsalen dan aloisoimperatorin daripada ekstrak akar *Angelicae*

dahuricae juga berpotensi sebagai bahan antioksidan (Piao *et al.*, 2004). Kehadiran sebatian asid kumarik, asid kafeik, asid ferulik, asid sinamik dan oleuropin dalam ekstrak buah *Olea europea* adalah amat berguna dalam produk antipenuaan dan antikedut (Amro *et al.*, 2002). Ekstrak akar daripada *Lithospermum erythrorhizon* juga mengandungi sebatian antioksidan semula jadi seperti sikonin, dioksisikonin, isobutilsikonin dan asid kafeik (Han *et al.*, 2008). Sebatian antioksidan lain seperti proantosianin, katekin, kuersetin, rutin dan asid ginkolik daripada daun *Ginkgo biloba* juga menunjukkan aktiviti penyingkiran radikal bebas yang baik (Bilia, 2002; Ellnain-Wojtaszek *et al.*, 2003).

1.4.4 Bahan Antioksidan Daripada Tumbuhan Dalam Famili Rutaceae

Buah *Citrus hystrix* telah digunakan secara tradisional untuk mengembalikan kecantikan kulit dan melembutkan tangan wanita serta dijadikan air mandian (Mat-Salleh & Latiff, 2002). Manakala jus buah *Citrus medica* pula adalah berkhasiat bagi pesakit darah tinggi dan membantu membuang lemak dari dalam badan (Mat-Salleh & Latiff, 2002). Kegunaan jus dan kulit buah tumbuhan ini sebagai bahan kosmetik dan minuman kesihatan adalah berkait rapat dengan keupayaan antioksidan yang ditunjukkannya. Pucuk muda *Micromelum minutum* pula terkenal di kalangan masyarakat di utara Semenanjung Malaysia sebagai ulam awet muda. Di samping itu, air rebusan daunnya digunakan sebagai bahan mandian untuk menyegarkan badan dan menyembuhkan penyakit reumatisme (Nornisah *et al.*, 2005).

Pelbagai kajian penyaringan saintifik telah dijalankan untuk membuktikan aktiviti antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak Rutaceae. Misalnya ekstrak kulit akar daripada *Fagara zanthoxyloides* dibuktikan menunjukkan aktiviti antioksidan (Chaaib *et al.*, 2003). Selain itu, ekstrak buah *Aegle marmelos* mempamerkan kesan antioksidan dengan mengurangkan kepekatan glukosa dalam darah tikus diabetik (Kamalakkannan & Prince, 2003). Kajian oleh Poullain *et al.* (2004) pula menunjukkan bahawa ekstrak

metanol daripada daun dan batang *Melicope coodeana* dan *Melicope obtusifolia* mempamerkan aktiviti antioksidasi yang tinggi.

Ekstrak oleoresin daripada *Murraya koenigii* menunjukkan aktiviti antioksidasi yang lebih tinggi berbanding ekstrak metanol dan air (Rao *et al.*, 2007). Sebatian mahanimbin dan koenigin yang disisihkan daripada tumbuhan ini menunjukkan aktiviti antioksidasi yang tinggi pada kepekatan yang rendah (Rao *et al.*, 2007). Phuwapraisirisan *et al.* (2006) pula berjaya menyisihkan sebatian antioksidasi baru yang dinamai feronielamin daripada *Feroniella lucida*. Feronielamin merupakan terbitan dari furanokoumarin dan ia menghalang pengoksidaan lipid.

Bahan antioksidasi juga telah diekstrak daripada buah *Zanthoxylum piperitum*. Sebatian utama yang bertanggungjawab sebagai bahan antioksidasi dalam ekstrak metanol buah tumbuhan ini ialah kuersetin 3-*O*-galaktosida dan kuersetin 3-*O*-rhamnosida (Yamazaki *et al.*, 2007). Selain itu, alkaloid orisiakridon C, D, E, F dan 1,3,5-trihidroksi-4-akridon daripada *Orixiopsis glaberrima* juga menunjukkan aktiviti penyingkiran radikal bebas yang sederhana (Wansi *et al.*, 2006).

Tumbuhan *Citrus* pula merupakan sumber utama bagi limonoid semula jadi. Sebatian limonin dan nomilin daripada buah *Citrus* merupakan bahan antioksidasi yang utama. Kajian oleh Sun *et al.* (2005) membuktikan bahawa *Citrus grandis*, *Citrus unshiu*, *Citrus reticulata* dan *Citrus changshanensis* mengandungi kedua-dua sebatian tersebut. *Citrus paradisi* pula terkenal sebagai buah yang kaya dengan flavonoid dan asid askorbik. Sebatian-sebatian ini adalah penting disebabkan oleh nilai nutrisi dan antioksidannya. Lima sebatian flavonoid iaitu hesperidin, naringin, hesperedin, narigenin dan rutin serta asid askorbik berjaya disisihkan daripada jus dan kulit *Citrus paradisi* (Wu *et al.*, 2007). Kini, tumpuan diberikan kepada potensi jus limau ini dalam kesihatan seperti sebagai antioksidasi, antialergi, antikarsinogenik dan melindungi badan

daripada tekanan darah tinggi dan penambahan kolesterol. Selain itu, sebatian 4-(3-metil-2-butenosi) isonitrosoasetofenon yang merupakan sejenis fitoaleksin yang telah dipencilkan daripada *Citrus sinensis* menunjukkan aktiviti antioksidasi dengan kemampuannya untuk menyingkir radikal oksigen reaktif (Dubery *et al.*, 1999).

1.5 Fitoaleksin

Interaksi antara tumbuhan dan patogen menyebabkan pelbagai tindak balas pertahanan dalam tumbuhan. Komponen individu dalam tindak balas pertahanan termasuk tindak balas hipersensitif, bahan kimia seperti fitoaleksin antimikrob, enzim hidrolitik, bahan pertahanan struktur seperti lignin dan sel protein hidroksiprolin (Lahlou *et al.*, 1999). Fitoaleksin ditakrifkan sebagai sebatian antibakteria yang memerlukan pengekspresan gen atau enzim *de novo* yang terlibat dalam laluan metabolit (Meyer & Prinsloo, 2006). Fitoaleksin adalah berjisim molekul rendah di mana ia disintesis dan dikumpulkan di dalam tisu tumbuhan akibat tindak balas terhadap serangan daripada mikroorganisma, penyakit atau akibat pelbagai jenis tegasan alam sekitar (Lucas, 1998). Fitoaleksin tidak hadir dalam tisu tumbuhan yang sihat.

Peranan fitoaleksin ialah sebagai sebatian pertahanan dalam sistem kerintangan tumbuhan. Maka, rangsangan terhadap penghasilan fitoaleksin merupakan mekanisme pertahanan yang penting bagi mengelakkan tumbuhan rentan apabila dijangkiti patogen atau mati akibat tegasan alam sekitar. Terdapat pelbagai faktor biotik yang boleh merangsang penghasilan fitoaleksin, misalnya akibat aruhan mikroorganisma seperti fungi, bakteria atau virus dan kecederaan pada tumbuhan. Faktor abiotik pula ialah seperti aruhan logam berat, sebatian bukan organik, cahaya ultra ungu, suhu yang tinggi dan sebagainya (Zhao *et al.*, 2005).

Kemampuan tumbuhan peringkat tinggi untuk menghasilkan sebatian antimikrob terutamanya fitoaleksin akibat tindak balas terhadap organisma lain yang

dikenali sebagai benda asing adalah serupa dengan sistem imun dalam vertebrata dan ia adalah penting untuk menentang pelbagai penyakit. Penghasilan fitoaleksin berlaku dalam pelbagai tumbuhan peringkat tinggi dan terdapat kepelbagaian bahan kimia semula jadi yang tergolong dalam kumpulan tersebut. Tambahan pula, setiap tumbuhan dari famili berbeza menghasilkan jenis fitoaleksin yang berbeza.

Fitoaleksin telah dijumpai pada Gimnosperma dan Angiosperma serta dalam kumpulan monokotiledon dan dikotiledon. Kebanyakan kumpulan berfungsi fitoaleksin ditunjukkan pada struktur utamanya seperti fenolik, terpenoid dan alkaloid. Struktur ini biasanya adalah unik pada tahap famili (Grayer & Kokubun, 2001). Sebagai contoh, kebanyakan fitoaleksin dihasilkan oleh famili Fabaceae ialah isoflavonoid manakala sulfur yang mengandungi indol dijumpai khas dalam famili Cruciferae. Namun ada famili tumbuhan seperti Poaceae, Asteraceae dan Moraceae yang menghasilkan fitoaleksin daripada kumpulan sebatian yang berbeza (Grayer & Kokubun, 2001).

Kebelakangan ini, didapati bahawa faktor biotik dan abiotik boleh merangsang penghasilan fitoaleksin dalam famili Solanaceae, Fabaceae dan Poaceae (Zhao *et al.*, 2005). Beberapa fitoaleksin telah disisihkan daripada pelbagai jenis tisu seperti pisatin daripada kacang pea, risitin daripada ubi kentang, gliseolin daripada kacang soya dan kamaleksin daripada *Arabidopsis thaliana* (Lucas, 1998). Umbelliferon dan terbitan metoksi koumarin juga merupakan fitoaleksin yang terhasil daripada *Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Platanus acerifolia* dan *Acacia mearnsii* (Repcak *et al.*, 2001).

Fitoaleksin pertama disisihkan daripada *Oryza sativa* (beras) telah dikenalpasti sebagai 9,10-*syn*-pimaran iaitu sejenis diterpenoid momilakton A dan B. Fitoaleksin lain daripada beras ialah orizaleksin dan diterpenoid kassan (Peters, 2006). Selain itu, fitoaleksin, malvon (2-metil-3-metoksi-5,6-dihidroksil-1,4-naptokuinon) telah disisihkan daripada batang *Malva sylvestris* apabila dirangsang oleh patogen *Verticillium dahliae*