

**KAJIAN KETOKSIKAN DAN AKTIVITI ANTI
HELICOBACTER PYLORI DARIPADA TUMBUHAN
PERUBATAN TEMPATAN DENGAN TUMPUAN
KEPADA FRAKSI YANG MENGANDUNGI ALKALOID
*DERRIS TRIFOLIATA***

AHMAD AZLAN BIN ABD AZIZ

**UNIVERSITI SAINS MALAYSIA
2004**

**KAJIAN KETOKSIKAN DAN AKTIVITI ANTI
HELICOBACTER PYLORI DARIPADA TUMBUHAN
PERUBATAN TEMPATAN DENGAN TUMPUAN
KEPADA FRAKSI YANG MENGANDUNGI ALKALOID
*DERRIS TRIFOLIATA***

oleh

AHMAD AZLAN BIN ABD AZIZ

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

Julai 2004

PENGHARGAAN

Syukur ke hadrat Allah s.w.t kerana dengan izinnya jua akhirnya dapat saya menyiapkan kajian ini.

Sekalung penghargaan dan ribuan terima kasih diucapkan kepada Prof. Madya Dr. Uyub Abd Manaf selaku penyelia utama dan Prof. Madya Dr. Shaida Fariza Sulaiman selaku penyelia bersama di atas segala bimbingan dan tunjuk ajar yang diberikan dalam menjalankan kajian dan penulisan tesis ini. Ribuan terima kasih diucapkan kepada semua kakitangan Makmal Elektron Mikroskop P.P. Sains Kajihayat, Makmal Kromatografi Gas P.P. Sains Kimia dan Makmal Kromatografi Cecair P. Penyelidikan Dadah dan Ubatan di atas bantuan yang diberikan.

Penghargaan khas buat; Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi melalui geran IRPA yang telah membiayai sebahagian besar penyelidikan ini; Hospital Seberang Jaya (Unit Gastroenterologi) yang membantu mendapatkan sampel biopsi; dan akhir sekali Tabung Darah Hospital Pulau Pinang.

Tidak lupa ucapan penghargaan dan terima kasih ditujukan kepada Dekan dan Timbalan Dekan Penyelidikan dan Siswazah. Seterusnya saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ahmad Ramli di atas bantuan serta tunjuk ajar mengenai perisian komputer, Prof Madya Dr. Tengku Sifzizul, Dr. Yahya dan En. Amirul di atas sokong moral yang diberikan.

Kepada isteri tercinta Nurhanan, Abah dan Mama, terima kasih di atas segala bantuan dan sokongan padu yang diberikan untuk menjayakan kajian ini. Tidak lupa buat Pak dan Emak yang sering mengambil berat di atas usaha ini.

Sekian, terima kasih.

JADUAL KANDUNGAN

KANDUNGAN	Muka surat
PENGHARGAAN	
JADUAL KANDUNGAN	i
SENARAI JADUAL	viii
SENARAI PLAT	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI RINGKASAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xvi
1.0 TINJAUAN BACAAN	1
1.1 SEJARAH PENEMUAN <i>HELICOBACTER PYLORI</i>.	1
1.2 CIRI-CIRI BAKTERIA <i>HELICOBACTER PYLORI</i>.	4
1.3 KAITAN <i>H. PYLORI</i> DENGAN PEPTIK ULSER.	6
1.4 EPIDEMIOLOGI JANGKITAN	9
1.5 TRANSMISI JANGKITAN	10
1.6 DIAGNOSIS JANGKITAN	10
1.6.1 Ujian Secara Invasif	11
1.6.1.1 Ujian Histologi	11
1.6.1.2 Ujian Perwarnaan Gram	12
1.6.1.3 Ujian urease	12
1.6.1.4 Pengkulturan	13
1.6.1.5 Tindakbalas berantai Polimerase (PCR)	13
1.6.2 Ujian Secara Tak Invasif	14
1.6.2.1 Ujian pernafasan karbon –13 (¹³ C)	14
1.6.2.2 Ujian serologi	15

1.7	RAWATAN DAN TERAPI	16
1.7.1	Sejarah Penggunaan Antibiotik Untuk Merawat Jangkitan <i>H. pylori</i>	16
1.7.2	Antibiotik	17
1.7.2.1	Amoksisilin	17
1.7.2.2	Metronidazola	17
1.7.2.3	Klaritromisin	18
1.7.2.4	Tetrasiklin	18
1.7.3	Drug Pelindung Lapisan Perut	19
1.7.4	Penggunaan Drug Penindas Asid	20
1.7.4.1	Perencat pam proton	20
1.7.4.2	Antagonis hidrogen	20
1.7.5	Kaedah Terapi	21
1.7.5.1	Terapi ganda dua	21
1.7.5.2	Terapi ganda tiga	22
1.7.5.3	Terapi ganda empat	23
1.7.6	Masalah Daripada Penggunaan Antibiotik	25
1.7.6.1	Kerintangan terhadap antibiotik	25
1.7.6.2	Kesan sampingan	28
1.7.6.3	Tak-komplian	29
1.8	PELBAGAI TUMBUH-TUMBUHAN YANG MERENCAT <i>H. PYLORI</i> SECARA <i>IN-VITRO</i>.	30
1.8.1	Sejarah Kegunaan Tumbuhan Dalam Rawatan Jangkitan.	30
1.8.2	Kegiatan anti- <i>H. pylori in-vitro</i> Oleh Beberapa Tumbuhan	30
1.8.2.1	Bawang Putih atau <i>Allium sativum</i>	31
1.8.2.2	Buah Cili atau <i>Capsicum frutescens</i>	32
1.8.2.3	Madu dari pokok <i>Leptospermum scoparium</i>	32
1.8.2.4	Teh hitam atau teh hijau	33
1.8.2.5	Bunga cengkeh atau <i>Eugenia aromatica</i>	33
1.8.3	Perkembangan Kegunaan Ekstrak Tumbuhan Sebagai Anti- <i>H. pylori</i>	34
1.9	<i>DERRIS TRIFOLIATA</i>	36
1.10	OBJEKTIF KAJIAN	37

2.0	PENYARINGAN TUMBUH-TUMBUHAN (EKSTRAK) YANG DAPAT MERENCAT <i>H. PYLORI</i>.	
2.1	PENGENALAN AM	38
2.2	BAHAN DAN KAEDAH	
2.2.1	Pensterilan	40
2.2.2	Sumber Kultur	40
2.2.3	Medium Pengkulturan	40
2.2.4	Pengeraman Kultur	41
2.2.5	Medium Pengawetan	41
2.2.6	Pengawetan Kultur	41
2.2.7	Penyediaan Inokulum	41
2.2.8	Pemilihan Tumbuhan	42
2.2.9	Penyampelan	42
2.2.10	Pengekstrakan Tumbuhan	42
2.2.11	Penentuan Kadar Perencatan Dengan Kaedah Pembauran Cakera	45
2.2.11.1	Penyediaan cakera yang mengandungi ekstrak tumbuhan	45
2.2.11.2	Ujian kepekaan <i>H. pylori</i> terhadap ekstrak tumbuhan	45
2.2.11.3	Pemerhatian perencatan pertumbuhan <i>H.</i> <i>pylori</i>	45
2.3	KEPUTUSAN	46
2.4	PERBINCANGAN	72
2.5	KESIMPULAN	76

3.0	EKSTRAK TUMBUHAN <i>DERRIS TRIFOLIATA</i> : KESANNYA TERHADAP BAKTERIA PATOGEN DAN KETOKSIKANNYA.	
3.1	Pengenalan AM	77
3.2	Bahan dan Kaedah	
3.2.1	Penentuan Kesan Ekstrak Tumbuhan <i>D. trifoliata</i> Terhadap Bakteria Lain	79
3.2.2	Penentuan Ujian Ketoksikan	80
3.2.2.1	Penyediaan air laut buatan 35% saliniti	80
3.2.2.2	Penyediaan <i>Artemia salina</i>	80
3.2.2.3	Penyediaan siri kepekatan ekstrak	80
3.2.2.4	Pendedahan <i>Artemia salina</i> kepada kepekatan ekstrak berlainan	81
3.2.2.5	Penentuan tahap toksisiti ekstrak	81
3.3	Keputusan	82
3.4	Perbincangan	92
3.5	Kesimpulan	94
4.0	Ujian Fitokimia dan Pengumpulan Pelbagai Fraksi Ekstrak Kloroform Tumbuhan <i>DERRIS TRIFOLIATA</i>.	
4.1	Pengenalan AM	95
4.2	Bahan dan Kaedah	
4.2.1	Ujian Identifikasi Kandungan Kimia	97
4.2.1.1	Penentuan kehadiran lemak dan asid lemak	97
4.2.1.2	Steroid dan triterpenoid	98
4.2.1.3	Karotenoid	98
4.2.1.4	Alkaloid	98
4.2.1.5	Terbitan fenol	99

4.2.1.5.1	Fenol	99
4.2.1.5.2	Fenil propanoid	99
4.2.1.5.3	Flavonoid	99
4.2.1.5.4	Antrakuinon	99
4.2.1.6	Garam-garam Alkaloid	100
4.2.1.7	Glikosida	101
4.2.1.8	Tanin	101
4.2.1.9	Karbohidrat	
4.2.1.9.1	Karbohidrat	101
4.2.1.9.2	Musilaj	101
4.2.2	Kaedah Kromatografi Lapisan Nipis	102
4.2.2.1	Keperluan eksperimen	102
4.2.2.2	Keperluan pelarut	102
4.2.2.3	Teknik eksperimen dijalankan	102
4.2.2.4	Pemerhatian keputusan.	103
4.2.3	Kaedah Kolum Kromatografi	103
4.3	KEPUTUSAN	
4.3.1	Kandungan Kimia Ekstrak Kasar <i>D. trifoliata</i>	104
4.3.2	Kromatografi Lapisan Nipis	106
4.3.3	Kolum Kromatografi	107
4.4	PERBINCANGAN	108
4.5	KESIMPULAN	111
5	PEMILIHAN FRAKSI YANG SELEKTIF TERHADAP <i>H. PYLORI</i> DAN PENENTUAN KETOKSIKANNYA	
5.1	PENGENALAN AM	112
5.2	BAHAN DAN KAEDAH	115
5.3	KEPUTUSAN	
5.3.1	Diameter Perencatan Pertumbuhan <i>H. pylori</i>	116
5.3.2	Diameter Perencatan Pertumbuhan Bakteria Patogen lain	118

5.3.3	Tahap Ketoksikan Ekstrak	124
5.4	PERBINCANGAN	129
5.5	KESIMPULAN	132
6	FRAKSI TERPILIH (FRAKSI F2) : PENENTUAN KEPEKATAN PERENCATAN MINIMUMNYA (MIC) DAN KESAN TERHADAP PERTUMBUHAN SERTA PERUBAHAN MORFOLOGI <i>H.PYLORI</i>.	
6.1	Pengenalan AM	133
6.2	BAHAN DAN KAEDAH	
6.2.1	Peralatan Dan Keperluan Eksperimen	136
6.2.2	Penyediaan Agar Yang Mengandungi Fraksi F2 Dan Antibiotik (Tetrasiklin, Metronidazola Dan Amoksisilin) Dan Ekstrak KLO Dan Penentuan MIC	136
6.2.3	Penentuan Kesan Fraksi F2 Terhadap Pertumbuhan <i>H. pylori</i>	139
6.2.3.1	Ujian Kadar Hidup	139
6.2.3.2	Kaedah Hitungan Langsung	139
6.2.4	Pemerhatian Morfologi <i>H. pylori</i> Dengan Mikroskop Elektron Penskanan	141
6.3	KEPUTUSAN	
6.3.1	Nilai MIC ₅₀ dan MIC ₉₀ Fraksi F2 Dan Antibiotik (Tetrasiklin, Metronidazola Dan Amoksisilin) Dan Ekstrak KLO	144
6.3.2	Perubahan Bilangan Koloni <i>H. pylori</i> Dalam Kaldu Yang Mengandungi Fraksi F2	152
6.3.3	Perubahan Bilangan Jumlah Sel (Spiral dan Kokoid) <i>H. pylori</i> Apabila Dikultur Dalam Medium Yang Mengandungi Fraksi F2 Yang Berbeza Kepekatan	154
6.3.4	Perubahan Bentuk Morfologi <i>H. pylori</i> Daripada Spiral Ke Kokoid Akibat Tindakan Faksi F2	157
6.4	PERBINCANGAN	162
6.5	KESIMPULAN	164

7	FRAKSI F2 : PENGESAHAN KEHADIRAN KUMPULAN ALKALOID DAN KEAKTIFAN ANTI-<i>H. PYLORI</i> OLEH DUA PECAHANNYA	
	7.1 PENGENALAN AM	165
	7.2 BAHAN DAN KAEDAH	
	7.2.1 Kaedah Kromatografi Gas- Spektrofotometer Jisim (GC-MS)	167
	7.2.2 Kaedah Kromatografi Cecair- Spektrofotometer Jisim (LC-MS)	168
	7.2.3 Penentuan Kadar Perencatan Komponen A Dan B Terhadap <i>H. pylori</i> Dengan Menggunakan Kaedah Pembauran Cakera	169
	7.3 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	
	7.3.1 Analisis Kromatografi Gas Spektrofotometer Jisim (GCMS)	170
	7.3.2 Analisis Kromatografi Cecair Spektrofotometer Jisim (LCMS)	174
	7.3.3 Keputusan Pemerhatian Jarak Perencatan Pertumbuhan <i>H. pylori</i>	184
	7.4 KESIMPULAN	186
8	PERBINCANGAN AM DAN WAWASAN	187
9	RUJUKAN	193
10	PENERBITAN DARIPADA TESIS INI	213

SENARAI JADUAL

<u>Senarai</u>	<u>Tajuk</u>	<u>M/surat</u>
Jadual 1.1 :	Sejarah Penemuan <i>Helicobacter pylori</i>	3
Jadual 1.2 :	Kombinasi terapi yang digunakan untuk menghapuskan <i>H. pylori</i>	24
Jadual 2.1 :	Tumbuh-tumbuhan dan bahagian-bahagian serta pelarut yang digunakan dalam pengekstrakan	43
Jadual 2.2 :	Purata perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S1 - S32	47
Jadual 2.3 :	Purata perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S33 - S64	53
Jadual 2.4 :	Purata perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S65 - S96	58
Jadual 2.5 :	Purata perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S97 - S128	63
Jadual 2.6 :	Purata perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S129 - S148	68
Jadual 3.1 :	Kandungan air laut buatan bagi saliniti 35% (b/i)	81
Jadual 3.2 :	Diameter perencatan bakteria patogen oleh ekstrak kasar <i>D. trifoliata</i>	83
Jadual 3.3 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi ekstrak PE <i>D. trifoliata</i>	89
Jadual 3.4 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi ekstrak KLO <i>D. trifoliata</i>	90
Jadual 3.5 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi ekstrak MET <i>D. trifoliata</i>	91
Jadual 4.1 :	Kandungan kimia ekstrak kasar <i>D. trifoliata</i> .	105
Jadual 5.1 :	Diameter perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> yang ditunjuk oleh Plat 5.1a	116
Jadual 5.2 :	Diameter perencatan pertumbuhan <i>H. pylori</i> yang ditunjuk oleh Plat 5.1b	116

<u>Senarai</u>	<u>Tajuk</u>	<u>M/surat</u>
Jadual 5.3 :	Diameter perencatan pertumbuhan 13 bakteria patogen dan <i>H. pylori</i> oleh tiga fraksi dan ekstrak KLO tumbuhan <i>D. trifoliata</i>	119
Jadual 5.4 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi F1	125
Jadual 5.5 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi F2	126
Jadual 5.6 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi F3	127
Jadual 5.7 :	Pengiraan LC ₅₀ bagi ekstrak KLO (kawalan)	128
Jadual 6.1 :	Siri kepekatan F2, ekstrak KLO kloroform batang tumbuhan <i>D. trifoliata</i> , Tetrasiklin, Metronidazola dan Amoksisilin untuk penentuan MIC	137
Jadual 6.2 :	Sumber 45 kultur <i>H. pylori</i> yang digunakan dalam penentuan MIC	138
Jadual 6.3 :	Kandungan kaldu eugon yang mengandungi fraksi F2 serta air suling dan DMSO sebagai kawalan	140
Jadual 6.4 :	Keputusan pertumbuhan <i>H. pylori</i> pada siri kepekatan fraksi F2	145
Jadual 6.5 :	Perbandingan nilai MIC ₅₀ dan MIC ₉₀ fraksi F2 dan antibiotik (tetrasiklin, metronidazola dan amoksisilin) dan ekstrak KLO	146
Jadual 6.6 :	Keputusan pertumbuhan <i>H. pylori</i> pada siri kepekatan ekstrak KLO	147
Jadual 6.7 :	Keputusan pertumbuhan <i>H. pylori</i> pada siri kepekatan tetrasiklin	149
Jadual 6.8 :	Keputusan pertumbuhan <i>H. pylori</i> pada siri kepekatan metronidazola	150
Jadual 6.9 :	Keputusan pertumbuhan <i>H. pylori</i> pada siri kepekatan amoksisilin	151
Jadual 7.1 :	Berat molekul, formula empirikal, corak pemecahan ion dan nama sebatian yang terdapat dalam F2	173
Jadual 7.2 :	Berat molekul, formula empirikal, corak pemecahan ion dan Nama sebatian yang terdapat dalam komponen A (LC-MS)	179
Jadual 7.3 :	Berat molekul, formula empirikal, corak pemecahan ion dan Nama sebatian yang terdapat dalam komponen B (LC-MS)	183

SENARAI PLAT

<u>Senarai</u>	<u>Tajuk</u>	<u>M/surat</u>
Plat 2.1 :	Perencatan pertumbuhan <i>H.pylori</i> pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S1-S32.	48
Plat 2.2 :	Perencatan pertumbuhan <i>H.pylori</i> pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S33-S64.	54
Plat 2.3 :	Perencatan pertumbuhan <i>H.pylori</i> pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S65-S96.	59
Plat 2.4 :	Perencatan pertumbuhan <i>H.pylori</i> pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S97-S128.	64
Plat 2.5 :	Perencatan pertumbuhan <i>H.pylori</i> pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S129-S148.	69
Plat 3.1 :	Kesan ekstrak PE, KLO, MET dan DMSO (kawalan) terhadap bakteria patogen lain dan <i>H. pylori</i> dengan ujian pembauran cakera.	84
Plat 5.1 :	Kesan lima fraksi F1, F2, F3, F4, F5 dan ekstrak KLO tumbuhan <i>D. trifoliata</i> terhadap <i>H. pylori</i> dengan ujian pembauran cakera.	117
Plat 5.2 :	Kesan tiga fraksi F1, F2, F3, dan ekstrak KLO tumbuhan <i>D. trifoliata</i> terhadap patogen lain dan <i>H. pylori</i> (kawalan) dengan ujian pembauran cakera.	120
Plat 6.1 :	Mikrograf elektron untuk menunjukkan perubahan morfologi <i>H. pylori</i> selepas ditindakkan dengan fraksi F2.	158
Plat 7.1 :	Kesan komponen A dan komponen B daripada fraksi F2 dan fraksi F2 (kawalan) terhadap <i>H. pylori</i> dengan ujian pembauran cakera.	185

SENARAI RAJAH

<u>Senarai</u>	<u>Tajuk</u>	<u>M/surat</u>
Rajah 2.1	Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S1-S4 = <i>Phyllanthus niruri</i> , S5-S6 = (akar) <i>Labisia pumila</i> , S7-S8 = (daun) <i>Demos cochinchinensis</i> , S9-S12 = <i>Mimosa pudica</i> , S13-S16 = (daun) <i>Psidium guajava</i> , S17-S20 = (daun) <i>Neptunia oleraceae</i> , S21-S24 = (daun) <i>Sesbania grandiflora</i> , S25-S28 = (akar) <i>Jatropha podagrica</i> , S29-S32 = (daun) <i>Jatropha podagrica</i>	51
Rajah 2.2	Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S33-S36 = (batang) <i>Jatropha podagrica</i> , S37-S40 = (daun) <i>Orthosiphon stamineus</i> , S41-S44 = (batang) <i>Orthosiphon stamineus</i> , S45-S48 = <i>Centella asiatica</i> , S49-S52 = (daun) <i>Limnocharis flava</i> , S53-S56 = (daun) <i>Pereskia saecnarosa</i> , S57-S60 = (biji) <i>Solanum torvum</i> , S61-S64 = (daun) <i>Colubrina asiatica</i> .	56
Rajah 2.3	Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S65-S68 = (ubi) <i>Zingiber officinalis</i> , S69-S72 = (daun) <i>Mitrasaeme alsinoides</i> , S73-S76 = (ubi) <i>Languas galanga</i> , S77-S80 = (batang) <i>Derris trifoliata</i> , S81-S84 = (daun) <i>Pluchea indica</i> , S85-S88 = (daun) <i>Melastoma malabathricum</i> (var-blue), S89-S92 = (batang) <i>Melastoma malabathricum</i> (var-blue), S93-S96 = (daun) <i>Hibiscus rosa sinensis</i> (var-white).	61
Rajah 2.4	Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S97-S100 = (batang) <i>Hibiscus rosa sinensis</i> (var-white), S101-S104 = (daun) <i>Chomolaena odorata</i> , S105-S108 = (batang) <i>Tinospora ordifolia</i> , S109-S112 = (daun) <i>Calotropis gigantean</i> , S113-S116 = (daun) <i>Cosmos caudatus</i> , S117-S120 = (daun) <i>Polygonum minus</i> , S121-S124 = (biji) <i>Parkia speciosa</i> , S125-S128 = (batang) <i>Cymbopogon citratus</i> .	66
Rajah 2.5	Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S129-S132 = (daun) <i>Kaemferia galanga</i> , S133-S136 = (ubi) <i>Kaemferia galanga</i> , S137-S140 = (daun) <i>Piper betle</i> , S141-S144 = (bunga) <i>Phaeomeria imperialis</i> , S145-S148 = (daun) <i>Ficus deltoides</i> .	71

<u>Senarai</u>	<u>Tajuk</u>	<u>M/surat</u>
Rajah 4.1 :	Kombinasi pelarut toluena, etil asetat dan dietilamina; A=7:2:1, B=7:3:0, C=7:0:3 dan D=7:1:2 untuk pemisahan ekstrak KLO	107
Rajah 6.1 :	Perubahan bilangan sel <i>H. pylori</i> (CFU/ml) mengikut masa apabila dikulturkan dalam medium yang mengandungi fraksi F2 pada kepekatan yang berbeza	153
Rajah 6.2 :	Perubahan bilangan sel <i>H. pylori</i> mengikut masa apabila dikulturkan dalam medium yang mengandungi fraksi F2 pada kepekatan yang berbeza untuk bentuk spiral	155
Rajah 6.3 :	Perubahan bilangan sel <i>H. pylori</i> mengikut masa apabila dikulturkan dalam medium yang mengandungi fraksi F2 pada kepekatan yang berbeza untuk bentuk kokoid	156
Rajah 7.1 :	Sebatian 1,10 – fenothrolina, 2,9 – dimetil- daripada rujukan perpustakaan GC-MS	171
Rajah 7.2 :	Sebatian N,N,-dietil acetamide daripada rujukan perpustakaan GC-MS	172
Rajah 7.3 :	Pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen A pada retensi masa 0 hingga 20	175
Rajah 7.4 :	Spektrum jisim pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen A daripada Rajah 7.3	176
Rajah 7.5 :	Puncak yang paling tajam dan jelas yang dihasilkan oleh komponen A pada retensi masa 0 hingga 20	177
Rajah 7.6 :	Spektrum jisim puncak yang paling tajam dan jelas yang dihasilkan oleh komponen A daripada Rajah 7.5	178
Rajah 7.7 :	Pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen B pada retensi masa 0 hingga 20	181
Rajah 7.8 :	Spektrum jisim pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen B daripada Rajah 7.8	182

SENARAI RINGKASAN

1. PE : petroleum eter
2. KLO : kloroform
3. MET : metanol
4. EA : ekstrak air suling
5. DMSO : dimetilsulfoksida
6. EBA : agar Eugon dicampur dengan 10% (i/i) darah
7. TSB : medium Soya Triptikase
8. MHA : agar Mueller Hinton II
9. TZ : tiada zon perencatan
10. M (Bab 6) : direncat
11. T (Bab 6) : rintang
12. MIC : kepekatan perencatan minimum
13. LC₅₀ : Kepekatan membunuh 50%
14. CFU : Unit pembentukan koloni
15. LC-MS : Kromatografi Cecair- Spektrofotometer Jisim
16. GC-MS : Kromatografi Gas- Spektrofotometer Jisim
17. NIST : pengkalan data Institut Piawai dan Teknologi Kebangsaan, USA
18. bd : dua kali sehari (*bis die*)
19. tds /tid : tiga kali sehari (*ter in die*)
20. qid : Empat kali sehari (*quarter in die*)

ABSTRAK

Kajian dijalankan untuk mengecamkan tumbuhan tempatan yang mengandungi alkaloid dan mempunyai kegiatan anti-*H. pylori* yang aktif ; memfraksinaskan dan mengelusi fraksi alkaloid daripada ekstrak tumbuhan terpilih; menilai ketoksikan fraksi terhadap anak udang brin (*Artemia salina*) dan tindakannya terhadap *H. pylori* untuk mendapatkan fraksi terpilih; menentukan MIC dan kesan fraksi terpilih terhadap pertumbuhan dan perubahan morfologi *H. pylori* dalam kultur sekelompok; dan akhir sekali menentukan identiti yang mungkin bagi sebatian kimia dalam fraksi terpilih. Sampel tumbuhan diekstrak menggunakan petroleum eter, diikuti dengan kloroform, metanol dan akhirnya air. Sebanyak 148 ekstrak daripada 32 spesies tumbuhan disaring untuk kegiatan anti-*H. pylori* dengan ujian pembauran cakera. Kesemua spesies tumbuhan menunjukkan aktiviti anti-*H. pylori* berdasarkan diameter perencatan. Ekstrak kloroform tumbuhan *Derris trifoliata* yang mengandungi alkaloid, fenol and flavonoid terpilih sebagai ekstrak yang paling aktif. Dengan kaedah kromatografi lapisan nipis, lima fraksi berjaya dipisahkan dengan gabungan pelarut toluena : etil asetat: dietilamina (7:2:1) dan tiga daripada fraksi itu dicamkan sebagai fraksi alkaloid berdasarkan pembentukan warna coklat dengan reagen Dragendorff dan pendarfluoran biru dan hijau di bawah sinaran ultralembayung. Dengan kromatografi turus, tiga fraksi alkaloid dielusi dan didapati fraksi F2 spesifik tindakannya terhadap *H. pylori* tanpa merencat pertumbuhan 13 patogen lain. Fraksi F2 juga tidak toksik ($LC_{50} = 966.5 \mu\text{g/ml}$) terhadap anak udang brin (*A. Salina*). MIC fraksi F2 ($MIC_{50} = 1-2 \mu\text{g/ml}$ dan $MIC_{90} = 2-4 \mu\text{g/ml}$) ialah jauh lebih rendah daripada nilai LC_{50} , mencadangkan yang fraksi ini aktif pada kepekatan yang tidak toksik. Dengan kajian kultur sekelompok, kadar pembunuhan ekstrak meningkat mengikut peningkatan kepekatan berdasarkan kejatuhan CFU/ml. Berdasarkan hitungan

langsung sel spiral masih wujud ketika CFU tidak dapat dikesan, mencadangkan yang sel spiral itu mati secara langsung. Sel spiral juga didapati bertukar menjadi kokoid. Kajian menggunakan mikroskop elektron membuktikan kehadiran kokoid dengan banyak dan tidak ada perubahan morfologi sel spiral yang nyata. Fraksi F2 dilarutkan dalam metanol dan analisis GC-MS menunjukkan dua komponen, A dan B. Kedua-dua komponen ini secara berasingan masih lagi aktif merencat pertumbuhan *H. pylori* dengan komponen B lebih besar diameter perencatannya. Dengan kajian LC-MS komponen B mengandungi banyak sebatian dan menghasilkan keputusan puncak yang banyak dan susah dianalisis. Manakala, komponen A juga didapati menghasilkan banyak sebatian tetapi satu puncak yang begitu jelas dan tajam dapat diperhatikan. Berdasarkan perpustakaan GC-MS dan pengkalan data NIST, sebatian utama dan yang paling mungkin dalam fraksi F2 adalah 1,10-fenonthrolina, 2,9-dimetil atau N,N,-dietil asetamida atau Defoksin.

Studies on toxicity and anti-*Helicobacter pylori* activity of local medicinal plants with emphasis on alkaloid-containing fractions of *Derris trifoliata*.

ABSTRACT

This research was performed to: identify local plants which contain alkaloid and with active anti-*H. pylori* activities; fractionate and elute alkaloids from extract of a selected plant; evaluate selected fraction with regards to its toxicity on brine shrimp *Artemia salina* and its specificity on *H. pylori* ; determine the MIC of selected fraction and its effect on growth and morphological changes of *H. pylori* in batch culture; and finally, determine the probable chemical identity of compound in the selected fraction. The plants were extracted by using solvents started with petroleum ether followed by chloroform, methanol and water. One hundred and forty eight extracts from thirty two plant species were used to screen for anti- *H. pylori* activity by using disc diffusion assay. All the plants species showed anti-*H. pylori* activity based on the presence of inhibition zone. Chloroform extract of *Derris trifoliata* which contains alkaloids, phenols and flavonoid was selected as the most active. Thin layer chromatography using a solvent combination of toluene: ethyl acetate: diethylamine (7:2:1) gave five fractions and three of them were identified as alkaloids based on the development of brown color after reacting with Dragendorff reagent and blue and green fluorescence under ultra violet scan. By column chromatography, these three fractions were eluted and fraction F2 was specific against *H. pylori* without inhibiting 13 other pathogens tested using disc diffusion assay. The toxicity of F2 fraction against *A. salina* was low ($LC_{50} = 966.5 \mu\text{g/ml}$).

The MIC of F2 fraction ($MIC_{50}= 1- 2 \mu\text{g/ml}$ and $MIC_{90}= 2-4 \mu\text{g/ml}$) was very much lower than LC_{50} , suggested that this fraction was active at non-toxic concentration. By batch culture, killing rate of F2 increased with increased in concentration based on declined in CFU/ml. Based on direct count, spiral cells still existed at the time when CFU was undetected. Spiral cells were also transformed to coccoids. Electron microscopic studies confirmed the existence of many coccoids and lack of clear morphological changes of spiral cells. F2 fraction was dissolved in methanol and GC-MS analysis revealed the presence of two components, A and B. Both these components separately still showed anti-*H.pylori* activity with the B component being more active based on inhibition zone diameter. Studies using LC-MS showed that component B is a mixture of many compounds giving many peaks and difficult to analyze. The A component is also a mixture of several compounds but one clear and sharp peak is clearly seen. With reference to the GC-MS library and NIST database, the major and most probable compound in F2 fraction is 1,10 – phenanthrolina, 2,9 – dimethyl or N,N,-diethyl acetamide or Defoxin.

1.0 TINJAUAN BACAAN

1.1 SEJARAH PENEMUAN *HELICOBACTER PYLORI*.

Bakteria berbentuk spiral dipercayai wujud di dalam perut mamalia semenjak 130 tahun lalu dan pernah dilaporkan oleh Bottcher pada 1874. Kenyataan ini dikukuhkan lagi oleh kajian Salomon yang menunjukkan bakteria spiral yang menjangkiti kucing dan anjing boleh disebarkan kepada tikus. Bakteria berbentuk spiral mula-mula dilihat di dalam perut manusia oleh Kreinitz pada 1906 dan pada tahun 1924, Luck dan Seth melaporkan perut mempunyai aktiviti urease.

Dalam tahun 1975, seorang saintis, Howard Steer dari Southampton, UK, menemui struktur bakteria berbentuk spiral dengan menggunakan mikrograf elektron, bakteria tersebut wujud pada biopsi pesakit yang mengalami penyakit gastritis tetapi tidak dapat mengkulturkannya. Daripada kajian berkenaan, bakteria berbentuk spiral ini tidak menembusi sel epithelium, dan percubaan memencilkan bakteria tersebut gagal oleh kerana pertumbuhannya diatasi oleh bakteria *Pseudomonas* (Fung, 1975). Usaha diteruskan dan pada tahun 1979, oleh J. Robbin Warren daripada Hospital Royal Perth, Australia telah menjumpai sebilangan besar bakteria yang berbentuk spiral di dalam biopsi tisu perut manusia. Bakteria yang mendiami bahagian bawah lapisan mukosa perut ini sering dikaitkan dengan inflamasi tisu (Hazell and Lee, 1986).

Marshall & Warren (1984) mendapati kebanyakan pesakit gastritis atau ulser dijangkiti oleh bakteria berbentuk spiral, tetapi usaha beliau untuk memencil bakteria tersebut dengan menggunakan keadaan pengkulturan yang sama seperti *Campylobacter* iaitu keadaan mikroaerofili menemui kegagalan.

Insiden secara tidak sengaja telah memberi makna yang besar di mana biopsi yang ke-35 yang tertinggal di dalam inkubator selama 5 hari oleh kerana cuti Easter pada bulan April 1982 telah berjaya menghasilkan koloni bakteria spiral ini. Dengan kejayaan ini maka dapatlah pada akhirnya bakteria ini dipencilkan dan ditulinkan. Bakteria yang berbentuk spiral yang baru dipencilkan itu diberi nama *Campylobacter pyloridis*, nama genus *Campylobacter* dikekalkan oleh kerana bentuknya serta keperluan komposisi gas untuk pengkulturannya adalah sama dengan ahli genus tersebut.

Nama *Campylobacter pyloridis* ini kemudiannya ditukar kepada nama *Campylobacter pylori* oleh kerana nama spesies *pyloridis* itu dianggap salah daripada segi tatabahasa bahasa Inggeris. Teknik biologi molekul dan analisis 16S rRNA telah digunakan dalam kajian bakteria ini, tetapi ianya mendapati bahawa bakteria *C. pylori* ini sebenarnya tiada kena mengena dengan genus *Campylobacter*. Oleh itu pada tahun 1988 suatu genus baru, *Helicobacter* telah dicadangkan oleh sekumpulan ahli mikrobiologi Perth dan Kolej Antarabangsa, Australia. Maka pada Jun 1989, penerbitan 'International Journal of Systematic Bacteriology' telah menerima pakai terbitan baru mengenai genus *Helicobacter* dan dengan itu nama *C. pylori* akhirnya ditukarkan kepada *H. pylori* (Goodwin *et al.*, 1989). Ini semua diringkaskan pada Jadual 1.1.

Jadual 1.1 : Sejarah Penemuan *Helicobacter pylori*

Tahun	Saintis Yang Terlibat	Aktiviti
1874	Bottcher	Bakteria yang berbentuk spiral dijumpai dalam perut mamalia
1874	Salomon	Jangkitan bakteria berbentuk spiral daripada kucing dan anjing menular kepada tikus.
1906	Kreinitz	Bakteria berbentuk spiral dijumpai dalam perut manusia.
1924	Luck dan Seth	Perut manusia mempunyai aktiviti urease
1975	Howard Steer	Bakteria berbentuk spiral disahkan dengan elektronmikrograf tetapi tidak dapat mengukulturkannya.
1979	Robbin Warren	Menjumpai bakteria berbentuk spiral di dalam biopsi tisu perut manusia.
1982	Warren & Marshall	Berjaya mengkulturkan bakteria berbentuk spiral dan dikenali sebagai <i>Campylobacter pyloridis</i> .
1984	Warren & Marshall	Mengesahkan jangkitan ulser dan gastritis adalah disebabkan oleh bakteria berbentuk spiral ini.
1988	Sekumpulan ahli mikrobiologi Perth dan Kolej Antarabangsa Australia	Mencadangkan nama baru bagi bakteria ini iaitu <i>Helicobacter pylori</i> .
1989	Goodwin <i>et al.</i> , (1989)	International Journal of Systematic Bacteriology menerima pakai nama baru ini.

1.2 CIRI-CIRI BAKTERIA *HELICOBACTER PYLORI*.

Helicobacter pylori adalah sejenis bakteria Gram negatif, bersaiz 0.5 µm X 3.0 µm dan memerlukan keadaan persekitaran mikroaerofili dan bentuknya adalah rod atau spiral dan bersifat motil yang baik dengan kehadiran empat sehingga enam flagelum serta mempunyai sebanyak tiga hingga lapan putaran spiral dan diakhiri dengan hujung belakang yang tumpul (Goodwin *et al.*, 1989).

Pengkolonian *H. pylori* pada lapisan perut bukanlah dianggap suatu fenomena yang baru (Graham *et al.*, 1992). Ciri-ciri dan sifat-sifat unik bakteria ini menyebabkan ia mempunyai keupayaan untuk hidup di persekitaran dalam perut yang mempunyai tahap berasid yang tinggi iaitu pada pH yang rendah yang mana tidak mampu diduduki oleh organisma lain dengan menghasilkan sejumlah besar enzim urease. Selain itu flagelum yang memiliki struktur 'bak ekor' tersebut membantu *H. pylori* untuk tiba ke permukaan mukosa perut sehinggalah ia mampu melekat pada kawasan lapisan bawah. Pertahanan daripada tindakan asid hidroklorik telah mewujudkan satu persekitaran mikro di mana keseimbangan keasidan dan kealkalian menghampiri nilai neutral (Sasser, 1992). Tindakbalas enzim urease yang dihasilkan oleh *H. pylori* dan aktiviti enzim tersebut menukarkan urea kepada ammonia dan bikarbonat telah menjadi satu mekanisme yang dapat membenarkan *H. pylori* melawan tindakan asid perut (Neithercut *et al.*, 1993). Enzim urease ini bertindak dengan menukarkan urea di dalam perut kepada bikarbonat dan ammonia yang merupakan bes kuat. Proses ini sebenarnya telah mewujudkan awan ammonia yang neutral yang membolehkan organisma ini terselamat daripada persekitaran berasid dalam perut (Krishnamurthy *et al.*, 1998). Enzim urease yang sentiasa dihasilkan oleh

H. pylori dalam kuantiti yang banyak merupakan enzim yang istimewa kerana nilai Kmnya yang rendah.

Bakteria *H. pylori* berbentuk spiral atau melengkung pada lapisan mukosa gastrik. Ia sebenarnya hadir di dalam tiga bentuk iaitu spiral atau heliks, kokoid dan perantaraan. Bentuk spiral banyak didapati di dalam kultur segar. Ia akan berubah kepada bentuk kokoid di dalam kultur tua atau selepas 84 jam atau jika faktor persekitaran tidak sesuai seperti peningkatan kandungan ammonia atau oksigen di dalam medium (Dorrell *et al.*, 1998).

Walaupun bentuk kokoid *H. pylori* tidak mampu untuk bertumbuh atau dikultur, namun ia mungkin masih berkebolehan untuk bermandiri (Bode *et al.*, 1993; Shahamat *et al.*, 1993; Willen *et al.*, 2000). Satu kajian jujukan genom oleh Tomb *et al.*, (1997) menjelaskan bahawa *H. pylori* mempunyai protein yang homolog walaupun dalam bentuk yang berlainan. Hal ini berkemungkinan membantu *H. pylori* sewaktu menghadapi keadaan kebuluran sumber karbon dan juga faktor kemandirian yang lain pada fasa tetap. Oleh itu, bentuk kokoid ini mungkin merupakan satu mekanisme kemandirian alamiah untuk merintangikan saat-saat kebuluran yang membantunya beradaptasi secara sementara kepada persekitaran yang kurang sesuai (Mizoguchi *et al.*, 1999).

Perubahan morfologi sel *H. pylori* juga berlaku diakibatkan oleh kesan aktiviti antimikrob (De Loney & Schiller, 1999). Setakat ini hanya bentuk spiral atau heliks yang dapat dikulturkan dan membentuk koloni manakala bentuk kokoid dan perantaraan tidak dapat membentuk koloni (Kusters *et al.*, 1997). Kajian oleh beliau selanjutnya, telah membuktikan bahawa penindasan protein atau sintesis RNA tidak memberikan kesan ke atas fenomena kokoid dan sel yang kokoid juga telah dipastikan tidak mempunyai potensi membran yang

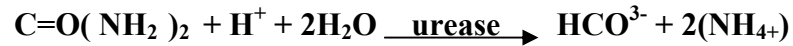
boleh diukur. Hasil kajian ini telah menguatkan lagi teori bahawa sel-sel kokoid sebenarnya mati dan merupakan bentuk muktamat yang kekal selepas terjadinya pertukaran daripada sel bentuk spiral.

1.3 **KAITAN *H. PYLORI* DENGAN PEPTIK ULSER.**

Helicobacter pylori merupakan bakteria penting dalam masalah gastroenterologi (Lehours, 2003). Ia juga telah dikenal pasti sebagai patogen utama penyakit peptik ulser, gastritis atropik, adenokarsinoma gastrik dan limfoma MALT (Schuster, 2002) Saling kait di antara bakteria ini dengan kejadian ulser jelas di mana 66% daripada kes yang dilaporkan adalah akibat daripada jangkitan *H. pylori* manakala 8.5% adalah akibat penggunaan agen anti-inflamasi bukan steroid (NSAIDs), 8.5% adalah daripada kedua-dua faktor iaitu jangkitan *H. pylori* dan NSAIDs serta 17% adalah bukan daripada kedua-dua faktor ini (Xia *et al.*, 2001). NSAIDs wujud sebagai penyebab ulser menerusi mekanisme yang tidak berkaitan dengan *H. pylori* serta merupakan faktor umum ulser bagi pesakit *H. pylori*-negatif (Lai *et al.*, 2003) . Kajian sekarang menunjukkan jangkitan *H. pylori* merupakan risiko kepada pertumbuhan ulser gastrik tetapi tiada bukti menunjukkan penggunaan NSAIDs meningkatkan pertumbuhan ulser gastrik ini (Matsukawa *et al.*, 2003).

Peranan utama lapisan mukosa adalah melindungi perut daripada jus gastrik yang mengandungi enzim penghadaman dan asid hidroklorik. Bahan kimia bersifat bes yang terhasil daripada tindakan enzim urease serta merta mencipta zon mikro neutral yang melindungi bakteria ini (Sasser, 1992).

Tindakbalas penukaran urea kepada ammonia ditunjukkan seperti persamaan di bawah:



Faktor ini memudahkan pengkolonian *H. pylori* dan lama-kelamaan mendorong ke arah pembentukan peptik ulser (Sidebotham & Baron, 1990). Maka, *H. pylori* yang gemar mengkoloni permukaan antrum perut dan di sini ia akan berkembangbiak sambil mencederakan lapisan mukosa perumah. Perkara ini didorong pula oleh ciri kemotilan yang membolehkannya berenang bebas melalui saluran gastero-intestin perut dan pada lapisan mukosa (Lee, 1994). Pertumbuhan koloni *H. pylori* yang bertumpu pada permukaan mukosa untuk sesuatu tempoh masa yang lama sehingga mengakibatkan inflamasi yang teruk (Blaser, 1992). Proses ini berlarutan sehingga berminggu-minggu atau berbulan-bulan atau pada sesetengah kes, bertahun-tahun lamanya. Pada masa yang sama bilangan leukosit polimorf berkurangan dan mengakibatkan kecederaan pada permukaan lapisan epithelium. Oleh itu ketidakseimbangan antara faktor pelindung seperti mukosa dan faktor agresif seperti asid dan pepsin, maka ulser dengan mudahnya akan terjadi (Peterson *et al.*, 1993).

Pesakit kebanyakannya akan mengalami inflamasi yang mengakibatkan lapisan mukosanya membengkak dan akhirnya menjadi ulser. Kajian juga menunjukkan penyakit bengkak gastritis pada kanak-kanak disebabkan oleh *H. pylori* telah sama berlaku pada orang dewasa (Miyamoto *et al.*, 2003). Faktor pertahanan oleh *H. pylori* itu sendiri menerusi perembesan enzim urease menjadikan sistem pertahanan tubuh manusia lazimnya tidak berupaya untuk

menjejaki bakteria yang mengkoloni permukaan mukosa. Terdapat komponen struktur kimia *H. pylori* yang mirip seperti molekul daripada dinding sel perumah yang mempengaruhi keadaan ini (Yang, 2003).

Masalah ini berlanjutan dan mengakibatkan atrofi gastritis kesan daripada inflamasi yang kronik (Keto *et al.*, 2001; Plein *et al.*, 2001). Atrofi bermakan suatu keadaan kehilangan tisu berketanjar disebabkan oleh kecederaan yang sama dan berulang pada lapisan mukosa perut (Sanduleanu *et al.*, 2001). Malah ia juga merupakan prekursor kepada berlakunya adenokarsinoma gastrik, yang menjadi penyebab kedua utama kematian di Amerika (Blaser, 1999). Makrofaj, sel-sel limfosit dan sel-sel plasma dihantar oleh sistem pertahanan badan ke kawasan berlakunya inflamasi (Blaser & Kirschner, 1999).

Penghasilan daripada kegiatan ini, seperti radikal oksigen, enzim dan bahan metabolit merupakan punca yang bertanggungjawab menyebabkan kecederaan pada lapisan mukosa. Penghasilan asid gastrik akibat jangkitan *H. pylori* yang banyak mendedahkan lapisan mukosa duodenum kepada serangan asid tersebut dan akhirnya menyebabkan ulser peptik (Vines & Williams-Burgess, 1994). Keadaan ini menjadi teruk apabila lapisan mukosa menjadi semakin nipis. Hal ini dibuktikan dengan kajian yang menyatakan bahawa penipisan lapisan mukosa adalah disebabkan oleh aktiviti *H. pylori* (Sipponen & Seppala, 1992 ; Goggin *et al.*, 1993). Keputusan yang diperolehi daripada analisis tersebut, didapati ketebalan lapisan mukosa pesakit gastrik ulser adalah kurang berbanding dengan lapisan mukosa individu normal.

1.4 EPIDEMIOLOGI JANGKITAN

Penularan jangkitan *H. pylori* meliputi seluruh dunia dan prevalens jangkitan yang tinggi dapat dilihat di negara-negara yang sedang membangun (Moller *et al.*, 1995). *H. pylori* menjangkiti sekurang-kurangnya 50% populasi penduduk di dunia (Blaser *et al.*, 1995) dan 80% terdiri daripada penduduk di negara membangun (Marshall *et al.*, 1999). Data kajian menunjukkan 80% hingga 90% daripada populasi golongan dewasa mempunyai kebarangkalian untuk dijangkiti (Moller *et al.*, 1995). Prevalens jangkitan yang tinggi di kalangan kanak-kanak iaitu sebanyak 75% adalah disebabkan oleh status ekonomi dan tahap sanitasi yang rendah (Bazzoli *et al.*, 1998).

Selain daripada faktor umur, prevalens jangkitan *H. pylori* adalah berbeza mengikut bangsa/etnik dan jantina. Perbezaan prevalens jangkitan ini mungkin disebabkan oleh budaya dan cara hidup yang diamalkan serta faktor genetik/keturunan yang diwarisi (Goh, 1997). Oleh itu dalam kajian seroepidemiologi berikutnya dengan sampel secara rawak di seluruh Malaysia didapati kaum Cina adalah menyumbang 57.5% diikuti dengan kaum India 52.3% dan kaum Melayu 29.2% (Goh & Parasakthi, 2001). Di Pulau Pinang, prevalen jangkitan adalah paling tinggi di kalangan pendatang asing Bangladesh (23.1%) dan kaum India (21.7%) diikuti dengan kaum Cina (19.2%) manakala masyarakat Melayu mempunyai prevalen jangkitan yang paling rendah iaitu sebanyak 7.8% (Sasidharan, 2002). Prevalens jangkitan di kalangan masyarakat di India yang asimtomatik juga tinggi (Misra *et al.*, 1997). Kajian yang dijalankan di kawasan pedalaman Thailand menunjukkan jangkitan bermula lebih awal, 25% adalah dihidapi oleh kanak-kanak lingkungan usia 5 hingga 9

tahun, manakala 75% dihidapi oleh kumpulan berusia 30 hingga 49 tahun (Perez-Perez *et al.*, 1990).

1.5 TRANSMISI JANGKITAN

Transmisi *H. pylori* yang sebenarnya masih kabur namun penyebaran organisma ini dipercayai berlaku melalui mulut ke mulut (Akcan *et al.*, 2000). Penyentuhan dengan hasil muntah, plak gigi, air liur dan najis pesakit gastritis memungkinkan transmisi *H. pylori*. Ianya telah berjaya dikultur daripada plak gigi di kalangan pesakit dispeptik (Majmudar *et al.*, 1990). Pengkulturan daripada najis segar telah mengesahkan kehadirannya di dalam najis kanak-kanak Afrika (Thomas *et al.*, 1992). Banyak kajian cuba dilakukan tetapi menemui kegagalan kerana *H. pylori* tidak dapat dikulturkan selain daripada sampel-sampel tadi. Oleh itu satu kaedah yang lain digunakan untuk mengesan kehadiran *H. pylori* dengan menggunakan Tindakbalas Berantai Polimerase (PCR) (Mapstone *et al.*, 1993). Dengan menggunakan kaedah ini, DNA *H. pylori* dapat dikesan.

1.6 DIAGNOSIS JANGKITAN

Terdapat dua kaedah diagnosis *H. pylori* yang sering dilakukan termasuklah secara ujian invasif dan tak invasif (Fennerty, 1994). Kedua-dua kaedah ini masih lagi digunakan mengikut keadaan persekitaran dan tempat. Ini adalah kerana kos penyediaan perlu diambil kira bersesuaian dengan keupayaan kewangan.

1.6.1 Ujian secara invasif

Dalam ujian invasif, endoskopi perlu dilakukan untuk memperoleh biopsi antrum. Ia adalah bertujuan menentukan sama ada pesakit yang diambil biopsi tersebut dijangkiti *H. pylori* atau tidak. Lima pilihan kaedah boleh dijalankan setelah biopsi diperolehi iaitu histopatologi, ujian perwarnaan gram, ujian urease, pengkulturan dan juga melalui kaedah PCR.

1.6.1.1 Ujian Histologi

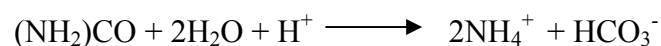
Kaedah ini menggunakan biopsi yang telah dijangkiti *H. pylori* dengan mengangkut biopsi dalam larutan formalin fosfat yang neutral dan selepas penetapan dalam formalin, biopsi tadi dibenam dalam parafin dan dibahagikan kepada saiz setipis 4-5 μm untuk dicelup dengan pencelup argentum Warthin Starry, giemsa, oren arkidina atau Haematoksilin-Eosin (H&E). Dengan pewarnaan haematoksilin dan eosin (H&E), pewarnaan Wright-Giemsa dan Brown-Hopps, biopsi tersebut telah diuji untuk menentukan kehadiran bakteria ini (Madan *et al.*, 1990). Bahagian biopsi yang dicelup dengan oren arkidina diperhatikan di bawah mikroskop pendarflour dan biopsi yang dicelup dengan pencelup Warthin Starry, giemsa dan H&E dilihat di bawah mikroskop cahaya. Pencelup Warthin Starry menjadikan sel-sel *H. pylori* kelihatan lebih jelas di bawah mikroskop (Westblom & Bhatt, 1999) Penyelidikan menunjukkan bahawa kaedah histologi mempunyai sensitiviti 100% berbanding dengan kaedah pengkulturan yang mempunyai 81% sensitiviti bagi mengesan *H. pylori* (Harries *et al.*, 1992). Pencelup ini juga boleh digunakan untuk mengesan *H. pylori* selepas rawatan antibiotik (Rollan *et al.*, 1997).

1.6.1.2 Ujian Perwarnaan Gram

Kaedah ini akan digunakan bagi mengesan kehadiran bakteria *H. pylori* dalam biopsi. Mikroskop cahaya biasa digunakan dengan teknik pewarnaan seperti pewarnaan Gram. Kehadiran *H. pylori* akan memberikan Gram negatif berwarna merah. Nilai sensitiviti untuk mengesan *H. pylori* yang lebih daripada 90% boleh dicapai (Parsonnet *et al.*, 1992). Kaedah ini didapati mudah, cepat dan sensitif.

1.6.1.3 Ujian urease

Ujian urease segera menunjukkan bahawa biopsi yang mengandungi *H. pylori* boleh menyebabkan perubahan warna kaldu urea daripada oren kepada merah jambu (McNulty *et al.*, 1999). Ujian komersial urease banyak dilakukan terus kepada spesimen biopsi antrum (Hyde *et al.*, 1999) dan bergantung kepada kehadiran enzim urease dalam *H. pylori*. Keadaan ini berlaku oleh kerana ion ammonium yang dihasilkan daripada hidrolisis urea oleh enzim urease meningkatkan pH dan mengubah warna penunjuk pH. Dengan kata lain, urease yang dihasilkan akan memangkinkan penghidrolisisan urea kepada ammonia dan bikarbonat seperti yang ditunjukkan dalam persamaan kimia berikut:



Peningkatan pH kaldu berlaku disebabkan oleh penghasilan ammonium hasil daripada tindakbalas ini. Hasil daripada banyak kajian dilakukan didapati bahawa ujian urease segera yang menggunakan kaldu urea Christensen ini memberikan spesifisiti 100% dan nilai sensitiviti 85% jika dibandingkan dengan ujian pewarnaan Gram, ujian histologi dan ujian pengkulturan (McNulty & Wyatt, 1999). Bakteria-bakteria lain yang urease positif tidak mengganggu dalam pengamalan ujian ini (Graham *et al.*, 1991). Ini adalah ciri

istimewa yang ada pada *H. pylori* untuk menghasilkan urease dengan kadar kereaktifan yang tinggi (Harris *et al.*, 1996). Aktiviti enzim urease didapati tinggi dalam *H. pylori* berbanding dengan bakteria yang lain (Neithercut *et al.*, 1991). Ujian ini juga amat mudah dan senang, ianya dapat dijalankan terus di bilik endoskopi dan pada sesetengah kes keputusan segera dapat diperolehi dimana ujian didapati positif walaupun pada ketika itu pesakit masih belum beredar dari bilik berkenaan. Ujian Urease segera ini juga mudah, murah serta cepat dijalankan dengan hanya memasukkan biopsi pesakit ke dalam kaldu urea Christensen dan tunggu sehingga perubahan warna berlaku.

1.6.1.4 Pengkulturan

Secara umumnya kaedah pengkulturan dianggap sebagai piawai emas atau 'gold standard' untuk mengesan *H. pylori* lagi pun ia adalah 100% spesifik (Ndip *et al.*, 2003). *H. pylori* mudah mati dalam atmosfera biasa, oleh itu satu kaedah pengkulturan yang betul mesti digunakan. Semasa perpindahan biopsi dari bilik endoskopi ke makmal, medium pengangkut seperti medium pengangkut Stuart (Oxoid,UK) digunakan untuk memelihara *H. pylori* dalam keadaan terturun sebelum ia dikulturkan. Bakteria ini juga memerlukan keadaan mikroaerofili suhu 37°C untuk pertumbuhan optimum. Medium yang digunakan adalah agar Eugon yang lembap dan dicampur dengan 5% ke 10% darah. Kaedah pengkulturan *H. pylori* adalah lebih daripada 95% sensitiviti dan sama dengan cara diagnosis secara pewarnaan.

1.6.1.5 Tindakbalas Berantai Polimerase (PCR)

Kaedah ini merupakan satu lagi kaedah yang digunakan untuk mengesan kehadiran *H. pylori* pada masa kini. Ia merupakan satu kaedah yang agak sensitif bagi mengesan *H. pylori* dengan mengamplifikasikan DNA sasaran

oleh tindakbalas berantai polimerase (PCR). Dengan menggunakan primer yang spesifik, didapati hanya DNA *H. pylori* sahaja yang dapat diamplifikasikan tetapi DNA bakteria lain yang menghasilkan urease tidak diamplifikasikan (Ho *et al.*, 1991). Kaedah PCR dikatakan mempunyai tahap spesifisiti dan sensitiviti yang 100% dibandingkan dengan kaedah pengkulturan dan histologi (Ichikawa *et al.*, 1996).

1.6.2 Ujian Secara Tak Invasif

Kaedah secara tak invasif yang sering digunakan ialah ujian serologi dan ujian pernafasan urea. Kedua-dua kaedah ini adalah cepat tetapi keputusan yang dihasilkan tidaklah begitu tepat jika dibandingkan dengan kaedah invasif.

1.6.2.1 Ujian pernafasan karbon -13 (^{13}C)

Prinsip asas yang digunakan dalam ujian pernafasan urea adalah dengan memberi pesakit memakan urea yang dilabel dengan ^{13}C atau ^{14}C . Kemudian urea yang berlabel itu akan sampai ke perut dan bertindak dengan enzim urease *H. pylori* untuk menghasilkan ammonia dan karbon dioksida yang berlabel. Karbon dioksida ini yang dibebaskan akan dikumpul untuk diuji kehadiran karbon berlabel berkenaan. Keputusan adalah positif jika terdapat kehadiran karbon berlabel, dan ini menandakan kewujudan enzim urease daripada kehadiran *H. pylori* di dalam perut pesakit berkenaan. Keputusan negatif jika ia adalah sebaliknya. Ujian ini biasanya mempunyai nilai peratusan sensitiviti dan spesifisiti lebih daripada 90% untuk mengesan *H. pylori* (Zubillaga *et al.*, 1997).

1.6.2.2 Ujian serologi

Pesakit biasanya lebih menggemari ujian serologi kerana ia cuma memerlukan pengambilan sampel darah yang sedikit serta biasa dilakukan di

hospital. Malah ianya lebih murah, segera dan mudah jika dibandingkan dengan ujian pernafasan. Pelbagai kaedah serologi yang telah digunakan untuk mendiagnosis jangkitan *H. pylori* termasuk haemaglutinasi pasif (Marshall *et al.*, 1984), penetapan komplemen (Jones *et al.*, 1986), aglutinasi lateks (Kokki *et al.*, 1990), ujian imunopendarfluor, ujian aglutinasi bakteria, Helicodot (Park *et al.*, 2002) dan ujian ELISA (Chen *et al.*, 2002). Secara umum berdasarkan kos, kesenangan dan kesederhanaan, ujian ELISA menjadi pilihan. Kaedah ini mempunyai nilai sensitiviti lebih daripada 95% dan nilai spesifisiti lebih daripada 92% (Chong *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998).

Pesakit yang telah dijangkiti *H. pylori* telah lama diketahui menghasilkan gerak balas antibodi setempat dan sistemik (Kaldov *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1986). Untuk itu sedikit darah pesakit diambil dan diemparkan untuk mengambil serumnya. Ia kemudiannya dicairkan dan dieramkan pada jangka masa yang tertentu dengan antigen *H. pylori* yang terlekat pada perigi plat. Antibodi yang tidak terikat dengan antigen *H. pylori* dibasuh keluar dan antibodi yang terlekat pada antigen dikesan melalui pengeraman dengan antibodi anti-manusia yang berkonjugat dengan enzim tertentu seperti peroksidase atau alkalin fosfatase. Enzim berkenaan secara tidak langsung terikat pada plat tadi dikesan melalui perubahan warna yang dihasilkan oleh substrat. Tindakbalas ini dihentikan dengan reagen penamat dan jumlah warna dalam setiap perigi itu dibaca dengan mesin pembaca ELISA. Masa yang diambil untuk ujian ini lebih kurang dua jam dan setiap hari boleh menguji lebih kurang seratus sampel serum manusia.

1.7 RAWATAN DAN TERAPI

1.7.1 Sejarah Penggunaan Antibiotik Untuk Merawat Jangkitan *H. pylori*

Suatu kaedah rawatan untuk membasmi kuman ini merupakan perkara yang sangat penting demi kesihatan penduduk dunia. Tetapi, malangnya telah dibuktikan sejak awal lagi bahawa *H. pylori* tidak dapat untuk dibasmi sepenuhnya (Glupczynski & Burette, 1990; Heilmann & Borchard, 1991; Tytgat *et al.*, 1993). Kesukaran dalam pembasmian patogen ini wujud kerana kerintangan antibiotik dan ketidakpatuhan pesakit dalam menjalani rawatan terhadap penyakit ini (Eisig *et al.*, 2004). Jika ia berjaya mengkolonisasikan perut manusia ia akan terus hidup di situ, kecuali setelah diberi rawatan yang sewajarnya. Walaupun pelbagai usaha penyelidikan telah dilakukan dalam bidang rawatan terhadap *H. pylori* tetapi ubat yang boleh membasmi bakteria ini dalam semua kes yang melibatkannya masih belum ditemui.

Dalam merawat jangkitan *H. pylori* ini, antibiotik dan drug digunakan untuk membunuh bakteria sasaran, mengurangkan keasidan perut serta melindungi lapisan perut. Walaupun aktiviti strain *H. pylori* mudah dipengaruhi oleh penggunaan antibiotik secara *in-vitro*, namun rawatan ke atas pesakit ini adalah agak sukar (Bina *et al.*, 2000). Usaha dilakukan dengan mempelopori penggunaan gabungan antibiotik bermula dengan beberapa faktor yang membenarkan penggunaan gabungan antibiotik, drug penindas asid, dan drug pelindung lapisan perut. Contoh antibiotik yang sering diguna termasuklah amoksisilin, metronidazola, klaritromisin, tetrasiklin, dan penisilin. Dua jenis drug penindas asid pula terdiri daripada perencat pam proton dan antagonis hidrogen. Manakala drug pelindung lapisan perut pula ialah bismuth. Kejayaan rawatan bakteria ini dapat dicapai melalui penggunaan

dua atau lebih antibiotik di samping menggunakan bismut atau perencat pam proton (De Loney & Schiller, 2000). Rawatan terhadap *H. pylori* biasanya memakan masa selama 10 hari atau dua minggu.

1.7.2 Antibiotik

1.7.2.1 Amoksisilin

Amoksisilin merupakan ahli antibiotik semisintetik penisilin dan diguna secara meluas untuk merawat jangkitan bakteria. Ia bersifat sensitif kepada tindakan penisilinase (Ball *et al.*, 1992). Antibiotik ini tidak digunakan secara tunggal memandangkan ia kurang aktif pada pH rendah. Ia bertindak paling aktif pada pH neutral serta mempunyai aktiviti intralumen. Kesan antimikrob amoksisilin dapat dilihat dengan lebih jelas apabila ia diguna bersama drug penindas asid, contohnya omeprazole (Labenz *et al.*, 1994). Seperti penisilin, amoksisilin bertindak merencat sintesis dinding sel *H. pylori* di mana amoksisilin akan bergabung dengan protein spesifik pada dinding sel bakteria. Kesan bakteriosid amoksisilin dikatakan mengakibatkan gangguan proses pembahagian sel dan dinding sel menjadi lisis secara langsung (Hirschl & Rotter, 1996).

1.7.2.2 Metronidazole

Metronidazole adalah satu antibiotik yang bertindak sebagai agen anti-trikomona sistemik yang pertama dan mula dipasarkan sejak tahun 1960. Di bawah keadaan anaerob, antibiotik ini sedia terkumpul secara intrasel. Tetapi aktiviti bakteriosid bergantung kepada tindakbalas penurunan drug pada kumpulan nitro (Peterson, *et al.*, 1986). *H. pylori* amat sensitif terhadap metronidazole. Malah *H. pylori* akan menjadi lebih sensitif jika disertai bersama bismut and amoksisilin. Oleh itu pemberian rawatan untuk antibiotik

ini hendaklah bersama dengan koloidal bismuth subsitrat dan amoksisilin atau tetrasiklin hidroklorida untuk memberikan kadar pembasmian *H. pylori* sebanyak 90%. (Hergueta *et al.*, 2002).

Tindakbalas metronidazola memberi kesan bakteriosid terhadap *H. pylori* dengan menghasilkan bahan intrasel yang bertindak merosakkan DNA sel bakteria. Oleh itu pengambilan dos dua kali sehari pada kepekatan yang tinggi dapat merencat pertumbuhan *H. pylori* (Bayerdorffer *et al.*, 1999). Metronidazola kurang sensitif terhadap pH tetapi tersebar dengan baik di dalam tisu badan. Antibiotik ini menyerap masuk ke dalam sel bakteria dan mengalami beberapa aktiviti penurunan iaitu kumpulan nitro ditukar kepada amino. Penukaran molekulnya kepada perantara yang toksik memastikan kepekatan metronidazola intrasel adalah rendah dan apabila drug ini memasuki sel bakteria, pendedahan bahan metabolit yang toksik ini boleh merosakkan DNA dan komponen sel yang lain (Bayerdorffer *et al.*, 1999).

1.7.2.3 Klaritromisin

Klaritromisin (6-metoksi-eritromisin) adalah sejenis makrolida, yang digolong dalam kumpulan Eritromisin. Klaritromisin lebih stabil dalam pH rendah dan diserap dengan lebih baik. Dengan dos yang tinggi iaitu 2g setiap hari dengan cara monoterapi, ia boleh menyembuhkan jangkitan *H. pylori* dengan baik. Klaritromisin seperti juga metronidazola, dimana penghasilan mutan yang rintang terhadapnya dalam perut dalam rawatan monoterapi (Wang *et al.*, 2001).

1.7.2.4 Tetrasiklin

Tetrasiklin bertindak dengan menghalang sintesis protein dengan melekat pada subunit ribosom 30S, ia menghalang perlekatan amino asid –

tRNA kepada RNA ribosom. Oleh itu sintesis polipeptida tidak berlaku. Tetrasiklin berkesan terhadap kedua-dua organisma Gram-positif dan Gram-negatif. Tetrasiklin penting dalam terapi tigaan (Bab 1.7.5.2) dan merupakan antibiotik yang aktif pada pH rendah dan rintangan *H.pylori* terhadapnya juga sangat jarang berlaku (Lopez-Brea *et al.*, 2001). Di dalam terapi tigaan ia digunakan bersama bismut dan metronidazola (Chan *et al.*, 1997).

1.7.3 Drug Pelindung Lapisan Perut

Lapisan mukosa perut dilindungi daripada asid dengan menggunakan bismuth subsalisiklat. Perlekatan bismut subsalisiklat pada glikoprotein mukosa menghalang perembesan pepsin (Tytgat *et al.*, 1993). Ini menjadikan persekitaran perut mempunyai nilai pH yang tinggi atau meningkat. Oleh itu kawasan ini menjadi sesuai untuk antibiotik bertindakbalas dengan *H. pylori*. Kehadiran bismut subsalisiklat menghalang perlekatan *H. pylori* dengan sel epitelium perut dan ia juga berkebolehan membunuh *H. pylori* (Gene *et al.*, 2003).

Suatu lagi bahan atau komponen yang baru yang digunakan dalam rawatan *H. pylori* ialah Ranitidina bismut sitrat (de Boer & Tytgat, 2000). Ianya mempunyai sifat anti rembesan gastrik. Bismut pula bertindak sebagai anti-*H. pylori* dan juga terlibat dalam penjagaan mukosa. Ranitidina bismut sitrat juga digunakan bersama-sama dengan klaritromisin dan amoksisilin (Alarcon *et al.*, 1999). Dengan penggunaan mengikut dos yang ditetapkan, ia adalah selamat dan sangat berkesan.

1.7.4 Penggunaan Drug Penindas Asid

1.7.4.1 Perencat pam proton

Mekanisme pengepaman asid di dalam perut dihentikan dengan menindas penghasilan asid oleh perencat pam proton ini. Mekanismenya adalah dengan menghalang aktiviti enzim hidrogen-potassium-adenosina trifosfatase yang bertanggungjawab mengepam proton di dalam perut (Adachi *et al.*, 2003). Ia bertindak dengan menukarkan hidrogen dan potassium melalui membran mikrovillus. Dua contoh perencat pam proton adalah omeprazola dan lansoprazola yang mana kedua-dua bertindak merencat penghasilan ion hidrogen dan merupakan agen anti-penghasil asid yang paling berkesan setakat ini. Berbanding dengan antagonis reseptor hidrogen, aktiviti perencat pam proton adalah aktiviti anti-*H. pylori* yang bertindak secara terus. Oleh itu perencat pam proton sering menjadi pilihan dalam merawat jangkitan *H. pylori* apabila antibiotik lain kurang berkesan pada persekitaran berasid (Davids *et al.*, 2002).

1.7.4.2 Antagonis Hidrogen

Antagonis reseptor hidrogen yang terdiri daripada simetidina, ranatidina, famotidina, nizatidina berfungsi dengan cara menghalang sintesis histamina terhadap reseptor H₂ antagonis pada sel parietal perut yang merupakan pendorong pengeluaran asid. Antagonis reseptor hidrogen seperti nizatidina biasanya digunakan dalam rawatan penyembuhan ulser (Adachi *et al.*, 2001). Secara tidak langsung, keadaan ini akan membantu mengurangkan rasa sakit akibat ulser selepas beberapa minggu.

Pada dos yang tinggi, ia boleh mengurangkan asid perut sebanyak 80% dalam masa semalaman. Semua drug yang termasuk dalam kumpulan ini

menjadi penyembuh ulser yang sangat baik (Adachi *et al.*, 2001). Secara berasingan ia tidak berkesan terhadap *H. pylori*, oleh itu antagonis reseptor hidrogen digunakan bersama-sama dengan antibiotik dan penghalang pam proton dalam rawatan *H. pylori*. Agen ini berbeza daripada agen yang lain kerana kesan dan potensinya yang kurang baik tetapi bukanlah untuk keseluruhan rawatan (Davids *et al.*, 2002)

1.7.5 Kaedah Terapi

Pakar perubatan atau doktor yang merawat penyakit jangkitan *H. pylori* biasanya tidak akan memberi rawatan antibiotik tunggal atau monoterapi kerana ianya tidaklah begitu efisien dan tidak digalakkan terhadap terapi *H. pylori*. Walaubagaimanapun perubatan ini sememangnya kompleks dan melibatkan gabungan satu, dua, atau lebih antibiotik serta penggunaan bersama drug lain (Pounder & Williams, 1997). Buat masa ini, rawatan yang paling terbukti keberkesanannya ialah melalui rawatan selama dua minggu dengan terapi ganda tiga. Terdapat juga terapi ganda empat dalam rawatan ini tetapi ianya masih terlalu awal untuk menggantikan kaedah terapi tigaan yang menjadi piawai dalam mengubati *H. pylori* (Treiber *et al.*, 1998). Selain terapi ini, terapi ganda dua juga dijalankan tetapi efisiensinya adalah rendah berbanding terapi ganda tiga.

1.7.5.1 Terapi Ganda Dua

Terapi ganda dua melibatkan penggunaan dua drug, iaitu antibiotik dan juga penindas asid. Rawatan ini biasanya terdiri daripada klaritromisin atau amoksisilin dan omeprazole atau lansoprazole yang bertindak sebagai perencat pam proton. Jangka masa rawatan adalah selama dua minggu. Walau bagaimanapun, kaedah ini sudah tidak berkesan dan telah digantikan dengan

terapi ganda tiga yang lebih berkesan menentang jangkitan *H. pylori* (Howden & Hunt, 1998) . Oleh itu Badan Pentadbiran Makanan dan Drug, Amerika Syarikat (FDA) tidak mencadangkan penggunaan kaedah terapi ganda dua sebagai kaedah primer dalam merawat jangkitan *H. pylori* memandangkan kadar pembasmiannya adalah kurang daripada 80% (Davids *et al.*, 2002)

1.7.5.2 Terapi Ganda Tiga

Terapi cara ini adalah paling berkesan di mana melibatkan gabungan antara dua antibiotik dengan sama ada bismut atau perencat pam proton, atau antagonis H₂. Kaedah terapi tigaan ini telah menjadi kaedah utama dalam mengubati jangkitan *H. pylori* sehingga kini (Treiber *et al.*, 1998) dengan kadar pembasmian yang ditunjukkan adalah melebihi 90% (Marshall *et al.*, 2000). Kaedah ini lebih cenderung untuk membasmi *H. pylori* dan bukan untuk menghasilkan strain-strain yang rintang di antara organisma yang masih bertahan. Terapi tigaan biasanya melibatkan penggunaan metronidazola, tetrasiklin atau amoksisilin, dan sebatian bismut (de Boer & Tytgat, 2000).

Gabungan dua antibiotik yang terdiri daripada klaritromisin (250 mg) dan metronidazola (400 mg) serta penggunaan omeprazola (20 mg) sebagai perencat pam proton, dikatakan berkesan. Penggunaan bismut sering dianggap menyebabkan kesan sampingan, maka ia digantikan dengan perencat pam proton dan jangka masa rawatan dikurangkan kepada tujuh hari (de Boer & Tytgat, 2000). Perencat pam proton dapat meningkatkan keberkesanan rawatan di mana ia meningkatkan pH perut, mengganggu persekitaran optimum *H. pylori* di dalam perut di samping menyediakan persekitaran yang sesuai untuk tindakan antibiotik yang lebih berkesan.

Klaritromisin stabil pada keadaan berasid, mudah larut dan cenderung bertindak pada lapisan mukosa perut. Gabungan-gabungan lain juga ada digunakan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1.2. Di samping melibatkan kos yang murah, kaedah terapi ganda tiga dikatakan 90% mampu memusnahkan kehadiran *H. pylori* (Zullo *et al.*, 2003).

1.7.5.3 Terapi Ganda Empat

Rawatan terapi ganda empat selama dua minggu melibatkan pengaruh dua jenis antibiotik, drug penindas asid dan pelindung lapisan perut merupakan kaedah terapi terkini dalam merawat jangkitan oleh *H. pylori*. Kadar pembunuhan yang dipamerkan melebihi 90% (Treiber *et al.*, 1998). Ianya juga dikenali sebagai terapi ganda tiga bismuth. Antara gabungan drug dan antibiotik yang digunakan ialah seperti perencat pam proton, bismuth, metronidazola dan tetrasiklin. Ia memerlukan prarawatan dengan perencat pam proton selama 3 hari.

Penggunaan metronidazola lebih berkesan apabila digabungkan bersama bismut, tetrasiklin dan perencat pam proton (Graham *et al.*, 2000). Rawatan selama 14 hari ini biasanya mencadangkan pengambilan metronidazola (500 mg), tetrasiklin (500 mg), omeprozola (20 mg), serta 2 tablet bismuth subsalisikat. Graham *et al.*, (2000), melaporkan daripada 26 pesakit, 24 orang daripadanya dapat disembuhkan di mana kadar kejayaan terapi ganda empat mencapai 92%. Tidak seperti kaedah terapi tigaan, tempoh rawatan dengan terapi ganda empat lebih singkat. Namun masalah yang sama masih lagi berlaku iaitu pesakit perlu mengambil dos harian yang banyak iaitu 4 kali sehari serta kesan sampingan lebih kerap berlaku. Ini menyebabkan pakar-

Jadual 1.2 : Gabungan terapi yang digunakan untuk menghapuskan *H. pylori*.

Omeprazole 40 mg sehari atau 20 mg bd - Amoksisilin 500 mg tds - atau Klaritromisin 500 mg tds	untuk 2 minggu
Bismuth subsalisilat 1 tablet (120 mg) qid atau 2 (240 mg) tablet bd - Amoksisilin 500 mg tds atau Tetrasiklin 500 mg tds - Metronidazola 400 mg tds	untuk 2 minggu
Omeprazole 20 mg sehari atau bd dan diikuti dengan 2 - Metronidazola 400 mg bd - Amoksisilin 500 mg bd - Klaritromisin 250 mg atau 500 mg bd	untuk 1 minggu
Histamin – penerima H ₂ antagonis (cth: Ranitidine 300 mg sehari atau Famotidine 40 mg sehari) - Amoksisilin 500 mg tds - Metronidazola 400 mg tds	untuk 2 minggu

Nota:

bd : dua kali sehari (*bis die*)

tds /tid : tiga kali sehari (*ter in die*)

qid : Empat kali sehari (*quarter in die*)

Sumber: <http://www.acadmed.org.my/cpg/>

pakar perubatan mengambil tindakan yang berhati-hati dalam memberi rawatan terapi ganda empat ini.

Contoh-contoh antibiotik, bahan pelindung lapisan perut dan bahan anti-penghasil asid yang digunakan dalam rawatan *H. pylori* diringkaskan dalam Jadual 1.2.

1.7.6 Masalah Daripada Penggunaan Antibiotik

1.7.6.1 Kerintangan terhadap antibiotik.

Keberkesanan kaedah terapi yang melibatkan gabungan antara antibiotik dan drug penindas asid dalam membasmi *H. pylori* dewasa ini tidak dinafikan. Namun masalah lain pula timbul yang menjadikan rawatan berkenaan masih mempunyai kelemahan. Penggunaan antibiotik didapati telah mewujudkan fenomena kerintangan terhadap antibiotik itu sendiri (Kalach *et al.*, 2001). Antibiotik pada kebiasaannya tidak diberikan secara monoterapi kerana kurang berkesan (Graham *et al.*, 1999). Rawatan yang diberikan melibatkan dua antibiotik, klaritromisin dan tetrasiklin atau amoksisilin atau metronidazola dan sejenis drug penindas asid (omeprazole) diberikan kepada pesakit.

Punca kegagalan rawatan disebabkan oleh kerintangan *H. pylori* terhadap klaritromisin atau metronidazola (Megraud *et al.*, 1997). Kerintangan terhadap klaritromisin adalah tinggi walaupun ia merupakan antibiotik yang paling berkesan untuk menentang *H. pylori* (Graham *et al.*, 2000). Hal ini pertama kali dilaporkan oleh Versalovic *et al.*, 1996. Klaritromisin adalah kumpulan makrolida yang mempunyai kerintangan silang terhadap antibiotik lain dalam kelas yang sama (Kalach *et al.*, 2001).

Keupayaan kerintangan terhadap antibiotik yang sering digunakan dalam terapi ganda tiga ini semakin meningkat (Graham, 1998) termasuklah metronidazola (Alarcon *et al.*, 1999) dan tidak terkecuali amoksisilin (Dore *et al.*, 1999). Mekanisme kerintangan antibiotik ini adalah disebabkan oleh mutasi yang berlaku dalam gen kromosom (Wang *et al.*, 2001). Prevalens kerintangan terhadap klaritromisin adalah sebanyak 5% dilaporkan semakin meningkat (Graham *et al.*, 1999).

Kerintangan terhadap klaritromisin adalah meragukan kerana penggunaan makrolida yang semakin banyak dan kerintangan klaritromisin adalah disebabkan oleh kerintangan silang di kalangan makrolida, termasuk eritromisin. Kerintangan klaritromisin banyak dikesan di dalam 96% pesakit (Graham *et al.*, 1999) setelah gagal dirawat oleh terapi ganda dua (klaritromisin dan omeprazole). Fenomena ini menjadi salah satu punca ketidakjayaan terapi ganda dua berbanding dengan terapi ganda tiga (Behrens *et al.*, 1999).

Pakar mempercayai bahawa penggunaan terapi yang berasaskan metronidazola dan klaritromisin adalah paling berkesan dalam merawat jangkitan *H. pylori*. Walaubagaimanapun, mengikut kajian di Amerika, kerintangan primer isolat *H. pylori* daripada beberapa hospital terhadap metronidazola dan klaritromisin adalah tinggi (Osato *et al.*, 1999). Kerintangan terhadap metronidazola mencadangkan penggunaan antibiotik yang lain sebagai alternatif rawatan (Coudron & Stratton, 1998). Di Malaysia, kerintangan terhadap metronidazola oleh beberapa strain *H. pylori* pernah dilaporkan (Parasakthi & Goh, 1992). Kajian yang di jalankan di Pulau Pinang menunjukkan MIC >8µg/ml bagi metronidazola (Azlan, *et al.*, 2002). Di

Singapura pula kadar kerintangan terhadap metronidazola dilaporkan meningkat daripada 20% hingga 62% antara tahun 1995 hingga awal tahun 1997 (Hua *et al.*, 1998).

Hal ini disebabkan oleh penggunaan metronidazola yang meluas di beberapa buah negara tropika untuk merawat jangkitan parasit tanpa kawalan (Megrand , 2001). Maka kerintangan metronidazola telah menimbulkan pelbagai kesan apabila pesakit yang mengalami kerintangan metronidazola dirawat dengan bismuth subsalisilat, metronidazola (250 mg) dan tetrasiklin (500 mg). Sebagai contoh, 65% yang mengalami kerintangan metronidazola berjaya dirawat setelah menggunakan gabungan tersebut (Graham *et al.*, 1999). Walaubagaimanapun di Korea, 76% pesakit yang rintang terhadap gabungan ini terpaksa menukarkan kepada gabungan omeprazole, amoksisilin dan klaritromisin (Kim *et al.*, 2003).

Penggunaan amoksisilin dalam rawatan telah menjadi suatu kemestian. Sejak tahun 1996, sebanyak tujuh strain *H. pylori* didapati mempamerkan tahap kerintangan yang tinggi terhadap amoksisilin (Han *et al.*, 1999). Kerintangan terhadap tetrasiklin dan amoksisilin bukan perkara biasa walaupun kerintangan beberapa strain *H. pylori* terhadap metronidazola dan klaritromisin biasa dilaporkan (Graham *et al.*, 1999).

Perkara penting terlibat dalam rawatan antibiotik terhadap *H. pylori* melibatkan drug yang turut diguna bagi jenis jangkitan lain. Oleh itu, analisis fenomena kerintangan ini haruslah memberi fokus terhadap kaitan bersama antibiotik dan bakteria patogen, di samping menekankan kepentingan analisis variasi geografi dan evolusi mengikut masa (Glupczynski *et al.*, 1992). Maka, gabungan antibiotik yang lain harus diteliti bagi mengelak masalah yang sama

timbul. Oleh sebab itu, kaedah alternatif yang lebih berkesan harus dikaji selain penggunaan antibiotik semata-mata.

Kerintangan antibiotik oleh *H. pylori* telah menjadi isu utama dalam mengubati pesakit ulser dan gastritis. Masalah ini perlu diambil kira dalam memilih gabungan agen-agen antibiotik yang lain memandangkan kerintangan antibiotik adalah punca utama kegagalan rawatan di dalam pesakit. Tambahan pula pesakit perlu mengikuti aturan pengambilan dos yang lebih kerap dalam kuantiti yang banyak dan masalah juga dikenalpasti sebagai salah satu kelemahan rawatan antibiotik. Punca dan akibat kegagalan rawatan masih berlaku setelah menggunakan pelbagai kaedah terapi yang moden (Goddard, 1998). Kajian yang lebih saintifik perlu dilakukan untuk menentukan gabungan antibiotik yang dapat mengatasi masalah ini. Kaedah rawatan alternatif perlu difikirkan segera agar dunia perubatan menemui penyelesaian masalah dalam merawat jangkitan oleh patogen *H. pylori* (Hazell, 1999).

1.7.6.2 Kesan sampingan.

Rawatan untuk jangkitan *H. pylori* telah menyebabkan kesan sampingan terhadap 30% individu (Goggin *et al.*, 1993). Gejala-gejala seperti cirit-birit, sakit tekak dan kolitis bak pseudomembran akan dialami oleh pesakit-pesakit berkenaan. Penggunaan amoksisilin, sebagai contohnya boleh mendatangkan kandidiasis, ruam dan cirit-birit dan tetrasiklin menyebabkan pelunturan warna gigi pada kanak-kanak manakala penggunaan metronidazole boleh mengakibatkan mual, cirit-birit dan perubahan deria rasa (Bergogne-Berezin, 2000).

Bismut pula mungkin menyebabkan sembelit, cirit-birit dan air liur menjadi hitam pada sesetengah pesakit. Tambahan pula jika gabungan

antibiotik tidak berkesan kepada pesakit, pegawai perubatan akan meningkatkan dos tinggi atau memberikan gabungan yang lain untuk menyembuhkan pesakit. Dengan itu kesan sampingan yang akan dialami mungkin lebih teruk (Abbas *et al.*, 2003).

1.7.6.3 Tak-komplian

Salah satu lagi punca kegagalan rawatan di kalangan pesakit yang dijangkiti oleh *H. pylori* ialah mereka tidak mematuhi arahan pengambilan antibiotik. Arahan agar dos dihabiskan pada jangkamasa yang ditetapkan, tidak dipatuhi. Perkara ini timbul kerana pesakit perlu mengambil dos ubat-ubatan yang banyak setiap hari untuk suatu jangkamasa yang agak panjang (Marshall *et al.*, 2000). Sebagai contoh rawatan terapi ganda tiga, ia memerlukan pesakit mengambil dos 2 kali sehari selama 10 hingga 14 hari. Terdapat juga kes serius yang memerlukan pesakit mengambil sehingga 20 pil sehari (Marshall *et al.*, 2000). Pengambilan pil yang banyak akan merumitkan pesakit. Oleh itu, pesakit mesti diterangkan dengan jelas mengenai masalah yang akan timbul sekiranya mereka tidak menghabiskan dos yang diberikan. Kerintangan antibiotik mudah berlaku jika pesakit tidak mengambil ubat-ubatan tersebut dengan teratur.

1.8 PELBAGAI TUMBUH-TUMBUHAN YANG MERENCAT *H. PYLORI* SECARA *IN-VITRO*

1.8.1 Sejarah Kegunaan Tumbuhan Dalam Rawatan Jangkitan

Alam sekeliling kita memang penuh dengan kepelbagaian tumbuh-tumbuhan. Ada di antaranya mempunyai sifat perubatan dan biasanya digunakan dalam perubatan tradisional. Penggunaan perubatan tradisional mempunyai pelbagai kelebihan berbanding dengan perubatan moden. Ini kerana ianya adalah murah, senang diamalkan oleh masyarakat tempatan dan kurang memberi kesan sampingan. Sebagai contohnya, Louis Pasteur merupakan orang pertama menerangkan kesan antibakteria ekstrak bawang putih. Sesuai dengan sejarah yang membuktikan khasiat bawang putih, ianya telah digunakan di seluruh pelosok dunia sebagai agen antibakteria kerana keberkesanannya terhadap kebanyakan patogen manusia. Ia juga didapati berkesan terhadap strain patogen yang didapati rintang terhadap rawatan antibiotik. Gabungan bawang putih dan antibiotik memberi kesan sinergistik dan bawang putih juga boleh menghalang penghasilan toksin oleh mikroorganisma (Sivam, 2001).

1.8.2 Kegiatan anti-*H. pylori* in-vitro Oleh Beberapa Tumbuhan

Setelah mengenalpasti masalah yang wujud hasil daripada penggunaan bahan kimia iaitu antibiotik maka para penyelidik sekarang mencuba kaedah baru dalam mencari bahan semulajadi yang menunjukkan aktiviti anti-*H. pylori*. Satu alternatif yang kian mendapat perhatian para penyelidik dan ternyata berkesan dalam membasmi *H. pylori* ialah dengan menggunakan tumbuhan yang pernah digunakan dalam perubatan tradisional. Kajian secara *in vitro* dan *in vivo* yang telah dilakukan ada menunjukkan kemungkinan *H. pylori* boleh dirawat dengan menggunakan pelbagai ubat tradisional (Cassel-Beraud *et al.*, 1991;

Fabry *et al.*, 1996a; Fabry *et al.*, 1996b; Zhang *et al.*, 1997; Germano *et al.*, 1998; Yesilada *et al.*, 1999; Sivam, 2001). Sehingga kini beberapa tumbuhan herba tempatan dan daripada seluruh dunia telah dikenalpasti mempunyai aktiviti anti-*H. pylori*. Rawatan dengan ubat tradisional tidak menunjukkan sebarang kesan sampingan berbanding dengan antibiotik komersial kerana kebanyakan ubat tersebut merupakan sebahagian daripada makanan harian dan amalan pemakanan manusia setempat.

1.8.2.1 Bawang Putih atau *Allium sativum*.

Bawang putih atau *Allium sativum* mempunyai komponen bioaktif iaitu alisin yang didapati menunjukkan kesan anti-*H. pylori* (Cellini *et al.*, 1996; Sivam *et al.*, 1997; O'Gara *et al.*, 2000; Sivam, 2001) dan kajian juga mendapati ada strain *H. pylori* yang rintang terhadap rawatan antibiotik metronidazola juga dapat dirawat dengan bawang putih (Cellini *et al.*, 1996). Bagi mengelakkan jangkitan bakteria ini, amalan mengambil *Allium sativum* dalam makanan harian masyarakat Malaysia perlu diteruskan. Bahan kimia yang terdapat di dalam *Allium sativum* mampu menjadi asas bagi terapi anti-*H. pylori* yang baru kerana kesan antimikrobnya yang luas dan dapat mengurangkan masalah kerintangan (O'Gara *et al.*, 2000).

Kesan langsung intragastrik boleh berlaku oleh sebab kesan antimikrobnya tidak akan dipengaruhi oleh persekitaran berasid di dalam perut malah jus gastrik itu sendiri dapat merangsang tindakan antimikrob ini. Berdasarkan data kajian yang diperolehi, insidens penyakit peptik ulser adalah rendah bagi mereka yang mengamalkan pemakanan bawang putih berbanding golongan yang mengambilnya dalam kuantiti rendah (Sivam *et al.*, 1997). Kajian yang dilaporkan oleh O'Gara *et al.* (2000), menunjukkan bahawa minyak

bawang putih adalah lebih berkesan berbanding kehadiran dalam bentuk serbuk, dengan nilai MIC 8 µg/ml hingga 32 µg/ml untuk minyak bawang putih dan 250 µg/ml hingga 500 µg/ml pula bawang putih dalam bentuk serbuk.

1.8.2.2 Buah Cili atau *Capsicum frutescens*.

Buah cili (*Capsicum frutescens*) memang menjadi makanan kegemaran masyarakat Malaysia. Siapa menyangka bahan aktif iaitu kapsaisin yang ditemui di dalam sejenis lada berkesan terhadap penyakit gastroduodenum. Ia merencat *H. pylori* pada kepekatan lebih daripada 10 µg/ml (Jones *et al.*, 1997). Para doktor memang melarang keras pengambilan makanan pedas termasuklah kapsaisin bagi golongan pesakit ulser perut. Tetapi penyelidikan yang dijalankan oleh Jones *et al.*, (1997) membuktikan bahawa kapsaisin merencat pertumbuhan *H. pylori* sekaligus mengubah persepsi ini. Kapsaisin juga bertindak sebagai antispasmodik, dan juga mampu menghentikan pendarahan selepas menjalani rawatan ulser.

1.8.2.3 Madu dari pokok *Leptospermum scoparium*

Madu merupakan bahan yang mempunyai pelbagai keistimewaan dan ia juga tidak terkecuali dalam memberi potensi yang baik sebagai agen anti- *H. pylori*. Sejenis madu manuka, *Leptospermum scoparium* telah diguna secara tradisional dalam merawat dipepsia (al Somal *et al.*, 1994). Kebolehan madu ini telah diuji dengan ujian sensitif terhadap *H. pylori*. Malah dalam ujian MIC pula menunjukkan, penambahan madu manuka di dalam agar sebanyak 5% (v/v) sudah mampu merencat kesemua pertumbuhan dalam tempoh pengeraman selama 72 jam. Kajian ini juga dapat menunjukkan bahawa agen antibakteria menentang *H. pylori* juga hadir di dalam ekstrak pokok manuka.

Kajian lanjut juga dijalankan untuk menentukan aktiviti anti *H. pylori* oleh madu dipengaruhi oleh kawasan dapatan madu. Walaubagaimanapun, kesimpulan yang diperolehi daripada kajian ini menunjukkan bahawa kawasan dapatan madu tidak mempengaruhi kesan anti-*H. pylori* tetapi kehadiran hidrogen peroksida memberikan kesan membunuh kepadanya (Osato *et al.*, 1999).

1.8.2.4 Teh hitam atau teh hijau.

Ekstrak tumbuhan teh hitam atau teh hijau telah menunjukkan aktiviti anti-*H. pylori* (Matsubara *et al.*, 2003). Katechin, iaitu sejenis sebatian fenol yang meliputi 15% berat kering teh hijau menunjukkan pelbagai aktiviti biologi (Kaya *et al.*, 1990). Selain daripada itu tumbuhan teh ini juga mengandungi banyak komponen bioaktif yang lain yang boleh menjadi drug bagi rawatan *H. pylori*.

Kajian menunjukkan penggunaan sebatian katechin yang diekstrak daripada teh hijau ini dikatakan berupaya merencat *H. pylori* secara *in vivo* dan *in vitro* (Yanagawa *et al.*, 2003). Mekanisme tindakannya masih lagi agak kabur, tetapi kajian mengatakan aktiviti antibakteria ini berkait dengan bilangan kumpulan hidroksil. Laporan menunjukkan catechin berupaya memusnahkan membran lipid dwilapisan serta membran sel *H. pylori* (Yanagawa *et al.*, 2003). Kehadiran katechin bersama perencat pam proton yang akan meneutralkan asid di dalam perut adalah berkesan, seperti terapi ganda tiga (Mabe *et al.*, 1999).

1.8.2.5 Bunga cengkeh atau *Eugenia aromatic*.

Sebagai bahan yang mempunyai kandungan berminyak, ianya mampu memberi rasa kebas pada tisu dan akan mengurangkan rasa sakit. Ianya

digunakan secara tradisional dan memberi kesan sebagai agen antiseptik, antibakteria, anti-yis serta anti-ulser. Oleh itu *Eugenia aromatica* berpotensi sebagai agen antibakteria dan ia juga penting dalam merencatkan pertumbuhan *H. pylori* (Howard, 1983).

1.8.3 Perkembangan Kegunaan Ekstrak Tumbuhan Sebagai Anti-*H. pylori*.

Selain daripada tumbuhan yang dijelaskan sebelum (Bab 1.7.3) terdapat juga tumbuhan lain yang telah lama terbukti mempunyai aktiviti anti-*H. pylori*. Sejenis tumbuhan perubatan tempatan Jepun iaitu *Rabdosia trichocarpa*, secara tradisionalnya digunakan untuk mengubati sakit perut didapati mengandungi bahan antimikrob yang mampu merencat pertumbuhan *H. pylori*. Ekstrak tumbuhan tradisional ini mungkin berpotensi dalam merawat gastritis (Kadota *et al.*, 1997).

Manakala tumbuhan peringkat tinggi dari Afrika Timur seperti *Entada abyssinica*, *Ximenia caffra*, *Azadirachta indica* dan *Spilanthes mauritiana* juga dilaporkan menunjukkan kesan anti-*H. pylori* (Fabry *et al.*, 1996a). Selain itu, ekstrak akues tumbuhan *Thymus* didapati merencat pertumbuhan dan aktiviti urease *H. pylori* manakala ekstrak *Cinnamomon* yang diekstrak dengan menggunakan alkohol juga didapati merencat pertumbuhan *H. pylori* (Tabak *et al.*, 1996).

Sejenis liken, *Cetraria islandia* mempunyai aktiviti anti-*H. pylori* setelah mendapati penggunaan tumbuhan ini secara tradisional untuk mengubati gastritis dan gastroduodenum (Ingolfssdottir *et al.*, 1997).

Perkembangan terhadap perubatan tradisional dalam usaha merawat *H. pylori* telah menarik ramai penyelidik-penyelidik luar negara menjalankan kajian. Dengan menggunakan tumbuhan bersifat perubatan yang biasanya

digunakan sebagai herba bagi perubatan tradisional di negara masing-masing seperti *Malagasy* (Cassel-Beraud *et al.*, 1991), *Terminalia spinosa* (Fabry *et al.*, 1996a), *Thyme* (Tabak *et al.*, 1996), *Terminalia spinosa*, *Ximenia caffra*, *Harrisonia abyssinica* (Fabry *et al.*, 1996b), *Rhizoma* spp (Zhang *et al.*, 1997), *Lycium chinense* (Kim *et al.*, 1997), *Cefraria islandia* (Igfoldsottir *et al.*, 1997) *Pteleopsis suberosa* (Germano *et al.*, 1998), ubat tradisional anti-ulser negara Turki (Yesilada *et al.*, 1999), *Epilobium* spp (Battinelli *et al.*, 2001), *Aristolochia paucinervis* (Gadhi *et al.*, 2001) dan *Yugatec mayam* (Ankli *et al.*, 2002) telah menunjukkan aktiviti anti-*H. pylori*. Boleh dikatakan setiap tahun bermula 1991, perkembangan kajian penyelidikan ini diterbitkan dalam makalah-makalah antarabangsa. Kesemua penyelidik tersebut melaporkan ekstrak daripada tumbuh-tumbuhan itu boleh menghalang pertumbuhan *H. pylori* dan sangat berguna untuk merawat penyakit gastritis dan ulser peptik.

Penyelidikan yang telah dan sedang dijalankan di Malaysia (Universiti Sains Malaysia) pula membuktikan keberkesanan ekstrak tumbuhan yang telah digunakan oleh masyarakat tempatan untuk mengurangkan sakit perut yang mungkin berkaitan dengan *H. pylori*. Tumbuhan yang digunakan ialah seperti *Languas (Alpinia) galanga*, *Zingiber officinale*, *Jatropha podargrica*, *Orthosiphon stamineus*, *Melastoma malabthricum*, *Hibiscus rosaisinensis*, *Zingiber spectabile* dan *Melia indica* (Uyub & Azlan, 2001). Kesemua jenis tumbuhan yang dinyatakan di atas biasanya digunakan oleh masyarakat tempatan untuk merawat sakit perut yang mungkin berkaitan dengan *H. pylori*.

Penyelidikan selanjutnya adalah amat diperlukan untuk mengetahui potensi tumbuhan tempatan ini sebagai alternatif kepada antibiotik dan drug bagi rawatan terhadap *H. pylori*. Kesan anti-*H. pylori* ini perlu diuji secara *in*

vivo pada masa akan datang untuk mengetahui aktivitiinya dalam keadaan sebenar perut manusia yang sangat berasid. Berdasarkan keputusan daripada kajian terkini yang telah dijalankan didapati ekstrak *Derris trifoliata* amat memberangsangkan berbanding dengan tumbuhan yang lain.

1.9 ***DERRIS TRIFOLIATA.***

Derris trifoliata adalah sejenis tumbuhan pemanjat yang berkayu. Ianya dikelaskan dalam famili Leguminosae, order Fabales dan subkelas Rosidae (Kamarudin & Latiff, 2002). Bunganya adalah berwarna putih. Daun berbentuk linear dan apeks yang emarginat serta permukaan bawah pudar. Rakis dan petiol pula berbulu. Nama tempatan yang digunakan adalah ‘Samseng’ (Terengganu), Ketui, Setui, Salang atau Malapari. Menurut Burkill pada tahun 1935, tumbuhan ini digunakan sebagai ubat perangsang, anti-kekejangan dan merawat gatal-gatal (Kamarudin & Latiff, 2002). Di Terengganu pula, ia digunakan oleh penduduk asli untuk mengubati sakit perut dan sakit batu karang. Cara penggunaannya adalah dengan merebus batang selama setengah hari atau sekurang-kurangnya enam jam. Ianya ditapis dan kemudiannya diminum. Ekstrak rotenoid tumbuhan daripada genus yang sama juga telah diuji iaitu *Derris malaccensis* yang juga bertindak sebagai anti *H. pylori* (Takashima *et al.*, 2002). Manakala *Derris scandens* digunakan untuk merawat penyakit arthritis (Laupattarakasem *et al.*, 2003).

1.10 OBJEKTIF KAJIAN

- Menyaring ekstrak tumbuhan tempatan yang merencat *H. pylori* secara *in-vitro*.
- Menentukan kandungan kimia tumbuhan terpilih (*D. trifoliata*) dan memisahkan ekstrak KLO kepada pelbagai fraksi alkaloid.
- Menguji spesifisiti tindakan pelbagai fraksi alkaloid terhadap *H. pylori* dan tahap ketoksikannya terhadap anak udang brin, *A. salina*.
- Menentukan kepekatan perencatan minimum (MIC) fraksi alkaloid dan kesannya terhadap pertumbuhan dan perubahan morfologi *H. pylori* dalam kultur sekelompok.
- Mengecamkan identiti kimia fraksi aktif alkaloid berdasarkan kepada rujukan perpustakaan GC-MS dan NIST.

2 **PENYARINGAN EKSTRAK TUMBUH-TUMBUHAN YANG DAPAT MERENCAT *H. PYLORI*.**

2.1 **PENGENALAN AM**

Penggunaan perubatan tradisional yang terdiri daripada tumbuh-tumbuhan semulajadi lebih mudah diterima oleh sistem tubuh kita berbanding dengan drug sintetik. Perkara ini disebabkan oleh kepekatan bahan aktif di dalam tumbuhan semakin rendah semasa persediaan ekstrak dilakukan. Kepekatan yang rendah boleh diterima oleh badan tanpa sebarang kesan ketoksikan kecuali bagi beberapa jenis tumbuhan yang amat toksik (Fasihuddin & Hasmah, 1993). Sementara itu penggunaan antibiotik pula dalam rawatan memberi kesan terhadap flora normal menyebabkan kewujudan kesan sampingan (Adamek *et al.*, 1992)

Dalam hal ini, terdapat banyak tumbuhan yang digunakan dalam perubatan tradisional. Kebanyakan pengamal perubatan tradisional ini tidak mempunyai bukti saintifik, kerana ianya hanya berdasarkan kepada pesanan atau amalan yang telah dilakukan oleh generasi terdahulu. Oleh itu, bukti daripada kajian saintifik perlu dilakukan untuk memastikan bahawa dakwaan pengamal perubatan ini mempunyai asas.

Dalam melaksanakan hal yang berkaitan dengan ini, pengumpulan data yang berkaitan dengan tumbuhan yang dapat mengubati penyakit ulser, sakit perut dan berkaitan dengannya telah dilakukan untuk ujian penyaringan terhadap pertumbuhan *H. pylori*. Asas kepada pengumpulan berdasarkan kepada pengetahuan pengamal-pengamal perubatan tradisional, rujukan kepada buku-buku perubatan tradisional seperti Pengenalan Dan Penggunaan Herba Ubatan

(Abd. Rahman, 1998) dan Tumbuhan Ubatan Malaysia (Kamarudin & Latiff, 2002) serta rujukan keratan akhbar Mingguan Malaysia.

Kaedah yang biasa digunakan dalam perubatan tradisional adalah penggunaan terus daripada tumbuhan seperti memakan terus, minum rebusan air dan menggosok terus ke tempat yang hendak diubati. Walaubagaimanapun dalam kajian bab ini pengekstrakan dilakukan secara berperingkat dengan menggunakan empat jenis pelarut iaitu PE, KLO, MET dan air suling untuk mengeluarkan bahan-bahan aktif yang ada dalam tumbuhan yang terbabit. Bahan aktif tersebut akan diuji pada *H. pylori* untuk menentukan kebolehnya dalam merencatkan pertumbuhan bakteria tersebut.

Objektif utama di dalam Bab 2 ini adalah menyaring ekstrak tumbuhan yang paling aktif sebagai anti-*H. pylori*. Kaedah asas yang digunakan dalam kajian ini adalah kaedah pembauran cakera. Kaedah ini sering digunakan dalam ujian perencatan pertumbuhan bakteria kerana ianya mudah dan lebih ekonomi (Chaves *et al.*, 1999). Ia akan memberikan keputusan berbentuk diameter perencatan pertumbuhan *H. pylori* oleh suatu ekstrak tumbuhan. Umumnya semakin besar saiz zon yang terbentuk, maka ekstrak tersebut dikatakan berpotensi merencat pertumbuhan *H. pylori* dengan baik. Walaubagaimanapun di dalam bab ini, kandungan sampel ekstrak per cakera terbabit perlu diambil kira. Ini kerana kebolehan ekstrak untuk merencat pertumbuhan *H. pylori* dianggap tidak berkesan walaupun diameter perencatannya besar tetapi memerlukan kandungan sampel per cakera ekstrak yang lebih banyak.

2.2 BAHAN DAN KAEDAH

2.2.1 Pensterilan

Peralatan kaca, tip mikropipet, air suling, forsep dan cakera AA 6mm (Whatmann, UK) disterilkan dengan menggunakan autoklaf (Sakura, Jepun) pada suhu 121°C selama 20 minit. Sementara itu, medium agar dan medium cecair diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit kecuali agar Eugon diautoklaf pada suhu 118° C selama 15 minit. Manakala pensterilan ekstrak-ekstrak tumbuhan pula dijalankan dengan penurasan membran (Whatman, UK), dengan saiz liang 0.2 µm dan berdiameter 25 mm.

2.2.2 Sumber kultur

Kultur *H. pylori* strain 47 yang digunakan di dalam kajian ini merupakan pencilan daripada biopsi antrum pesakit gastritis seorang wanita berbangsa India yang berumur 60 tahun. Wanita tersebut diendoskopkan di Hospital Seberang Jaya, Pulau Pinang pada tahun 1998.

2.2.3 Medium Pengkulturan

Agar Eugon (BBL, Cockeysville MD, USA) yang mengandungi darah manusia pada kepekatan muktamad 10⁰/_{oo} (v/v) (selepas ini dirujuk sebagai agar EBA) digunakan sebagai medium pertumbuhan *H. pylori*. Penyediaan medium adalah mengikut sukatan piawai iaitu 45 g serbuk agar Eugon bagi isipadu 1 liter air. Selepas diautoklaf, EBA dibiarkan sejuk sehingga suhu mencecah 50° C, kemudian darah dipipetkan, dicampurkan sehingga sekata sebelum dituang ke dalam piring petri.

2.2.4 Pengeraman kultur

H. pylori strain 47 merupakan kultur kawalan yang digunakan dalam Makmal 207 Pusat Pengajian Sains Kajihayat. Bakteria *H. pylori* ini merupakan bakteria mikroaerofili dan dieramkan pada suhu 37°C di dalam inkubator yang mengandungi atmosfera 10% CO₂-udara (ShellLab, UK). Pertumbuhan yang nyata dapat dilihat selepas 84 jam. Oleh itu *H. pylori* akan di subkultur untuk setiap 84jam.

2.2.5 Medium Pengawetan

Medium pengawetan yang digunakan ialah medium kaldu Soya Triptikase (BBL, Cockeysville MD, USA) [TSB]. Sebanyak 3 g TSB dalam 100ml air suling yang ditambah 15‰ (v/v) gliserol. Selepas diautoklaf, ianya dibiarkan sejuk kepada suhu bilik sebelum ianya dapat digunakan.

2.2.6 Pengawetan Kultur

Kultur *H. pylori* ini disimpan dalam jangka masa yang panjang dengan menggunakan medium kaldu TSB + 10‰ (v/v) gliserol. TSB (Bab 2.2.5.) dipipet ke atas permukaan agar EBA yang ditumbuhi kultur *H. pylori*. Dengan menggunakan batang kaca berbentuk L, kultur tersebut dituai. Ampaian yang mengandungi sel bakteria ini dipipet ke dalam tiub kriogen (Nalgene, USA) dan dilabel mengikut spesies masing-masing serta tarikh dan disimpan pada suhu – 70°C.

2.2.7 Penyediaan Inokulum

Air suling steril (2 ml) dipipetkan ke atas EBA yang mempunyai kultur *H. pylori* yang telah dieram seperti dijelaskan dalam (Bab 2.2.4). Ia kemudiannya dituai menggunakan batang kaca berbentuk L untuk mendapatkan ampaian kultur. Ampaian kultur itu dimasukkan ke dalam botol Bijou steril dan

kekeruhannya diselaraskan ke tahap piawai MacFarland 5.0 (Biomeriaux, Perancis) sebelum digunakan.

2.2.8 Pemilihan Tumbuhan

Tumbuhan dipilih berdasarkan kepada catatan perubatan tradisional yang berkaitan dengan penyakit ulser, pedih hati, rawatan luka dan sakit perut (Jadual 2.1).

2.2.9 Penyempelan

Tumbuhan yang diperolehi itu dibahagikan kepada bahagian-bahagian tertentu seperti batang, daun, ubi dan akar atau keseluruhan tumbuhan tersebut. Setiap bahagian dan setiap pelarut dikenali sebagai satu sampel (Jadual 2.1). Sampel-sampel yang telah dibersihkan di keringkan selama 6 hingga kepada 12 jam di dalam ketuhar pengering (Mommert, Jerman) yang bersuhu 60°C. Ia kemudiannya dipotong halus dan dikisar dengan mesin pengisar (Moulinex, Perancis).

2.2.10 Pengekstrakan Tumbuhan

Sohklet digunakan dalam pengekstrakan bahan aktif daripada bahagian tumbuhan. Pengekstrakan dilakukan secara berperingkat iaitu dimulai dengan pelarut PE (40° C – 60° C), diikuti KLO, seterusnya MET dan akhirnya EA. Setiap sampel (10 g) dimasukkan ke dalam telaga yang kemudiannya dimasukkan ke dalam sohklet. Sebanyak 200 ml pelarut dimasukkan ke dalam kelalang. Prinsip sohklet berdasarkan proses kondensasi daripada pemeruapan pelarut tersebut. Proses pengekstrakan dijalankan sekurang-kurangnya 6 hingga 8 jam atau sehingga semua warna pelarut dalam sohklet kelihatan jernih, ia kemudian dipisahkan dengan alat penyejat (Ika-Werke, Jerman), dan dikeringkan dalam ketuhar pengering.

Jadual 2.1 : Tumbuh-tumbuhan dan bahagian-bahagian serta pelarut yang digunakan dalam pengekstrakan.

BIL	NAMA TEMPATAN	NAMA SAINTIFIK	AMALAN KEGUNAAN	BAHAGIAN: PELARUT DIGUNAKAN [NO SAMPEL]
1.	Dukung Anak **	<i>Phyllanthus niruri</i>	Rawatan Luka	Keseluruhan: PE, KLO, MET, H ₂ O [S1,S2,S3 S4]
2.	Kacip Fatimah **	<i>Labisia pumila</i>	Rawatan Luka	Akar: MET, H ₂ O [S5,S6]
3.	Ayam Emas *	<i>Demos cochinchinensis</i>	Rawatan Luka	Daun: MET, H ₂ O [S7,S8]
4.	Semalu **	<i>Mimosa pudica</i>	Rawatan Luka	Keseluruhan: PE, KLO, MET, H ₂ O [S9,S10,S11,S12]
5.	Jambu Batu *	<i>Psidium guajava</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S13,S14,S15,S16]
6.	Keman Air #	<i>Neptunia oleraceae</i>	Sakit Perut	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S17,S18,S19,S20]
7.	Geti #	<i>Sesbania grandiflora</i>	Sakit Perut	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S21,S22,S23,S24]
8.	Jarak Bunting *	<i>Jatropha podagrica</i>	Penyakit Ulser	Akar: PE, KLO, MET, H ₂ O [S25,S26,S27,S28], Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O ₂ O [S29,S30,S31,S32], Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S33,S34,S35,S36]
9.	Misai Kucing **	<i>Orthosiphon stamineus</i>	Sakit Perut	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S37,S38,S39,S40], Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S41,S42,S43,S44]
10.	Pegaga *	<i>Centella asiatica</i>	Pedih hati	Keseluruhan: PE, KLO, MET, H ₂ O [S45,S46,S47,S48]
11.	Paku Rawan *	<i>Limnocharis flava</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S49,S50,S51,S52]
12.	Jarum Tujuh Bilah*	<i>Pereskia saecnarosa</i>	Anti barah	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S53,S54,S55,S56]
13.	Terung Pipet *	<i>Solanum torvum</i>	Rawatan Luka	Biji: PE, KLO, MET, H ₂ O [S57,S58,S59,S60]
14.	Peria Pantai *	<i>Colubrina asiatica</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S61,S62,S63,S64]
15.	Halia **	<i>Zingiber officinal</i>	Sakit Perut	Ubi : PE, KLO, MET, H ₂ O [S65,S66,S67,S68]
16.	Pokok Kekacang*	<i>Mitrasaeme alsinoides</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S69,S70,S71,S72]

Kekunci:

* = Daripada **Pengamal Perubatan Tradisional**

** = Daripada buku **Pengenalan Dan Penggunaan Herba Ubatan** oleh Abd. Rahman Md. Derus (1998).

= Daripada buku **Tumbuhan Ubatan Malaysia** oleh Kamarudin Mat Salleh (2002).

sambungan Jadual 2.1

BIL	NAMA TEMPATAN	NAMA SAINTIFIK	AMALAN KEGUNAAN	BAHAGIAN: PELARUT DIGUNAKAN [NO SAMPEL]
17.	Lengkuas**	<i>Languas(Alpinia) galanga</i>	Sakit Perut	Ubi: PE, KLO, MET, H ₂ O [S73,S74,S75,S76]
18.	Pokok Samseng *	<i>Derris trifoliata</i>	Penyakit Ulser	Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S77,S78,S79,S80]
19.	Beluntas *	<i>Pluchea indica</i>	Penyakit Ulser	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S81,S82,S83,S84]
20.	Senduduk Biru #	<i>Melastoma malabathricum</i> (var-blue)	Rawatan Luka & Sakit Perut	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S85,S86,S87,S88], Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S89,S90,S91,S92]
21.	Bunga Raya Putih*	<i>Hibiscus rosa sinensis</i> (var-white)	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S93,S94,S95,S96], Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S97,S98,S99,S100]
22.	Pokok Kapal Terbang *	<i>Chomolaena odorata</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S101,S102,S103,S104]
23.	Pertawali #	<i>Tinospora ordifolia</i>	Anti Bakteria	Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S105,S106,S107,S108]
24.	Lembiaga *	<i>Calotropis gigantea</i>	Sakit Perut	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S109,S110,S111,S112]
25.	Ulamraja *	<i>Cosmos caudatus</i>	Pedih hati	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S113,S114,S115,S116]
26.	Kesum **	<i>Polygonum minus</i>	Sakit Perut	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S117,S118,S119,S120]
27.	Petai #	<i>Parkia speciosa</i>	Sakit Perut	Biji: PE, KLO, MET, H ₂ O [S121,S122,S123,S124]
28.	Serai **	<i>Cymbopogon citratus</i>	Sakit Perut	Batang: PE, KLO, MET, H ₂ O [S125,S126,S127,S128]
29.	Cekur **	<i>Kaemferia galanga</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S129,S130,S131,S132], Ubi: PE, KLO, MET, H ₂ O [S133,S134,S135,S136]
30.	Sirih #	<i>Piper betle</i>	Penyakit Ulser	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S137,S138,S139,S140]
31.	Bunga Kantan *	<i>Phaeomeria imperialis</i>	Pedih hati	Bunga: PE, KLO, MET, H ₂ O [S141,S142,S143,S144]
32.	Emas Cotek *	<i>Ficus deltoides</i>	Rawatan Luka	Daun: PE, KLO, MET, H ₂ O [S145,S146,S147,S148]

Kekunci:

* = Daripada **Pengamal Perubatan Tradisional**

** = Daripada buku **Pengenalan Dan Penggunaan Herba Ubatan** oleh Abd. Rahman Md. Derus (1998).

= Daripada buku **Tumbuhan Ubatan Malaysia** oleh Kamarudin Mat Salleh (2002).

Berat kering ekstrak dicatat dan kemudian pelarut dimetilsulfooksida (DMSO) digunakan untuk melarutkan ekstrak yang dikeringkan tadi. Ekstrak yang siap dilarut dengan DMSO dan disteril dengan penuras membran disimpan di dalam peti ais untuk digunakan dalam ujikaji seterusnya. Setiap sampel ekstrak terdiri daripada bahagian-bahagian pokok yang berbeza yang diekstrak dengan empat pelarut yang berlainan. Dalam kajian ini sebanyak 32 spesies terlibat dengan 148 sampel ekstrak yang telah diuji (Jadual 2.1)

2.2.11 Penentuan Kadar Perencatan Dengan Kaedah Pembauran Cakera.

2.2.11.1 Penyediaan cakera yang mengandungi ekstrak tumbuhan.

Empat puluh mikroliter (20 μ l X 2) ekstrak sampel yang steril dititiskan ke atas cakera AA 6 mm (Whatman, UK). Ekstrak dibiarkan kering selama 5 minit sebelum dititiskan sekali lagi dan kemudiannya dibiarkan kering.

2.2.11.2 Ujian kepekaan *H. pylori* terhadap ekstrak tumbuhan

Putik kapas steril dicelup ke dalam inokulum *H. pylori* (Bab 2.2.7), seterusnya dicoretkan pada permukaan plat EBA. Sebaran inokulum dilakukan sebanyak tiga kali dengan cara memusingkan plat sebanyak 60⁰C. Penempatan cakera kering yang mengandungi ekstrak (Bab 2.2.11.1) dilakukan menggunakan forsep steril mengikut kawasan dilabel. Plat dibahagi kepada 6 bahagian, termasuk 2 cakera yang dititiskan dengan air suling dan DMSO yang bertindak sebagai kawalan.

2.2.11.3 Pemerhatian perencatan pertumbuhan *H. pylori*

Selepas 84 jam kultur dieram, zon cerah yang terbentuk di sekeliling cakera diperhatikan. Diameter zon dicatat dalam unit millimeter (mm) dengan bacaan diambil sebanyak tiga kali dengan cara memusingkan plat sebanyak 60⁰C.

2.3 KEPUTUSAN

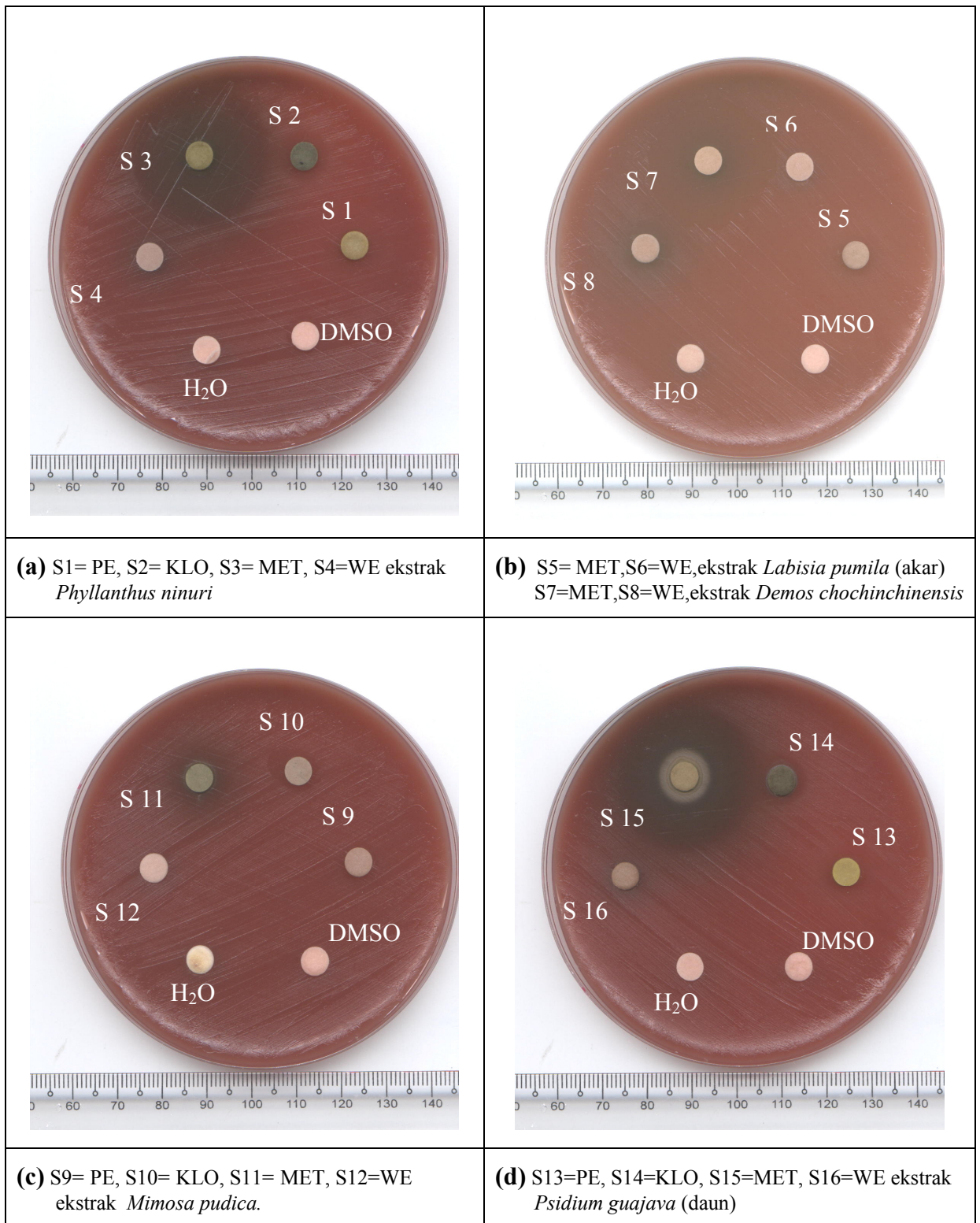
Di dalam proses ini tahap kandungan ekstrak adalah tidak sama. Ini disebabkan oleh hasil yang diperolehi daripada pengekstrakan tidak memberikan berat yang sama. Oleh itu, satu nilai kepekatan yang tetap tidak dapat ditentukan, maka nilai nisbah diambil untuk membuat penilaian bagi kajian ini. Nilai nisbah ini adalah terdiri daripada diameter perencatan dibahagi jumlah berat ekstrak yang terkandung dalam sekeping cakera. Pengiraan untuk kandungan bahan aktif dalam sekeping cakera adalah berdasarkan kepada kepekatan ekstrak ($\text{mg}/\mu\text{l}$) dan didarabkan dengan $40 \mu\text{l}$, oleh kerana $40 \mu\text{l}$ adalah tahap maksimum yang boleh dititiskan pada sekeping cakera.

Daripada Jadual 2.2 dan Plat 2.1(a-h) didapati lima sampel ekstrak menghasilkan purata diameter perencatan yang melebihi 30 mm iaitu ekstrak PE akar tumbuhan *J. podagrica* S25 memberikan nilai $47.33 \pm 3.01\text{mm}$, ekstrak KLO S26 memberikan nilai $42.00 \pm 3.01\text{mm}$ dan ekstrak MET S27 memberikan nilai $34.00 \pm 2.53\text{mm}$. Selain itu ekstrak MET daun tumbuhan *P. guajava* S15 memberikan purata diameter perencatan bernilai $33.00 \pm 2.28\text{mm}$ dan ekstrak MET daun tumbuhan *D. cochinchinensis* S7 $30.00 \pm 2.10\text{mm}$. Tetapi mengikut nisbah purata perencatan per μg ekstrak terlibat, ekstrak PE *J. podagrica* S25 menghasilkan nisbah 10.38, ekstrak KLO S26 (27.63), ekstrak MET S27 (2.24), ekstrak MET *P. guajava* S15 (1.25) dan ekstrak MET S7 *D. cochinchinensis* (1.39). Nilai nisbah yang diperolehi oleh kelima-lima ekstrak ini adalah rendah berbanding dengan nilai purata diameter perencatan. Salah satunya, disebabkan oleh kandungan berat ekstrak yang ada di dalam cakera adalah tinggi diperlukan bagi menghasilkan diameter perencatan yang lebih besar.

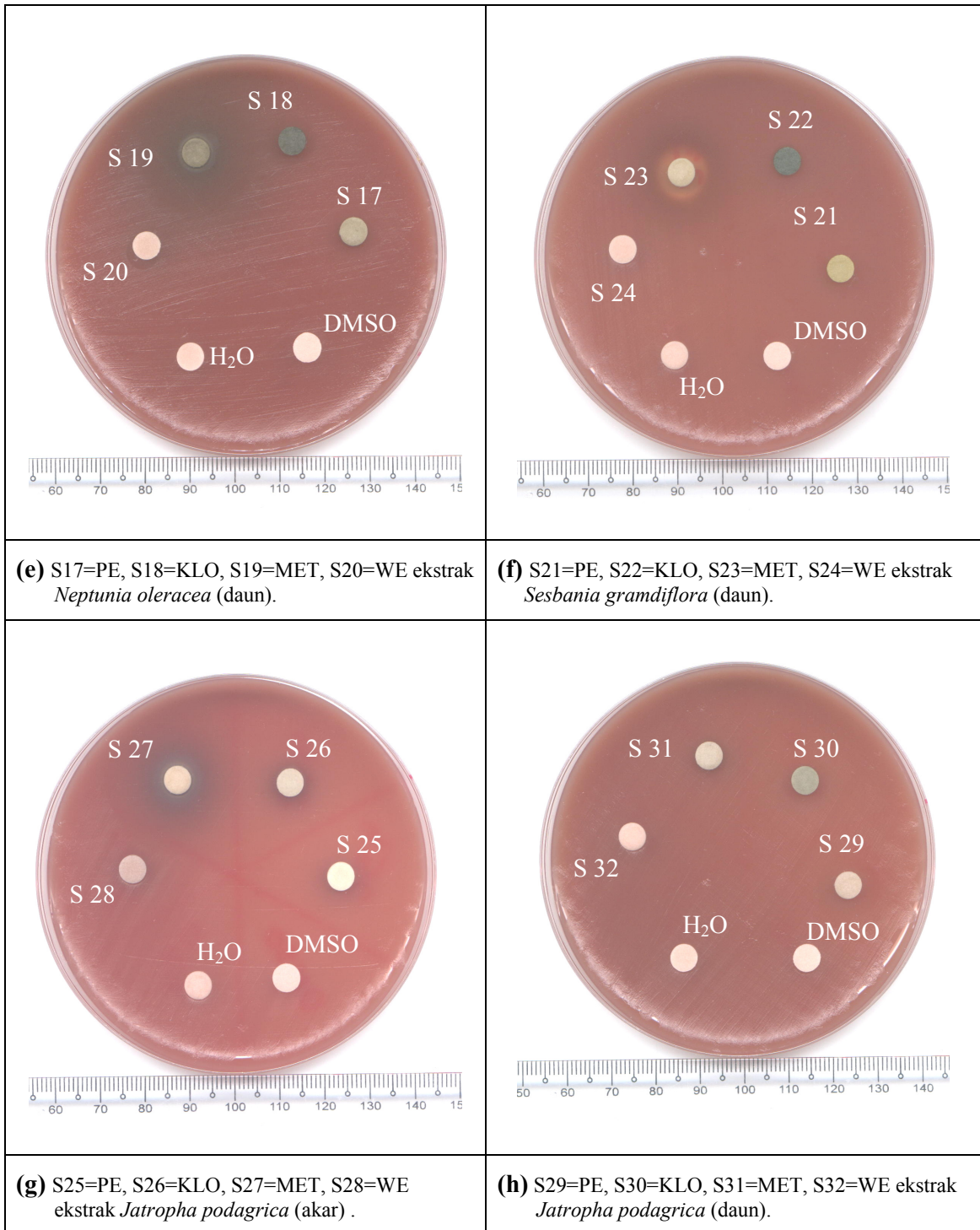
Jadual 2.2 : Purata perencatan pertumbuhan *H. pylori* dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S1 - S32

Spesies tumbuhan yang digunakan	Bahagian tumbuhan	Sampel	Jenis pelarut	Berat ekstrak per cakera (mg)	Purata diameter perencatan + sisihan piawai sebenar (mm)	Nilai nisbah
<i>Phyllanthus niruri</i>	Keseluruhan	S1	PE	1.76	14.00 ± 1.55	7.95
		S2	KLO	0.88	9.83 ± 0.75	11.17
		S3	MET	8.32	29.67 ± 1.37	3.57
		S4	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Labisia pumila</i>	Akar	S5	MET	2.16	8.00 ± 0.50	3.70
		S6	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Demos cochinchinensis</i>	Daun	S7	MET	21.60	30.00 ± 2.10	1.39
		S8	H ₂ O	2.80	10.00 ± 0.63	3.57
<i>Mimosa pudica</i>	Keseluruhan	S9	PE	0.32	8.50 ± 0.55	26.56
		S10	KLO	21.60	8.83 ± 1.60	0.41
		S11	MET	5.12	14.17 ± 1.94	2.77
		S12	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Psidium guajava</i>	Daun	S13	PE	1.68	8.50 ± 0.84	5.06
		S14	KLO	2.80	10.00 ± 0.63	3.57
		S15	MET	26.48	33.00 ± 2.28	1.25
		S16	H ₂ O	2.80	7.00 ± 0.50	2.50
<i>Neptunia oleraceae</i>	Daun	S17	PE	1.28	10.50 ± 0.84	8.20
		S18	KLO	7.36	10.67 ± 1.97	1.45
		S19	MET	26.48	28.33 ± 4.13	1.07
		S20	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Sesbania grandiflora</i>	Daun	S21	PE	4.56	10.83 ± 0.98	2.38
		S22	KLO	2.24	8.83 ± 1.33	3.94
		S23	MET	49.44	17.33 ± 1.63	0.35
		S24	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Jatropha podagrica</i>	Akar	S25	PE	4.56	47.33 ± 3.01	10.38
		S26	KLO	1.52	42.00 ± 0.50	27.63
		S27	MET	15.2	34.00 ± 2.53	2.24
		S28	H ₂ O	2.80	TZ	
	Daun	S29	PE	0.24	13.00 ± 1.10	54.17
		S30	KLO	0.16	10.00 ± 0.50	62.50
		S31	MET	1.28	8.00 ± 0.50	6.25
		S32	H ₂ O	2.80	TZ	

Nota: TZ = Tiada zon

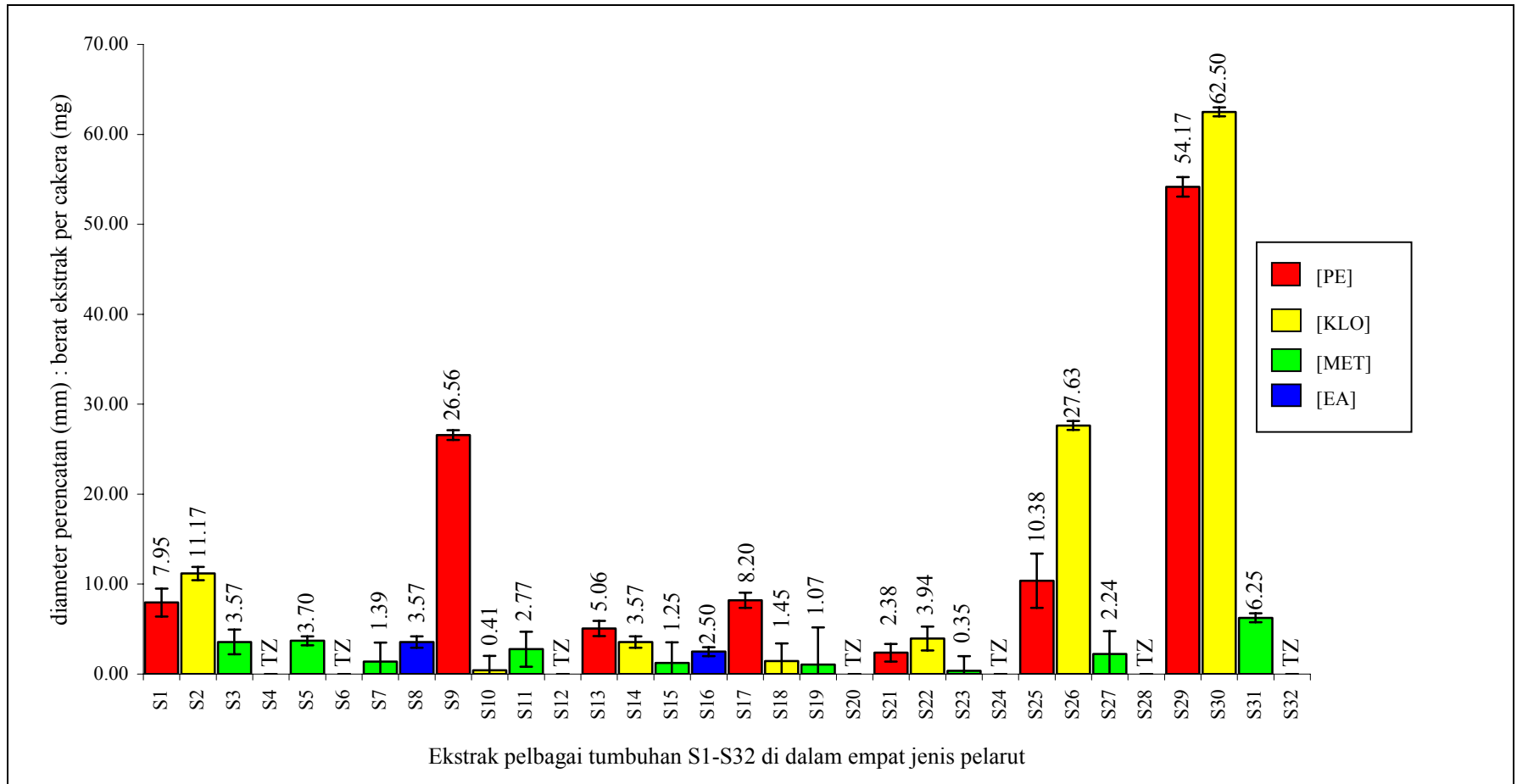


Plat 2.1: Perencatan pertumbuhan *H.pylori* pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S1-S32.



Plat 2.1: sambungan

Oleh itu pada rajah 2.1, dua sampel daripada daun tumbuhan spesies *J. podagrica* memberikan nilai nisbah ekstrak KLO S30 (62.50) dan ekstrak PE S29 (54.17). Kedua-dua sampel ini hanya memberikan purata diameter perencatan yang kecil iaitu sekitar 10 ± 0.05 mm dan 13 ± 1.10 mm sahaja. Walaubagaimanapun berat ekstrak per cakera adalah kecil iaitu sekitar 0.24 mg/cakera dan 0.16 mg/cakera sahaja (Jadual 2.2) menjadikan nilai nisbahnya adalah tinggi. Akan tetapi pada sampel S26 nilai purata diameter perencatan yang besar sekitar 42.00 ± 0.05 mm dan nilai nisbah juga besar 27.63. Ini disebabkan oleh nilai kandungan ekstrak yang terlibat adalah kecil iaitu 1.52 mg/cakera sahaja. Begitu juga halnya dengan sampel S9 dimana nilai nisbah adalah tinggi melebihi 20 walaupun diameter purata perencatan yang diberikan olehnya kurang daripada 10 mm sahaja. Nilai kandungan ekstrak yang digunakan pada S9 adalah 0.32 mg/cakera sahaja.



Rajah 2.1: Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S1-S4 = *Phyllanthus niruri*, S5-S6 = (akar) *Labisia pumila*, S7-S8 = (daun) *Demos cochinchinensis*, S9-S12 = *Mimosa pudica*, S13-S16 = (daun) *Psidium guajava*, S17-S20 = (daun) *Neptunia oleraceae*, S21-S24 = (daun) *Sesbania grandiflora*, S25-S28 = (akar) *Jatropha podagrica*, S29-S32 = (daun) *Jatropha podagrica*

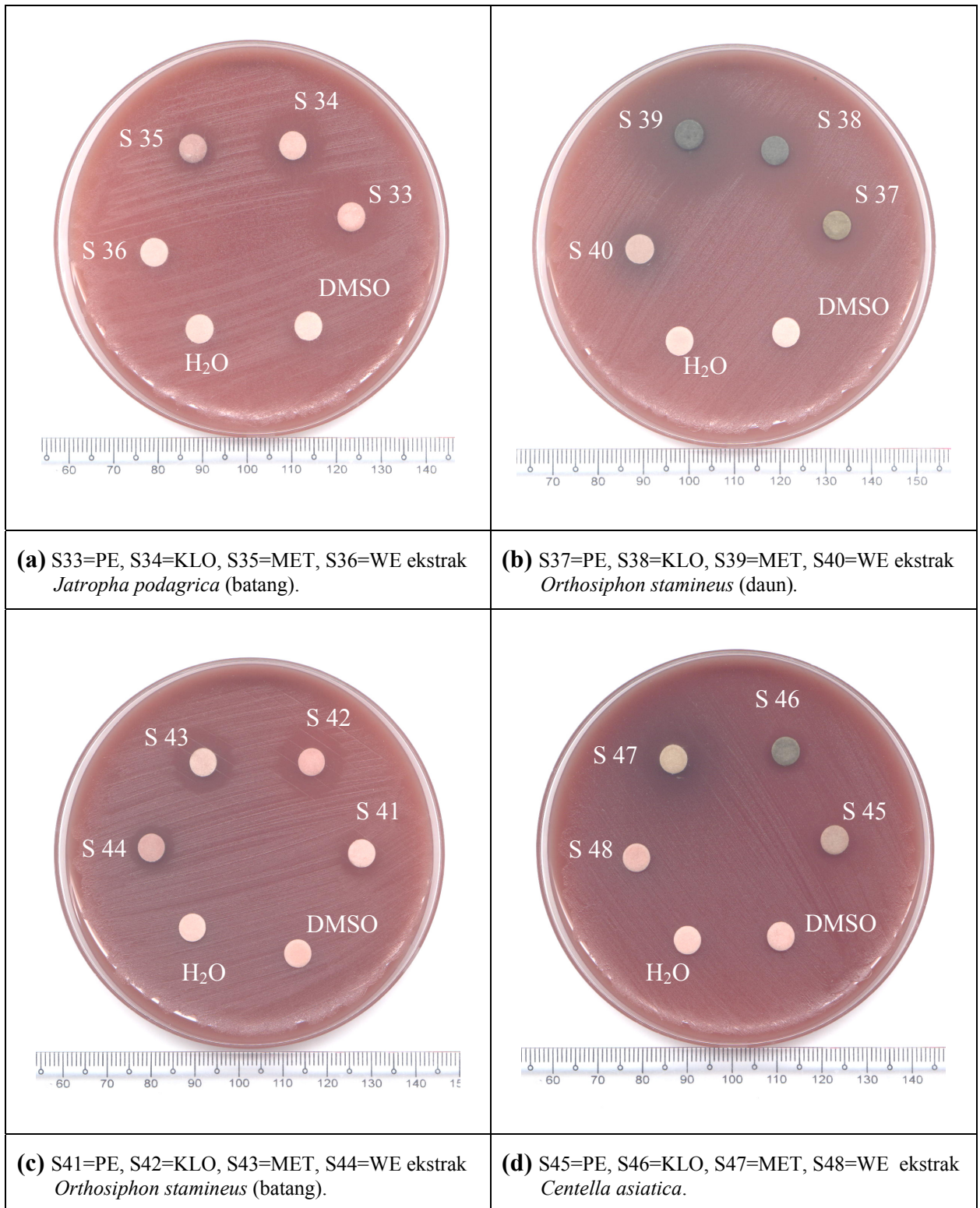
Dua sampel sahaja yang menghasilkan nilai purata diameter perencatan melebihi 20 mm iaitu ekstrak MET daun tumbuhan *O. stamineus* S39 memberikan nilai 22.00 ± 2.37 mm dan ekstrak PE daun *L. flava* S49 memberikan nilai 24.00 ± 0.63 mm [Jadual 2.3 dan Plat 2.2(a-h)]. Walaubagaimanapun nilai nisbah kedua-dua sampel ini adalah amat rendah sekali iaitu S39 (4.37) dan S49 (5.45). Berat ekstrak per cakera yang diperlukan adalah tinggi iaitu S39 (5.04 mg/cakera) dan S49 (4.40 mg/cakera) menjadikan nisbah itu kecil, walaupun kadar secara mutlak diameter perencatan itu agak besar.

Rajah 2.2 dan Jadual 2.3, menunjukkan nilai nisbah sampel ekstrak PE batang tumbuhan *O. stamineus* S41 (79.17) dan ekstrak PE daun *P. saecnarosa* S53 (83.33). Kedua-dua sampel ini hanya memberikan purata diameter perencatan yang kecil iaitu 12.67 ± 0.52 mm dan 13.33 ± 0.52 mm sahaja. Nilai nisbah yang tinggi adalah disebabkan oleh nilai berat ekstrak per cakera yang kecil iaitu sekitar 0.16 mg/cakera untuk kedua-dua sampel.

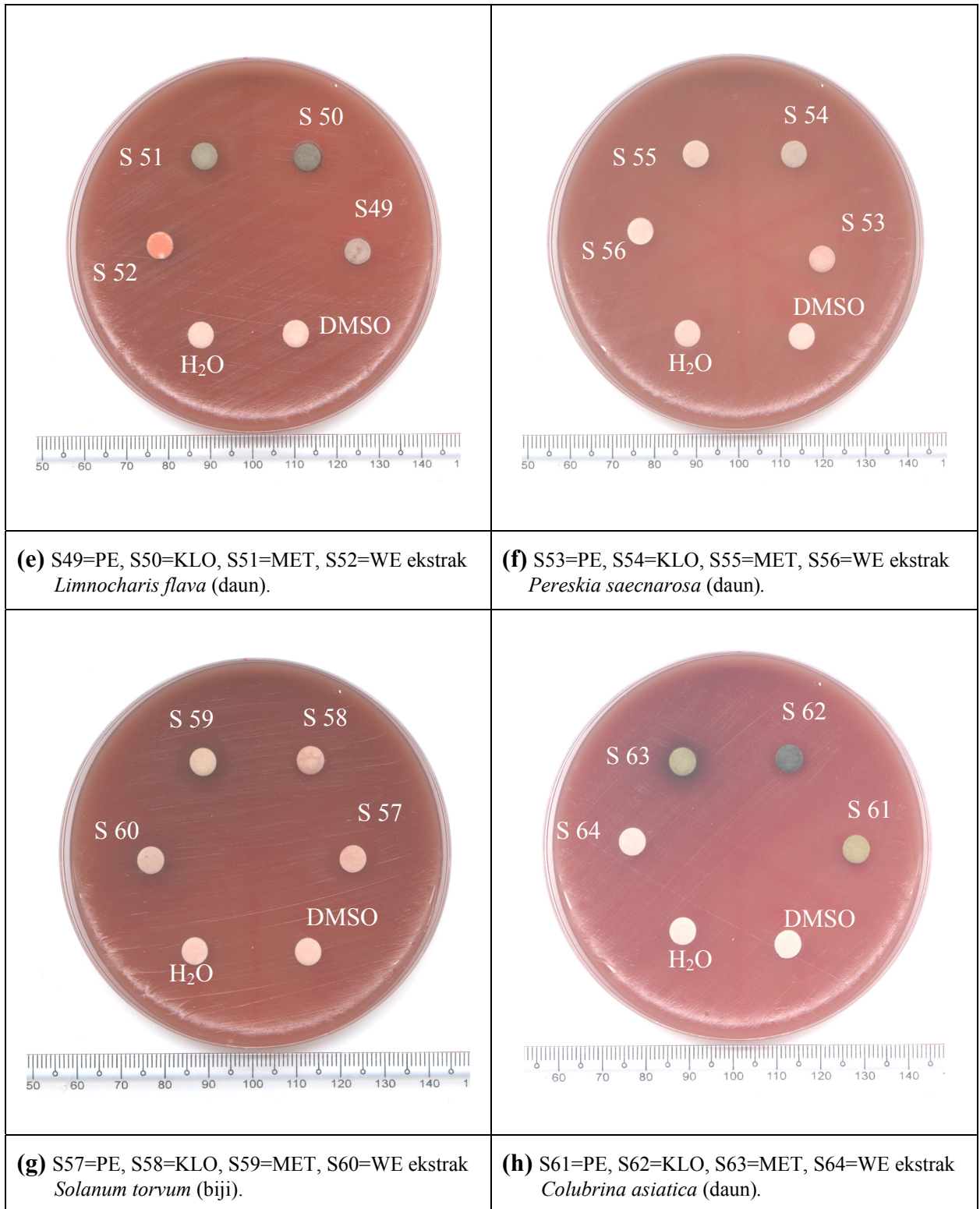
Jadual 2.3 : Purata perencatan pertumbuhan *H. pylori* dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S33 - S64

Spesies tumbuhan yang digunakan	Bahagian tumbuhan	Sampel	Jenis pelarut	Berat ekstrak per cakera (mg)	Purata diameter perencatan + sisihan piawai sebenar (mm)	Nilai nisbah
<i>Jatropha podagrica</i>	Batang	S33	PE	0.40	15.50 ± 1.38	38.75
		S34	KLO	0.56	14.00 ± 0.89	25.00
		S35	MET	11.44	9.17 ± 0.75	0.80
		S36	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Orthosiphon stamineus</i>	Daun	S37	PE	2.08	17.67 ± 2.80	8.49
		S38	KLO	1.60	18.33 ± 2.16	11.46
		S39	MET	5.04	22.00 ± 2.37	4.37
		S40	H ₂ O	2.80	9.00 ± 1.26	3.21
	Batang	S41	PE	0.16	12.67 ± 0.52	79.17
		S42	KLO	0.24	11.33 ± 1.03	47.22
		S43	MET	3.84	16.00 ± 0.89	4.17
		S44	H ₂ O	2.80	8.00 ± 0.05	2.86
<i>Centella asiatica</i>	Keseluruhan	S45	PE	1.20	8.50 ± 0.55	7.08
		S46	KLO	0.56	8.17 ± 0.41	14.58
		S47	MET	14.96	13.00 ± 0.89	0.87
		S48	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Limnocharis flava</i>	Daun	S49	PE	4.40	24.00 ± 0.63	5.45
		S50	KLO	6.48	14.00 ± 0.63	2.16
		S51	MET	22.08	11.00 ± 1.10	0.50
		S52	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Pereskia saecnarosa</i>	Daun	S53	PE	0.16	13.33 ± 0.52	83.33
		S54	KLO	0.56	TZ	
		S55	MET	7.36	TZ	
		S56	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Solanum torvum</i>	Biji	S57	PE	0.64	11.00 ± 0.89	17.19
		S58	KLO	0.48	8.67 ± 0.82	18.06
		S59	MET	5.68	12.33 ± 0.82	2.17
		S60	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Colubrina asiatica</i>	Daun	S61	PE	29.52	11.00 ± 0.89	0.37
		S62	KLO	1.20	10.00 ± 0.89	8.33
		S63	MET	22.48	16.33 ± 2.07	0.73
		S64	H ₂ O	2.80	TZ	

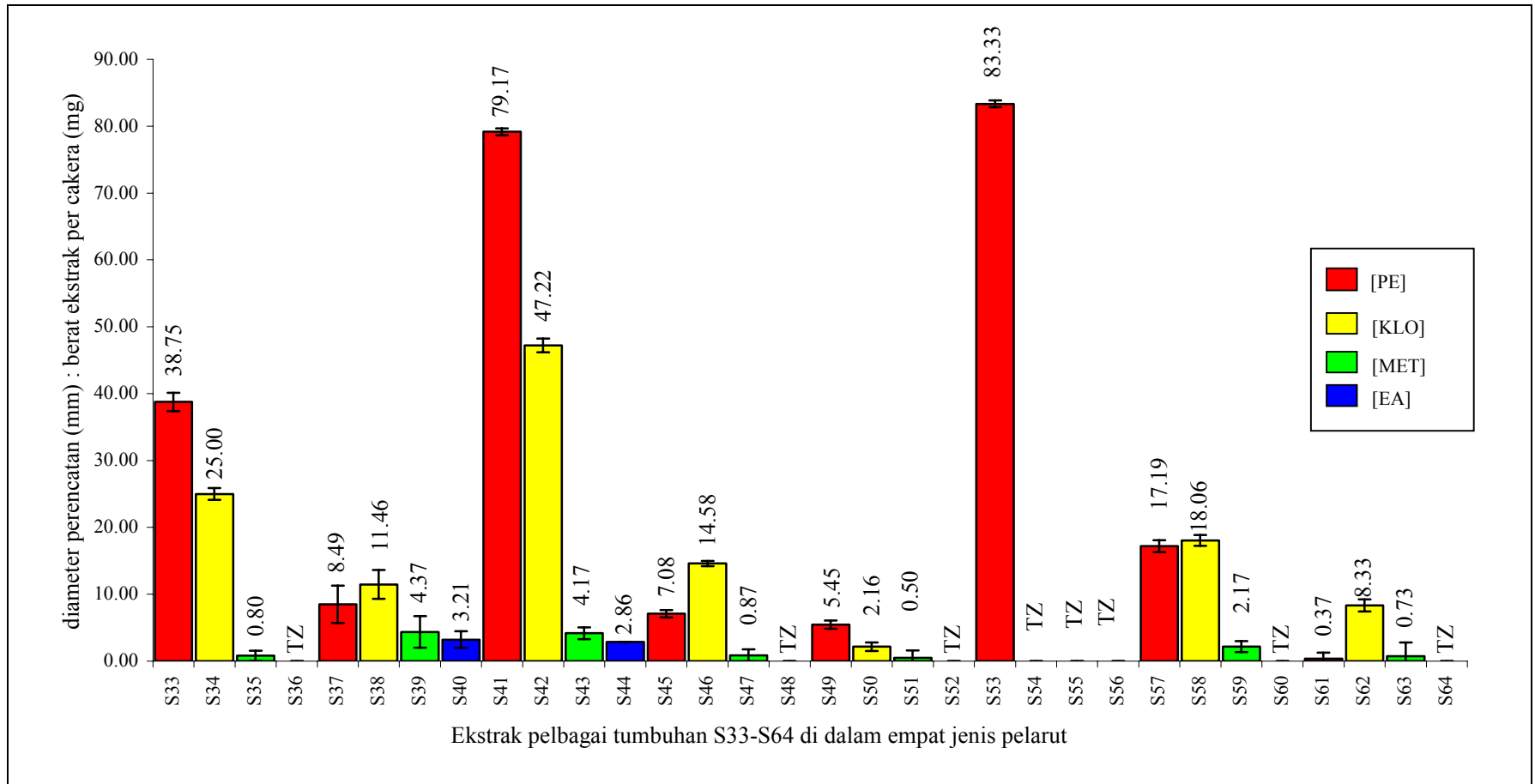
Nota: TZ = Tiada zon



Plat 2.2 : Perencatan pertumbuhan *H.pylori* pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S33-S64.



Plat 2.2 : sambungan



Rajah 2.2: Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S33-S36 = (batang) *Jatropha podagrica*, S37-S40 = (daun) *Orthosiphon stamineus*, S41-S44 = (batang) *Orthosiphon stamineus*, S45-S48 = *Centella asiatica*, S49-S52 = (daun) *Limnocharis flava*, S53-S56 = (daun) *Pereskia saecnarosa*, S57-S60 = (biji) *Solanum torvum*, S61-S64 = (daun) *Colubrina asiatica*.

Pada peringkat seterusnya, nilai nisbah yang tertinggi diperolehi melalui ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* S78 dengan nilai 117.50, diikuti ekstrak PE tumbuhan *D. trifoliata* S77 (87.50) [Rajah 2.3]. Jadual 2.4 dan Plat 2.3 (a-h) menunjukkan purata diameter perencatan yang diberikan oleh kedua-dua sampel ini adalah 42 ± 0.89 mm dan 47 ± 1.67 mm, merupakan kalangan yang agak besar iaitu melebihi 30 mm. Kebolehan S78 dan S77 ini memberikan nilai nisbah yang tertinggi dan purata diameter perencatan yang besar disebabkan oleh nilai berat ekstrak per cakera yang digunakan adalah kecil iaitu sekitar 0.48 mg/cakera untuk S77 dan 0.40 mg/cakera untuk S78.

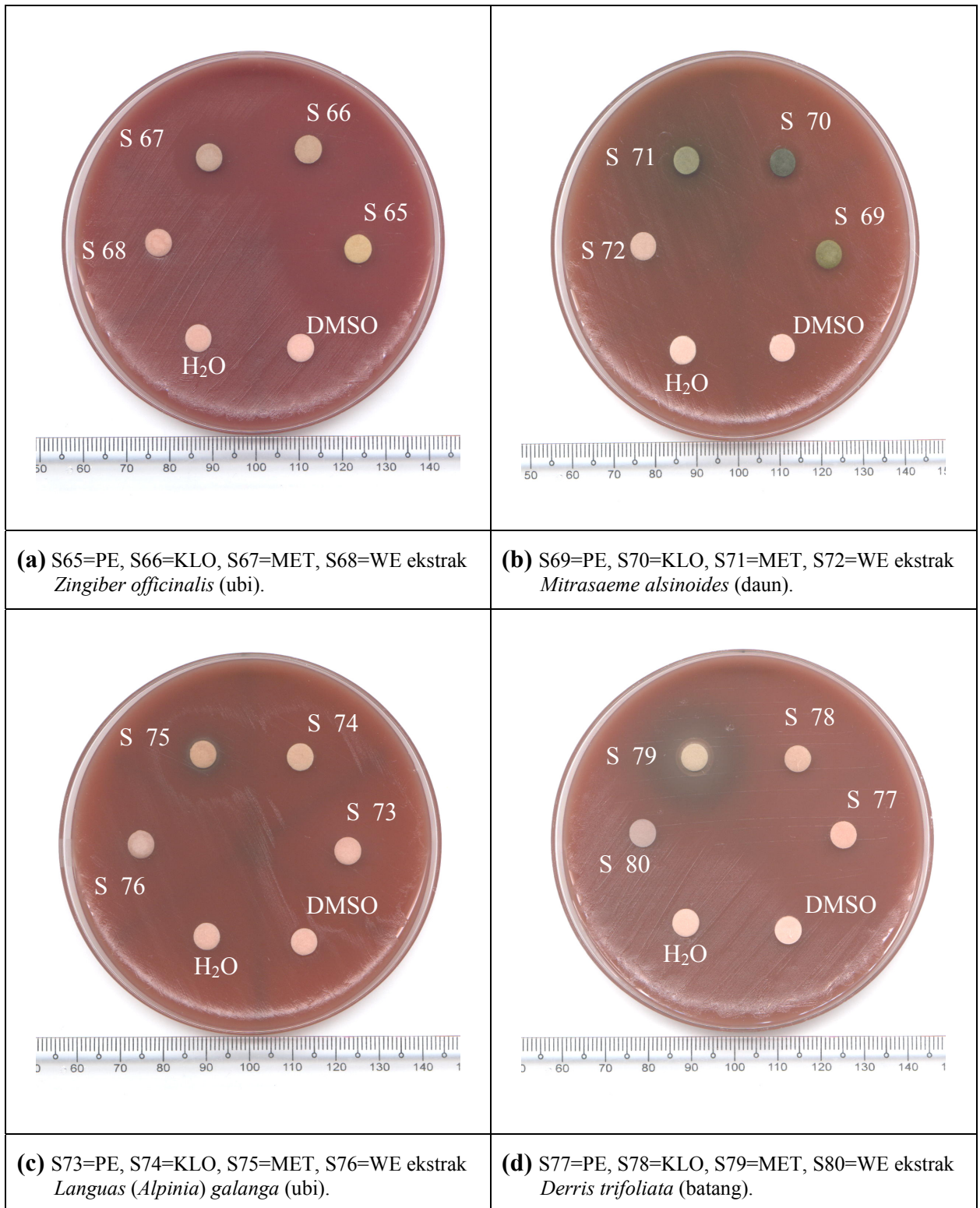
Enam ekstrak yang mempunyai purata diameter perencatan yang melebihi 30 mm iaitu ekstrak PE tumbuhan *Z. officinal* S65 (33.33 ± 1.63 mm), ekstrak KLO tumbuhan *Z. officinal* S66 (41.5 ± 6.98 mm), ekstrak PE tumbuhan *L. galanga* S73 (39.33 ± 2.07 mm), ekstrak MET tumbuhan *D. trifoliata* S79 (47.00 ± 0.89 mm) dan termasuklah S77 dan S78. Oleh kerana nilai berat ekstrak per cakera yang terlibat adalah tinggi iaitu S65 (3.28 mg/cakera), S66 (5.76 mg/cakera), S73 (2.80 mg/cakera) dan S79 (9.44 mg/cakera) menjadikan nilai nisbah keempat-empat ekstrak tersebut memberikan nilai nisbah yang kurang daripada 15 dimana S65 (10.16), S66 (7.20), S73 (14.05) dan S79 (4.98).

Terdapat satu lagi ekstrak yang memberikan nilai nisbah yang besar iaitu 46.53. Ekstrak tersebut adalah ekstrak KLO daun tumbuhan *Hibiscus rosa sinensis* (var-white) S94. Walaupun nilai diameter perencatan yang kecil iaitu sekitar 11.17 ± 1.17 mm, tetapi nilai berat ekstrak per cakera yang digunakan adalah kecil iaitu 0.24 mg/cakera sahaja.

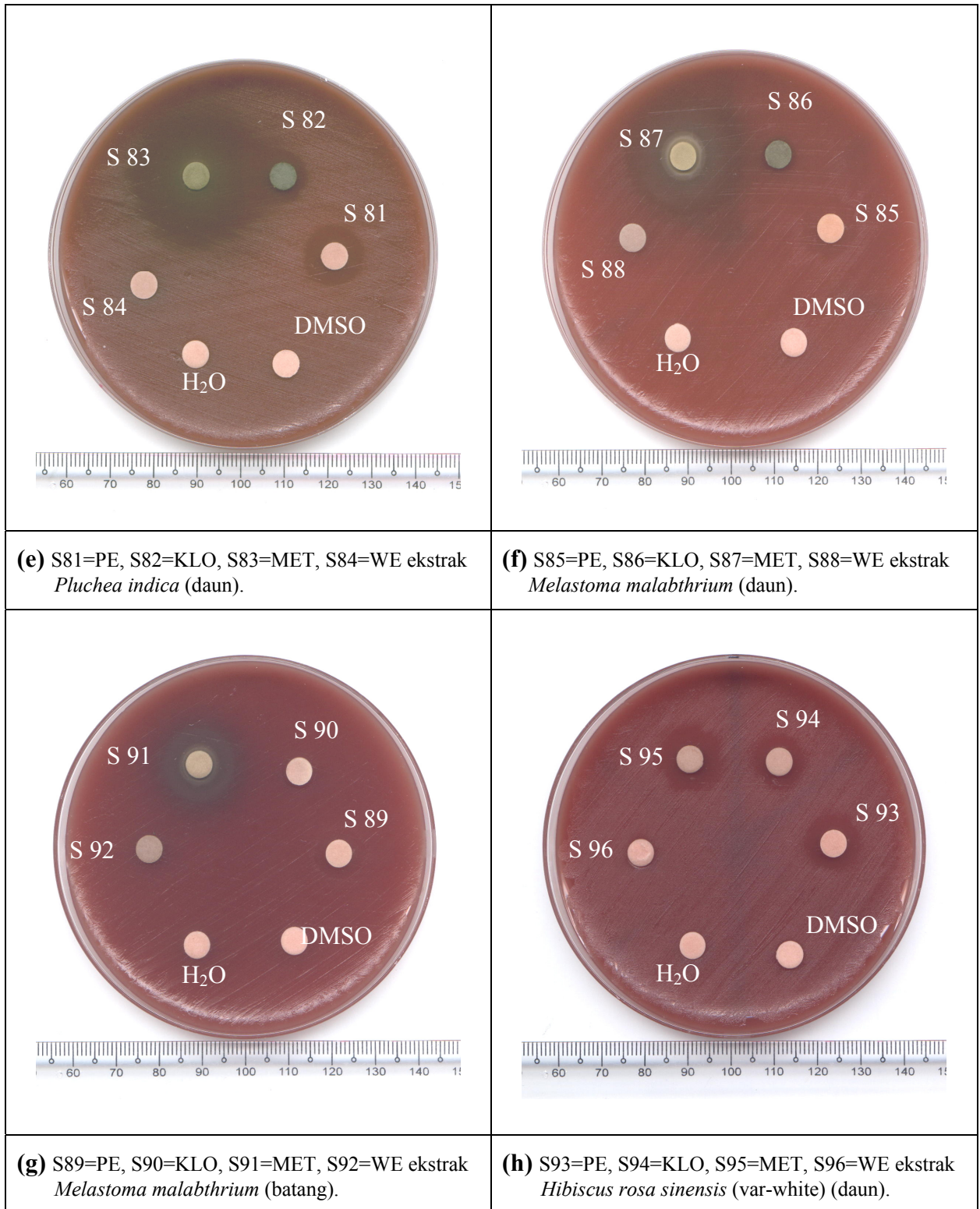
Jadual 2.4 : Purata perencatan pertumbuhan *H. pylori* dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S65 - S96

Spesies tumbuhan yang digunakan	Bahagian tumbuhan	Sampel	Jenis pelarut	Berat ekstrak per cakera (mg)	Purata diameter perencatan + sisihan piawai sebenar (mm)	Nilai nisbah
<i>Zingiber officinalis</i>	Ubi	S65	PE	3.28	33.33 \pm 1.63	10.16
		S66	KLO	5.76	41.50 \pm 6.98	7.20
		S67	MET	10.16	19.67 \pm 1.51	1.94
		S68	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Mitrasaeme alsinoides</i>	Daun	S69	PE	4.96	11.00 \pm 0.63	2.22
		S70	KLO	1.76	9.50 \pm 1.05	5.40
		S71	MET	12.88	13.33 \pm 2.25	1.04
		S72	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Languas galanga</i>	Ubi	S73	PE	2.80	39.33 \pm 2.07	14.05
		S74	KLO	1.28	24.17 \pm 1.60	18.88
		S75	MET	9.24	21.50 \pm 1.87	2.33
		S76	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Derris trifoliata</i>	Batang	S77	PE	0.48	42.00 \pm 0.89	87.50
		S78	KLO	0.40	47.00 \pm 1.67	117.50
		S79	MET	9.44	47.00 \pm 0.89	4.98
		S80	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Pluchea indica</i>	Daun	S81	PE	2.32	13.67 \pm 1.86	5.89
		S82	KLO	1.60	11.00 \pm 0.63	6.87
		S83	MET	1.68	23.00 \pm 1.26	13.69
		S84	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Melastoma malabathricum</i> (var-blue)	Daun	S85	PE	2.24	14.00 \pm 2.28	6.25
		S86	KLO	4.88	22.17 \pm 1.33	4.54
		S87	MET	12.80	25.67 \pm 0.82	2.01
		S88	H ₂ O	2.80	TZ	
	Batang	S89	PE	0.64	10.50 \pm 0.84	16.41
		S90	KLO	0.24	7.17 \pm 0.41	29.86
		S91	MET	11.52	18.00 \pm 0.63	1.56
		S92	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Hibiscus rosa sinensis</i> (var-white)	Daun	S93	PE	0.48	11.50 \pm 1.05	23.96
		S94	KLO	0.24	11.17 \pm 1.17	46.53
		S95	MET	6.88	14.33 \pm 1.03	2.08
		S96	H ₂ O	2.80	TZ	

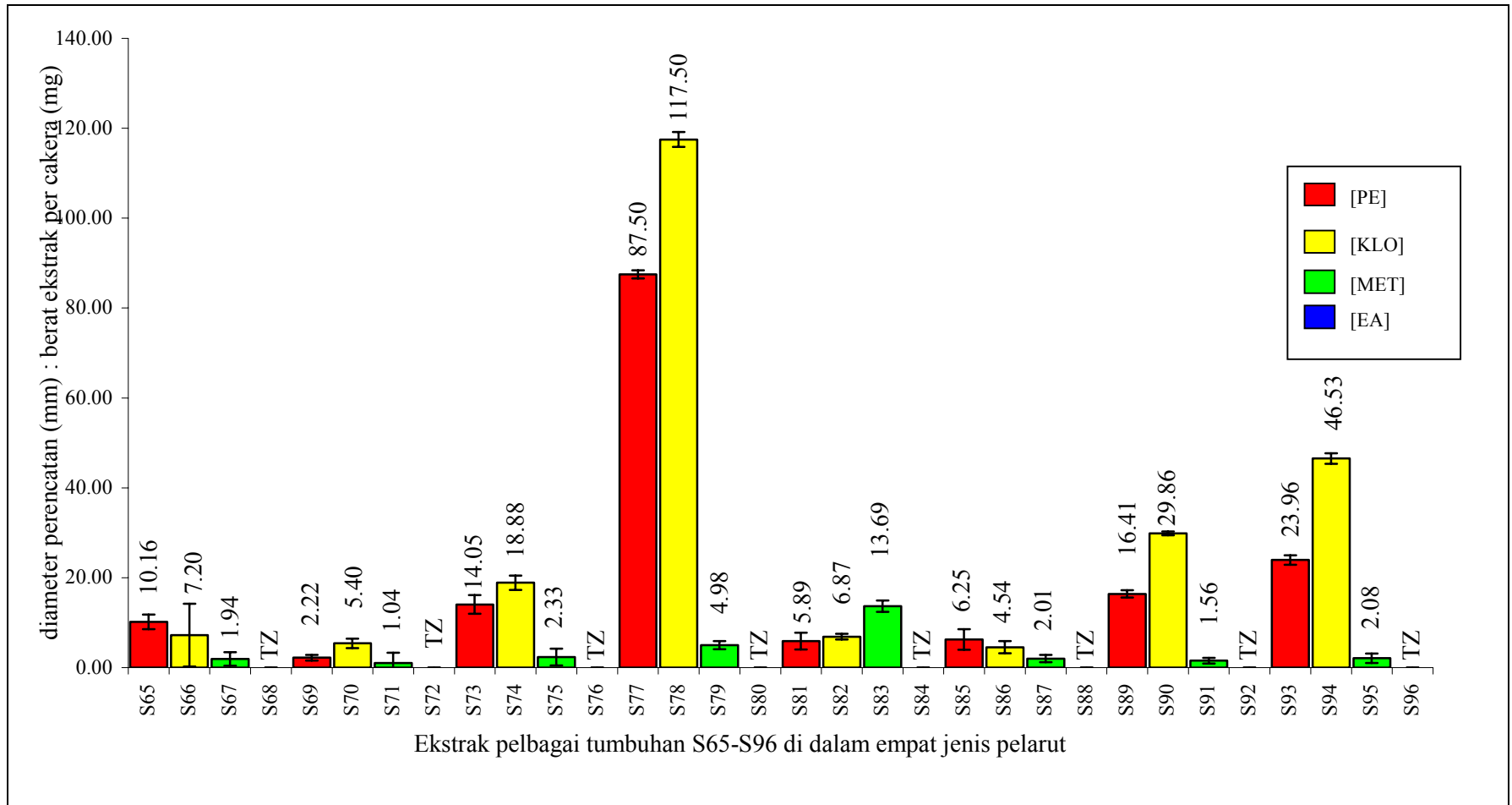
Nota: TZ = Tiada zon



Plat 2.3 : Perencatan pertumbuhan *H.pylori* pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S65-S96.



Plat 2.3 : sambungan



Rajah 2.3: Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S65-S68 = (ubi) *Zingiber officinalis*, S69-S72 = (daun) *Mitrasaeme alsinoides*, S73-S76 = (ubi) *Languas galanga*, S77-S80 = (batang) *Derris trifoliata*, S81-S84 = (daun) *Pluchea indica*, S85-S88 = (daun) *Melastoma malabathricum* (var-blue), S89-S92 = (batang) *Melastoma malabathricum* (var-blue), S93-S96 = (daun) *Hibiscus rosa sinensis* (var-white).

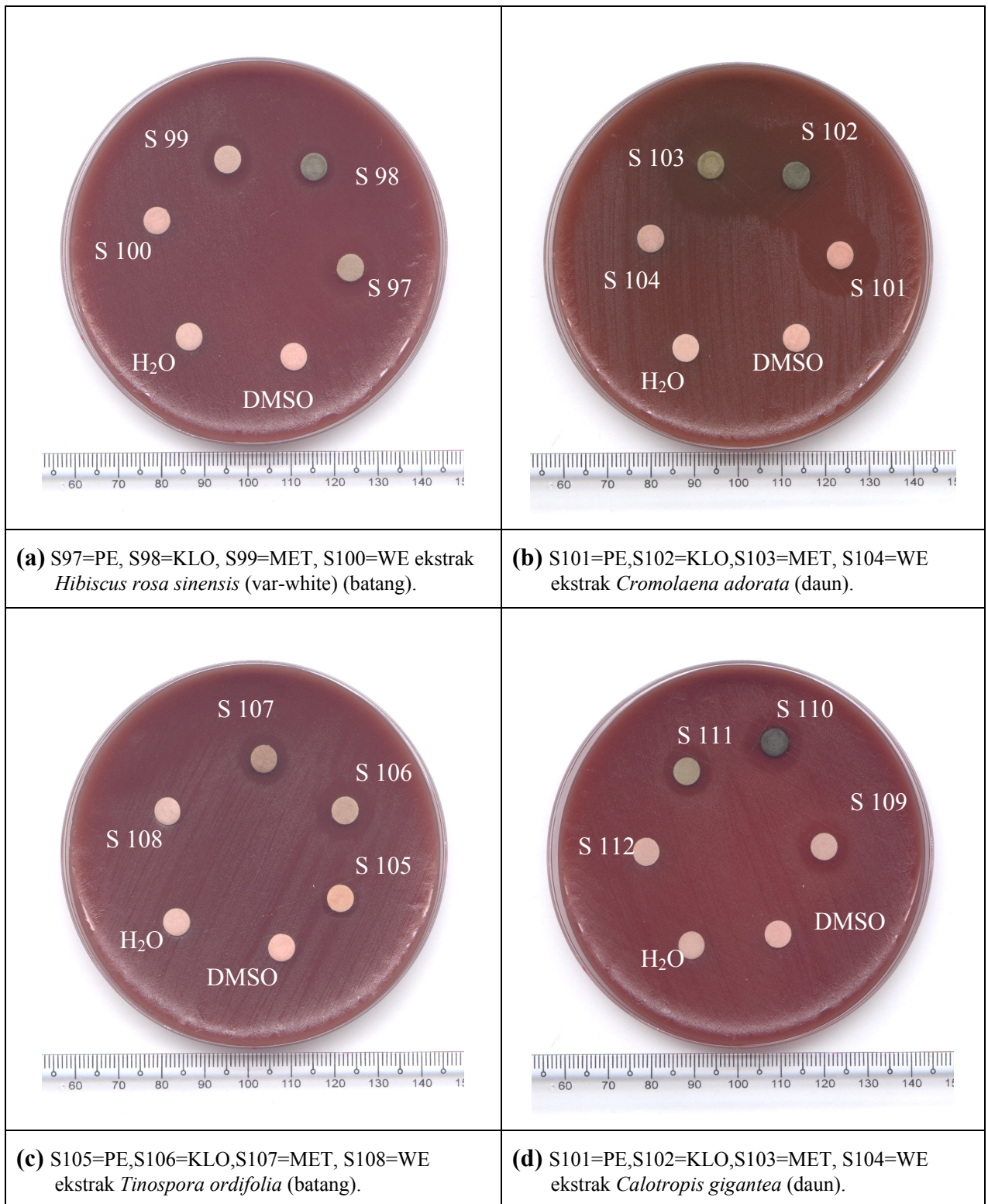
Tidak ada ekstrak yang menghasilkan diameter perencatan melebihi 30 mm dan hanya tujuh sampel sahaja yang menghasilkan diameter perencatan melebihi 20 mm iaitu ekstrak PE daun *C. odorata* yang menghasilkan diameter perencatan 20.33 ± 1.37 mm, ekstrak KLO daun *C. odorata* S102 (25.67 ± 1.03 mm), ekstrak MET daun *C. odorata* S103 (25.33 ± 1.63 mm). Ekstrak MET daun *C. caudatus* S115 (23.00 ± 0.89 mm) dan ekstrak KLO biji *P. speciosa* S122 (26.00 ± 0.63 mm), ekstrak PE batang *C. citratus* S125 (29.50 ± 1.52 mm) dan ekstrak MET batang *C. citratus* S127 (28.50 ± 1.52) [Jadual 2.5 dan Plat 2.4 (a-h)]. Nisbah diameter zon perencatan per berat ekstrak dalam cakera, satu daripada tujuh ekstrak tadi iaitu S102 melebihi 20. Ini disebabkan oleh penggunaan kandungan ekstrak yang tinggi iaitu daripada 1 mg/cakera hingga 19 mg/cakera kecuali S102 (0.88 mg/cakera) sahaja.

Keseluruhannya nisbah diameter perencatan per berat ekstrak dalam cakera yang paling tinggi dihasilkan oleh ekstrak KLO batang *C. citratus* iaitu 75.00 (Jadual 2.5 dan Rajah 2.4). Walaupun purata diameter perencatan sepanjang 18.00 ± 1.41 mm, berat ekstrak per cakera adalah rendah iaitu 0.24 mg sahaja, untuk menghasilkan nisbah diameter zon perencatan per berat ekstrak dalam cakera tinggi.

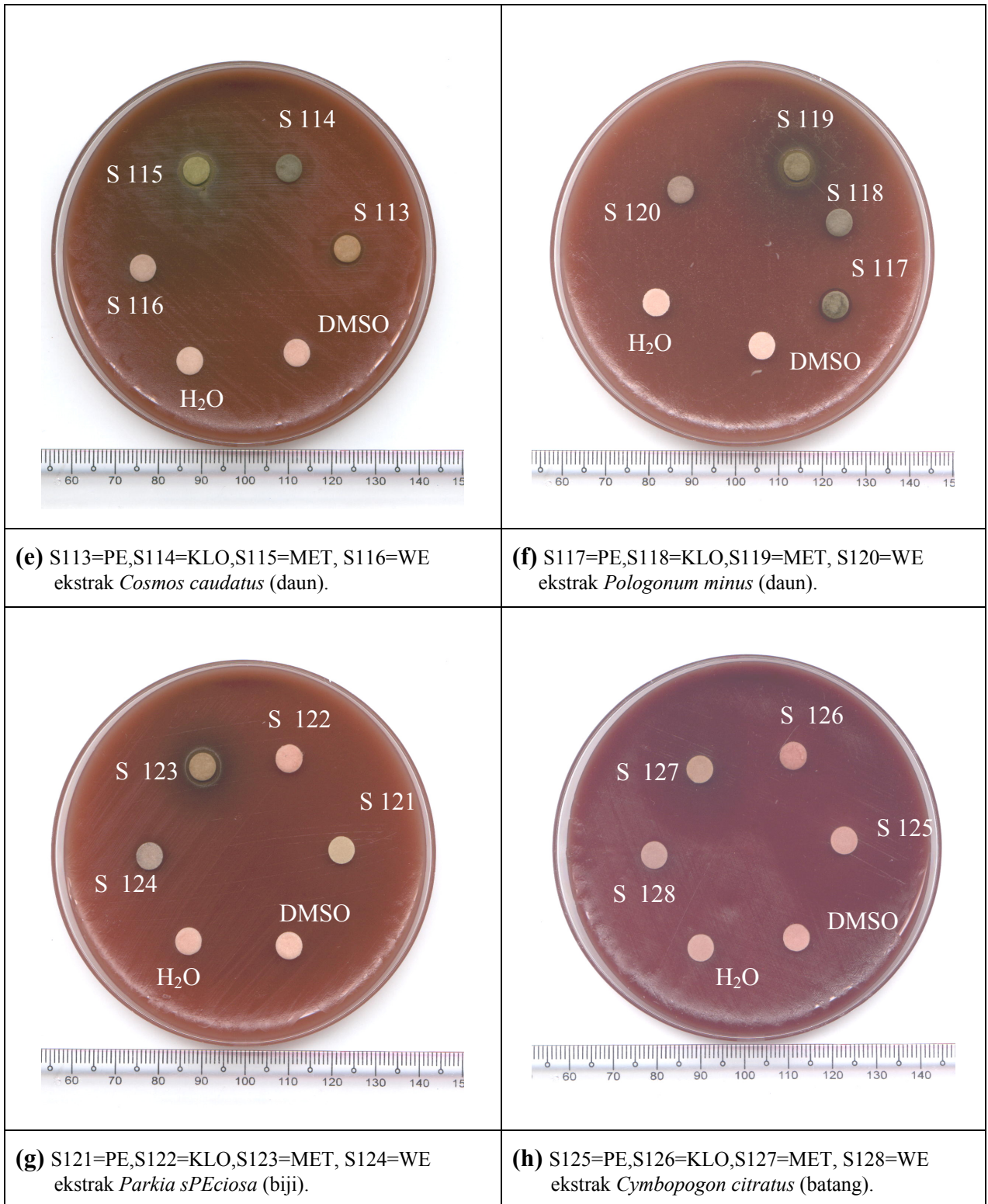
Jadual 2.5 : Purata perencatan pertumbuhan *H. pylori* dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S97 - S128

Spesies tumbuhan yang digunakan	Bahagian tumbuhan	Sampel	Jenis pelarut	Berat ekstrak per cakera (mg)	Purata diameter perencatan + sisihan piawai sebenar (mm)	Nilai nisbah
<i>Hibiscus rosa sinensis</i> (var-white)	Batang	S97	PE	2.32	13.17 ± 0.75	5.68
		S98	KLO	0.88	9.58 ± 0.55	10.89
		S99	MET	5.04	13.67 ± 1.21	2.71
		S100	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Chomolaena odorata</i>	Daun	S101	PE	2.32	20.33 ± 1.37	8.76
		S102	KLO	0.88	25.67 ± 1.03	29.17
		S103	MET	8.96	25.33 ± 1.63	2.83
		S104	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Tinospora ordifolia</i>	Batang	S105	PE	0.96	10.67 ± 0.82	11.11
		S106	KLO	1.76	19.17 ± 4.96	10.89
		S107	MET	8.24	13.67 ± 2.66	1.66
		S108	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Calotropis gigantean</i>	Daun	S109	PE	1.12	13.17 ± 0.75	11.76
		S110	KLO	1.12	14.00 ± 0.89	12.50
		S111	MET	6.88	9.83 ± 1.17	1.43
		S112	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Cosmos caudatus</i>	Daun	S113	PE	1.92	16.00 ± 0.63	8.33
		S114	KLO	0.40	11.67 ± 0.52	29.17
		S115	MET	10.76	23.00 ± 0.89	2.14
		S116	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Polygonum minus</i>	Daun	S117	PE	1.28	15.50 ± 0.55	12.11
		S118	KLO	0.56	12.33 ± 0.82	22.02
		S119	MET	10.08	15.50 ± 1.05	1.54
		S120	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Parkia speciosa</i>	Biji	S121	PE	4.00	10.50 ± 0.84	2.63
		S122	KLO	1.04	26.00 ± 0.63	25.00
		S123	MET	11.52	18.00 ± 0.05	1.56
		S124	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Cymbopogon citratus</i>	Batang	S125	PE	1.84	29.50 ± 1.52	16.03
		S126	KLO	0.24	18.00 ± 1.41	75.00
		S127	MET	19.36	28.50 ± 1.52	1.47
		S128	H ₂ O	2.80	TZ	

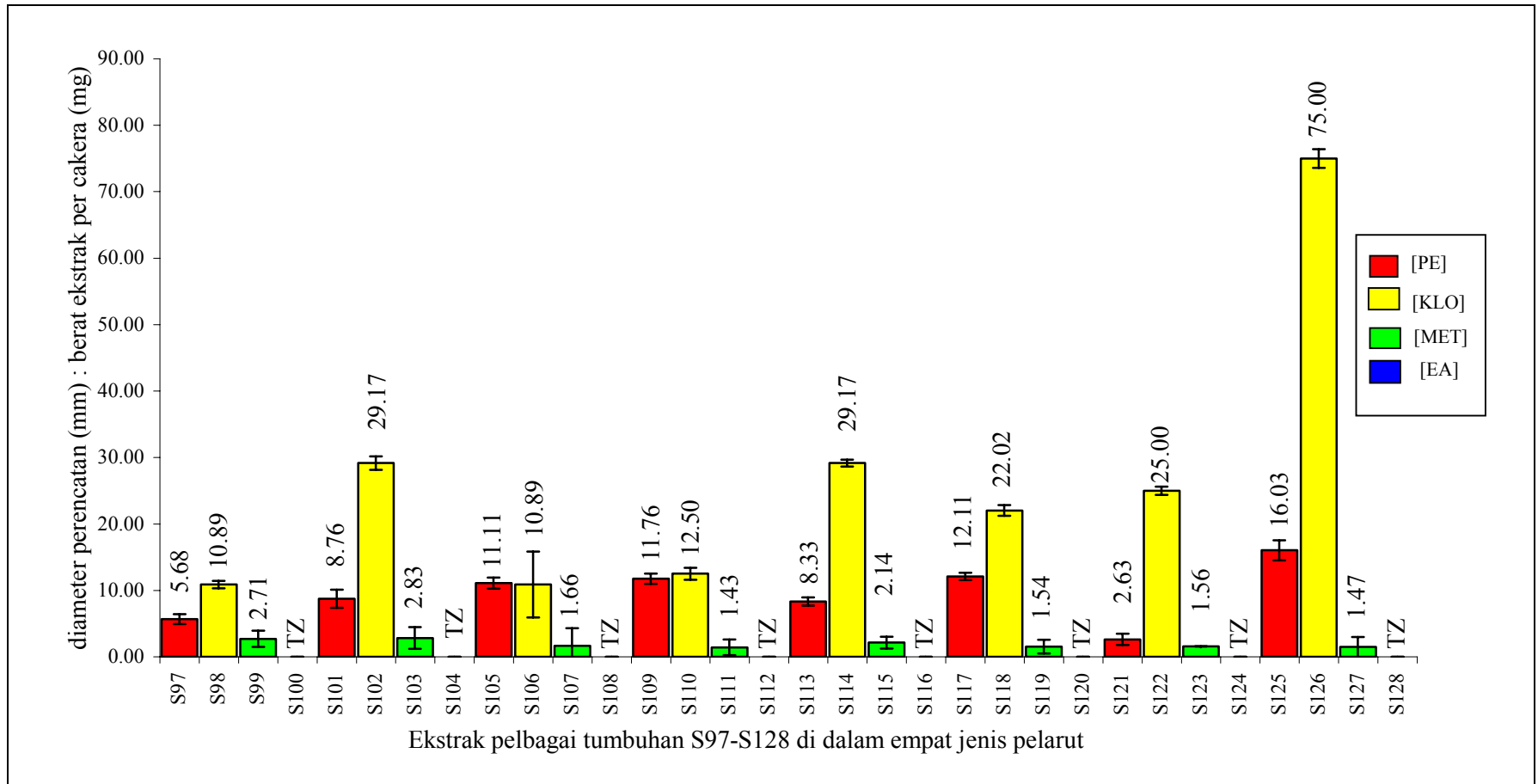
Nota: TZ = Tiada zon



Plat 2.4 : Perencatan pertumbuhan *H.pylori* pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S97-S128.



Plat 2.4 : sambungan



Rajah 2.4: Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasil oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S97-S100 = (batang) *Hibiscus rosa sinensis* (var-white), S101-S104 = (daun) *Chomolaena odorata*, S105-S108 = (batang) *Tinospora ordifolia*, S109-S112 = (daun) *Calotropis gigantean*, S113-S116 = (daun) *Cosmos caudatus*, S117-S120 = (daun) *Polygonum minus*, S121-S124 = (biji) *Parkia speciosa*, S125-S128 = (batang) *Cymbopogon citratus*.

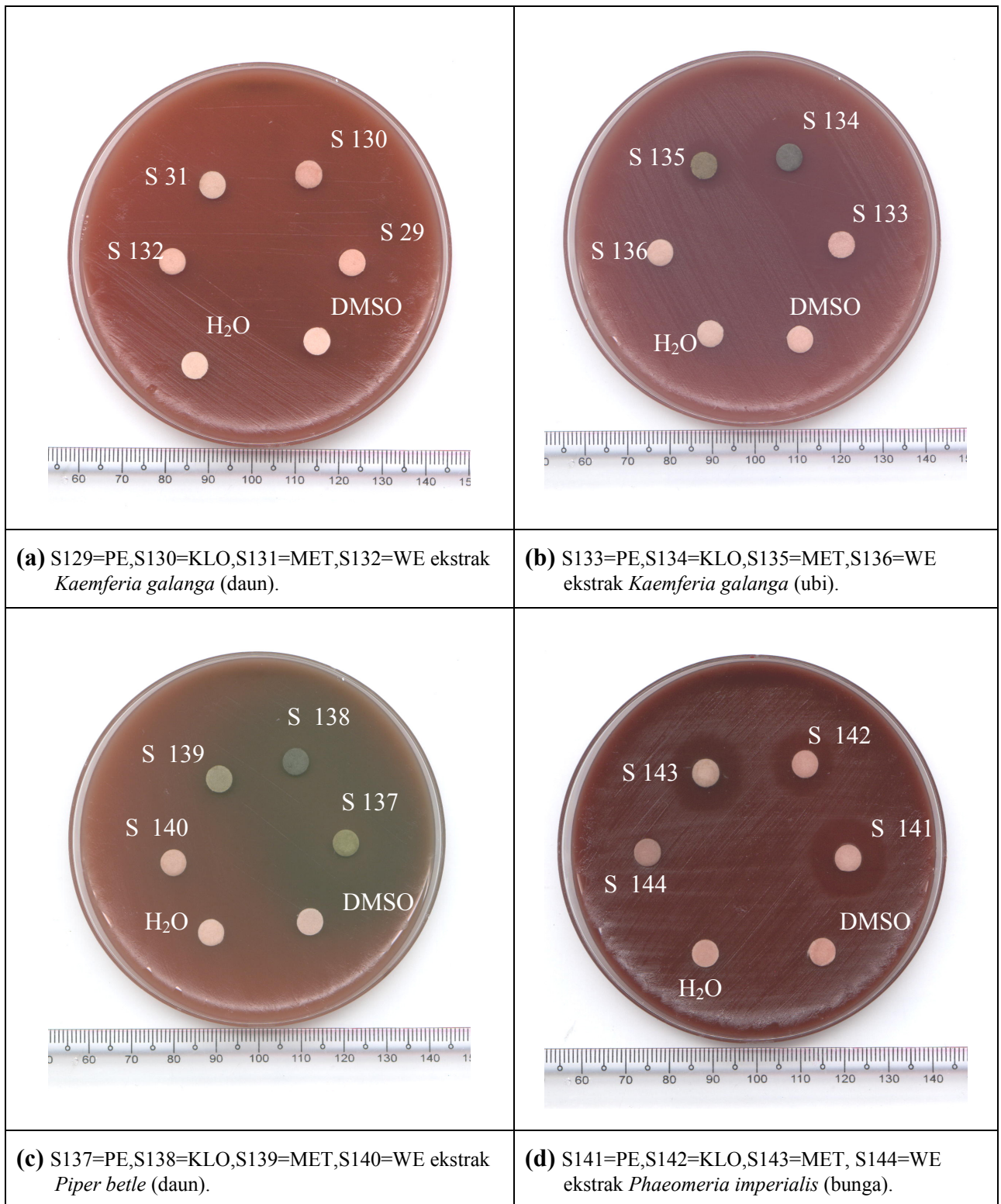
Terdapat empat ekstrak yang memberikan purata diameter perencatan yang melebihi daripada 30mm iaitu ekstrak PE daun *K. galanga* S129 (62.00 ± 0.05 mm), ekstrak KLO daun *K. galanga* S130 (66.00 ± 0.05 mm), ekstrak MET daun *K. galanga* S131 (46 ± 0.05 mm) dan ekstrak PE daun *P. betle* S137 ($54.16 + 0.75$ mm) [Jadual 2.6 dan Plat 2.5 (a-e)].

Hanya ekstrak S130 sahaja yang memberikan nilai nisbah yang tinggi iaitu pada 63.54 (Jadual 2.6 dan Rajah 2.5). Penglibatan kandungan ekstrak adalah kecil iaitu 1.04 mg/cakera berbanding dengan diameter perencatan yang dihasilkan oleh ekstrak ini.

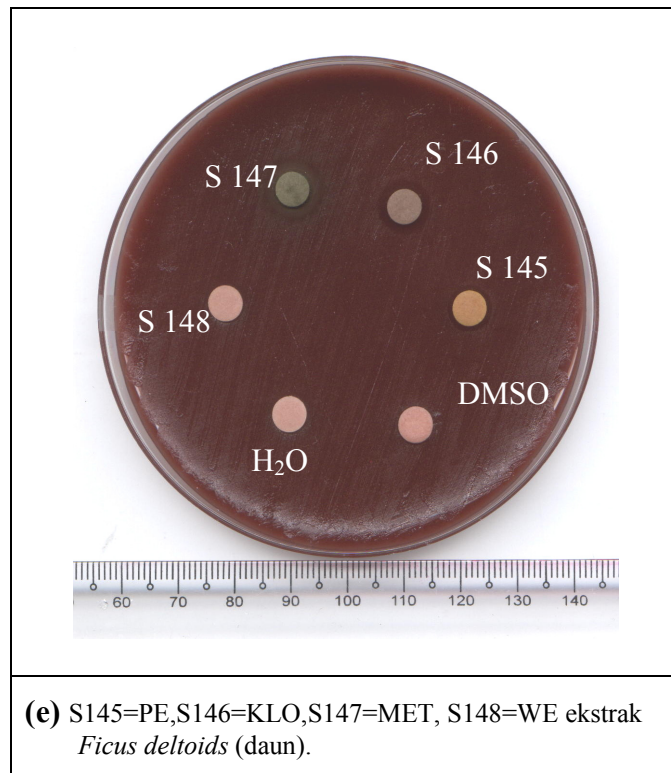
Jadual 2.6 : Purata perencatan pertumbuhan *H. pylori* dan nisbah per diameter perencatan : berat ekstrak per cakera oleh pelbagai ekstrak sampel tumbuhan S129 - S148

Spesies tumbuhan yang digunakan	Bahagian tumbuhan	Sampel	Jenis pelarut	Berat ekstrak per cakera (mg)	Purata diameter perencatan \pm sisihan piawai sebenar (mm)	Nilai nisbah
<i>Kaemferia galanga</i>	Daun	S129	PE	3.12	62.00 \pm 0.05	19.87
		S130	KLO	1.04	66.00 \pm 0.05	63.46
		S131	MET	6.08	46.00 \pm 0.05	7.57
		S132	H ₂ O	2.80	TZ	
	Ubi	S133	PE	1.04	18.33 \pm 1.03	17.63
		S134	KLO	1.36	18.33 \pm 1.03	13.48
		S135	MET	6.72	11.00 \pm 0.63	1.64
		S136	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Piper betle</i>	Daun	S137	PE	8.64	54.17 \pm 0.75	6.27
		S138	KLO	5.28	25.83 \pm 0.75	4.89
		S139	MET	5.96	23.50 \pm 0.84	3.94
		S140	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Phaeomeria imperialis</i>	bunga	S141	PE	2.48	18.00 \pm 1.10	7.26
		S142	KLO	1.28	14.00 \pm 0.63	10.94
		S143	MET	3.60	16.33 \pm 1.37	4.54
		S144	H ₂ O	2.80	TZ	
<i>Ficus deltoides</i>	Daun	S145	PE	1.04	8.00 \pm 0.05	7.69
		S146	KLO	0.56	10.00 \pm 0.63	17.86
		S147	MET	5.04	12.00 \pm 0.63	2.38
		S148	H ₂ O	2.80	TZ	

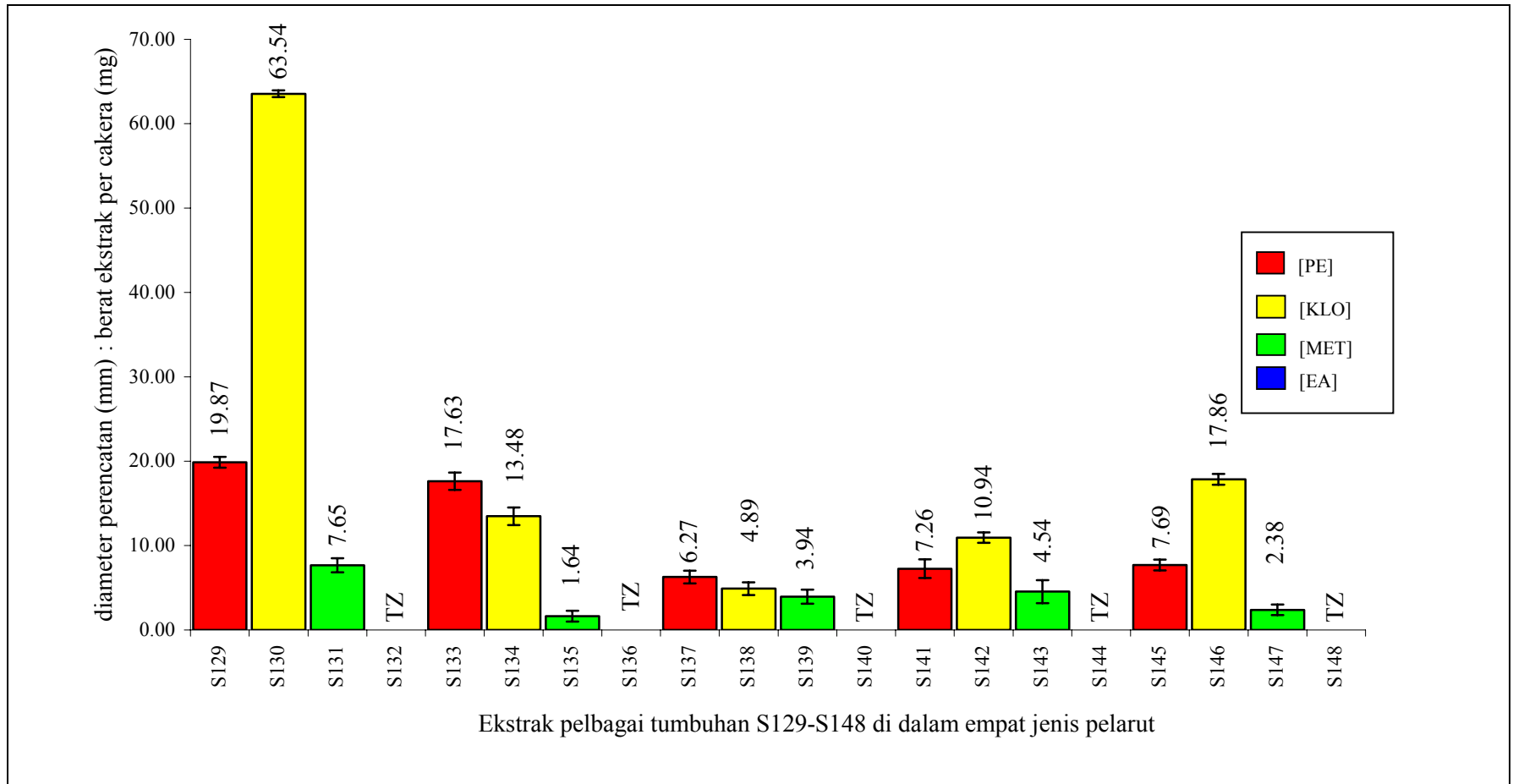
Nota: TZ = Tiada zon



Plat 2.5 : Perencatan pertumbuhan *H.pylori* pada EBA oleh pelbagai ekstrak tumbuhan dari S129-S148.



Plat 2.5 : sambungan



Rajah 2.5: Nisbah diameter perencatan : berat ekstrak per cakera yang dihasilkan oleh pelbagai jenis ekstrak tumbuhan yang terdiri daripada S129-S132 = (daun) *Kaemferia galanga*, S133-S136 = (ubi) *Kaemferia galanga*, S137-S140 = (daun) *Piper betle*, S141-S144 = (bunga) *Phaeomeria imperialis*, S145-S148 = (daun) *Ficus deltoides*.

2.4 PERBINCANGAN

Pengekstrakan bermula dengan menggunakan pelarut kurang polar kepada yang polar. Pelarut yang pertama digunakan adalah PE kerana sifatnya yang kurang polar. PE, sejenis hidrokarbon, merupakan pelarut tidak polar yang mempunyai daya van der Waals antara molekul-molekulnya (Morrison & Boyd, 1992). Sifat daya van der Waals yang lemah ini digunakan dalam prinsip pengekstrakan dengan pelarut kimia di mana ia dimulakan dengan pelarut tidak polar kepada pelarut polar. Sifat lain yang dimiliki oleh pelarut ini ialah ia dapat meruap pada kadar lebih cepat. Bukan itu saja, ianya digunakan untuk melarutkan serta mengekstrak juzukan asid lemak dan asid amino. Pada peringkat ini, lipid dan alkaloid akan dikeluarkan serta klorofil juga dikeluarkan daripada komponen daun.

KLO, sejenis pelarut yang bersifat separa polar ini digunakan selepas pengekstrakan dengan PE selesai dan diikuti dengan MET dan akhir sekali menggunakan air (EA), dimana sifat pelarutnya lebih polar. Kehadiran kumpulan $-OH$ pada sebatian-sebatian ini meningkatkan lagi polaritinya. Oleh itu, pengekstrakan dengan pelarut polar dijalankan pada akhir proses disebabkan ikatan hidrogen yang kuat sukar dipecahkan. Pengekstrakan dengan pelarut kimia adalah alternatif untuk memperluaskan skop pengekstrakan, selain daripada hanya menggunakan air. Dimana sejenis ekstrak herbal dari Greek yang di ekstrak dengan MET mempunyai bahan anti *H. pylori* (Stamatis *et al.*, 2003).

Kajian ini menunjukkan bahawa tumbuhan tempatan sememangnya mempunyai kesan antimikrob. Kegiatan anti-*H. pylori in vitro* dapat dihasilkan oleh beberapa jenis tumbuhan tempatan seperti *Languas galanga*, *Zingiber officinalis*, *Jatropha podagrica*, *Orthosiphon stamineus*, *Pereskia saecnarosa*, *Melastoma malabathricum* (var-blue), *Hibiscus rosa-sinensis* (var white), *Derris trifoliata*, *Zingiber spectabile* and *Melia indica* (Uyub & Azlan, 2001). Kemungkinan hal ini ada kaitan dengan penggunaan tumbuhan-tumbuhan ini oleh masyarakat Melayu yang menjadikan jangkitan dikalangan mereka rendah berbanding dengan masyarakat Cina dan India.

Daripada 32 spesies tumbuhan dengan 148 sampel ekstrak yang dihasilkan dalam kajian ini didapati kesemua spesies mempunyai kebolehan dalam merencatkan pertumbuhan *H. pylori* tetapi tidak semua sampel ekstrak dapat memberi kesan perencatan. Kebanyakan ekstrak PE, KLO dan MET sahaja yang menunjukkan kesan anti *H. pylori* tetapi tidak EA (ekstrak yang terakhir). Hanya EA bagi tiga spesies sahaja yang dapat memberi kesan anti *H. pylori* iaitu *P. guajava*, *O. stamineus* dan *D. cochinchinensis*.

Ekstrak PE dan KLO untuk *D. chochinensis* tidak dapat diuji oleh kerana tiada bahan dapat diekstrak keluar oleh kedua-dua pelarut tersebut. Bahan-bahan hanya dikeluarkan ketika ekstrak MET dan EA dijalankan. Ini menunjukkan bahawa tumbuhan ini hanya mengandungi bahan-bahan yang lebih polar. Namun begitu kedua-dua ekstrak tersebut mampu merencatkan pertumbuhan *H. pylori*. Berbanding dengan ekstrak *P. guajava* dan *O. stamineus* keempat-empat ekstrak yang digunakan dalam kegiatan pengekstrakan memberikan kesan perencatan terhadap pertumbuhan *H. pylori*. Malah ekstrak batang PE *O. stamineus* menduduki tempat keempat dalam nilai nisbah yang

tertinggi. Berbanding dengan *P. guajava*, di mana daunnya sering digunakan dalam merawat cirit birit, namun kesan perencatan pertumbuhan *H. pylori* tidaklah begitu besar. Tetapi ia merupakan amalan yang sering dilakukan oleh pengamal perubatan tradisional mungkin disebabkan faktor untuk mendapatkan bahan ini adalah mudah. Dengan mempunyai satu batang pokok yang besar sudah memadai jika dibandingkan dengan berpuluh-puluh batang pokok lain. Malah setelah kajian secara saintifik dilakukan, ternyata ekstrak *P. guajava* mempunyai aktiviti antibakteria terhadap organisma enterion (Caceres *et al.*, 1993).

Ujian yang dilakukan dalam kajian ini adalah ujian pembauran. Ujian ini biasanya dilakukan untuk peringkat awal bagi ujian anti mikrob. Malah ianya telah diterima dengan baik pada peringkat antarabangsa terutama oleh National Committee for Clinical Laboratory Standards (Wayne, 2001). Secara amnya dalam kajian ini, kesan perencatan keempat-empat jenis ekstrak terhadap *H. pylori* dapat ditentukan. Kesan perencatan diukur berdasarkan diameter zon perencatan. Walaubagaimanapun di dalam kajian ini, nilai tersebut diambil tidak boleh digunakan disebabkan berat ekstrak-ekstrak yang digunakan adalah tidak sama. Oleh itu, nilai nisbah diambil untuk penentuan ekstrak paling aktif untuk bertindak sebagai anti-*H. pylori*. Nilai nisbah ini adalah terdiri daripada diameter perencatan per berat ekstrak dalam sekeping cakera. Melalui nilai ini dapat diketahui bahawa ekstrak yang mempunyai nilai nisbah yang paling tinggi adalah ekstrak yang paling aktif membunuh *H. pylori* .

Kebanyakan ekstrak yang melalui peringkat pengekstrakan dengan pelarut PE dan KLO mempunyai nilai nisbah yang tinggi. Mengikut kebolehan pelarut yang terbabit, PE mengeluarkan asid lemak dan asid amino manakala

KLO pula mengeluarkan alkaloid dan lipid. Asid lemak dan monogliserida mempunyai potensi untuk bertindak sebagai anti *H. pylori* (Sun *et al.*, 2003). Herba Gosyuyu yang mengandungi alkaloid alkil metil kuinolon boleh merencatkan pertumbuhan *H. pylori* (Tominaga *et al.*, 2002). Oleh itu adalah dipercahayai bahawa bahan-bahan yang dikeluarkan daripada kegiatan pengekstrakan tersebut boleh memberi kesan perencatan terhadap pertumbuhan *H. pylori*.

Ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* memberikan keputusan nisbah yang paling tinggi (117.50). Ini menunjukkan bahawa kandungan yang sedikit sudah cukup untuk memberikan kesan perencatan yang besar kepada pertumbuhan *H. pylori*. Dalam kajian ini, pengekstrakan dengan PE menunjukkan nilai nisbah yang kedua tertinggi iaitu 87.50. Tetapi pengekstrakan dengan menggunakan pelarut MET sahaja yang agak kecil nilai nisbahnya iaitu sekitar 4.98 sahaja. Kemungkinan sebatian atau bahan aktif tertentu yang mempunyai kebolehan untuk merencatkan pertumbuhan atau bertindak sebagai anti *H. pylori* telah keluar pada peringkat pengekstrakan dengan PE dan KLO. Oleh itu bahan tersebut menjadi kurang apabila diekstrak dengan MET menjadikan ianya kurang aktif untuk bertindak sebagai anti-*H. pylori*. Keperluan bahan ini menjadi banyak, menjadikan berat ekstrak per cakera menjadi besar dan nisbah menjadi rendah. Terdapat satu spesies dalam genus yang sama yang juga memberikan kesan perencatan terhadap *H. pylori* iaitu *Derris malaccensis* (Takashima *et al.*, 2002).

Walaupun ekstrak tumbuhan *D. trifoliata* memberikan tahap yang paling aktif dalam perencatan pertumbuhan *H. pylori* secara *in vitro*, namun sifat spesifik ekstrak ini perlu diuji kerana ianya penting bagi kesan terhadap flora

semulajadi di dalam perut. Di samping itu ujian ketoksikan juga perlu dilakukan untuk mengetahui akan tahap ketoksikan ekstrak tumbuhan *D. trifoliata* ini.

2.5 **KESIMPULAN.**

Tumbuhan tempatan mempunyai potensi untuk bertindak sebagai bahan yang merencatkan pertumbuhan *H. pylori*. Dalam kajian ini ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* telah dibukti merupakan ekstrak tumbuhan yang terbaik untuk bertindak sebagai anti *H. pylori* berbanding dengan ekstrak-ekstrak yang lain berikutan dengan penggunaan ekstrak yang sedikit sudah cukup untuk memberi kesan perencatan yang besar terhadap pertumbuhan bakteria tersebut. Oleh itu kajian seterusnya perlu dilakukan untuk menentukan sifat spesifik dan tahap ketoksikan ekstrak tumbuhan *D. trifoliata* ini.

3 EKSTRAK TUMBUHAN *DERRIS TRIFOLIATA* : KESANNYA TERHADAP BAKTERIA PATOGEN DAN KETOKSIKANNYA

3.1 PENGENALAN AM.

Ekstrak KLO *Derris trifoliata* menunjukkan nilai nisbah yang paling tinggi dan terbaik berbanding 148 ekstrak yang dikaji. Ini menjadikan ekstrak ini sebagai sumber yang terbaik dalam kajian anti *H. pylori*. Hasil yang diperolehi daripada kegiatan pengekstrakan adalah sedikit. Akan tetapi zon perencatan yang dihasilkan adalah besar walaupun menggunakan kepekatan yang rendah. Walaubagaimanapun kepekaan terhadap bakteria-bakteria yang lain juga perlu diambil perhatian. Kebolehan membunuh atau menghalang pertumbuhan yang spesifik terhadap sesuatu bakteria menjadikan ekstrak tersebut penting kerana kegunaannya menjadi terhad tanpa menjejaskan spesies bakteria lain. Hal ini penting untuk mengelakkan gangguan pada pertumbuhan bakteria lain. Seperti yang kita ketahui, kehadiran bakteria seperti *E. coli* di dalam perut manusia dan haiwan adalah penting. Kegunaannya untuk mensintesis vitamin K (Li *et al.*, 2000) menjadikan ianya begitu diperlukan dalam kehidupan seharian.

Tindakan ekstrak tumbuhan yang dikatakan khusus ke atas *H. pylori* ini turut dilaporkan oleh Hamasaki *et al.*, (2000). Dalam kajian tersebut, ekstrak pokok Gosyuyu, sejenis tumbuhan herba Cina, mempunyai aktiviti anti-*H. pylori* disebabkan kehadiran bahan yang spesifik yang hanya bertindak ke atas *H. pylori* sahaja dan tidak ke atas bakteria patogen yang lain.

Ketoksikan sesuatu bahan ekstrak menjadikan ianya tidak begitu baik memandangkan kebolehan merencatkan *H. pylori* bukanlah disebabkan oleh

bahan aktif yang bertindak ke atas bakteria tersebut tetapi ketoksikan menjadi punca daripada penghalang kepada akibat pertumbuhan bakteria itu sendiri pemecahan sel akibat nekrosis dan kegagalan sel bakteria itu membahagi. Oleh itu dalam kajian ini, larva *Artemia salina* digunakan untuk menguji tahap ketoksikan ekstrak kasar *D. trifoliata*. Ia merupakan sejenis invertebrata yang telah digunakan sebagai ujian alternatif untuk menentukan ketoksikan bahan kimia. Kaedah ini merupakan satu kaedah yang berguna untuk meramalkan ketoksikan akut dalam ekstrak tumbuhan (Logarto Parra *et al.*, 2001). Walaupun kaedah ini tidak begitu tepat untuk menyatakan ketoksikan sesuatu bahan kepada manusia atau haiwan tetapi ianya merupakan satu kaedah yang cepat, mudah dan murah (Ojala *et al.*, 1999)

Objektif kajian dalam Bab ini ialah, pertama untuk menentukan sama ada ekstrak *D. trifoliata* menunjukkan kesan perencatan memilih yang hanya spesifik terhadap *H. pylori* sahaja atau juga merencat bakteria patogen lain; kedua untuk menentukan sama ada ekstrak ini toksik atau tidak dengan menggunakan *Artemia salina*.

3.2 BAHAN DAN KAEDAH

3.2.1 Penentuan Kesan Ekstrak Tumbuhan *D. trifoliata* Terhadap Bakteria Lain.

Bahan dan kaedah yang sama digunakan dalam Bab 2 dengan perbezaan dimana hanya ekstrak kasar *D. trifoliata* sahaja yang digunakan serta tambahan untuk lain-lain patogen seperti *Salmonella* sp., *Enterobacter* E114, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio cholerae* (strain pencilan marin). Semua bacteria tersebut diperolehi dari Institut Penyelidikan Perikanan, Batu Maung, Pulau Pinang. Manakala *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* A, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, dan *Pseudomonas aeruginosa* diperolehi dari Jabatan Mikrobiologi dan Parasitologi Perubatan, Pusat Pengajian Sains Perubatan, Universiti Sains Malaysia, Kampus Kesihatan, Kubang Kerian, Kelantan. Medium pengkulturan untuk bacteria patogen ini adalah Agar Mueller Hinton II (BBL, Cockeysville MD, USA). Sebagai penyediaannya sebanyak 38 g serbuk agar ini ditambahkan bagi menjadikan 1L larutan. MHA yang sudah diautoklaf ini dibiarkan sejuk sehingga mencapai suhu 50⁰C sebelum dituang ke dalam piring petri. Manakala, pengeraman pula dijalankan pada suhu 37⁰C di dalam inkubator (Mettler, Jerman). Pertumbuhan dapat dilihat selepas 12 hingga 24 jam pengeraman.

Bagi penyediaan cakera yang mengandungi ekstrak tumbuhan *D. trifoliata*, sebanyak 40 µl (20 µl untuk dua kali) dengan 200 µg per cakera ekstrak *D. trifoliata* yang steril dititiskan ke atas cakera AA 6 mm (Whatman, UK) secara aseptik. Ekstrak dibiarkan kering selama 5 minit sebelum dititiskan

sekali lagi dan kemudiannya dibiarkan kering. Bagi ujian bakteria patogen, medium MHA digunakan manakala EBA digunakan untuk *H. pylori*.

3.2.2 Penentuan Ujian Ketoksikan

3.2.2.1 Penyediaan air laut buatan 35% saliniti.

Air laut tiruan disediakan dengan saliniti 35⁰/₀₀ mengikut saliniti Kester *et al.*, (1967) (Jadual 3.1) dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit.

3.2.2.2 Penyediaan *Artemia salina*

Artemia salina (Focus, USA) atau udang air laut diguna untuk ujian tahap ketoksikan ekstrak PE, KLO dan MET *D. trifoliata*. Telur *A. salina* direndam di dalam air laut buatan (Bab 3.2.2.1) selama 12 hingga 24 jam. Cahaya dibekalkan untuk mengutipnya kerana pencahayaan akan menarik *A. salina* ke arahnya. Seratus µl air laut buatan yang mengandungi 10 hingga 15 ekor *A. salina* digunakan untuk kajian seterusnya.

3.2.2.3 Penyediaan siri kepekatan ekstrak

Kepekatan muktamad ekstrak dalam air laut buatan yang diuji menjulat dari 1 hingga 128 µg/ml, peningkatan bersiri dua kali ganda dalam sistem ujian. Isipadu ekstrak untuk menghasilkan kepekatan muktamad ditambah kepada air laut buatan. Seterusnya, pencairan dua kali ganda dilakukan dengan air laut bagi memperoleh julat kepekatan muktamad yang diperlukan sehingga 1 µg/ml. Kawalan adalah air laut buatan sahaja dan air laut buatan yang dicampur dengan julatan isipadu DMSO yang digunakan oleh ekstrak. Isipadu campuran ekstrak dan air laut buatan ialah 900 µl dan disediakan di dalam botol Bijou.

3.2.2.4 Pendedahan *A. salina* kepada kepekatan ekstrak berlainan

Seratus µl daripada air laut yang mengandungi *A. salina* (Bab 3.2.2.2) dipipet ke dalam setiap botol Bijou yang mengandungi larutan air laut buatan pada kepekatan ekstrak berbeza menjadikan jumlah keseluruhan adalah 1000 µl. Botol Bijou yang tersebut dibiarkan selama 12 jam bagi memerhati kesan toksik ekstrak terhadap *A. salina*.

3.2.2.5 Penentuan tahap toksisiti ekstrak

A. salina yang hidup kelihatan aktif disebabkan kepekaan terhadap cahaya. Oleh yang demikian, individu yang mati dapat dihitung. KLO dimasukkan untuk mematikan semua *A. salina* untuk pengiraan jumlah. Oleh itu, pengiraan LC₅₀ dapat ditentukan.

Jadual 3.1 : Kandungan air laut buatan bagi saliniti 35% (b/i)

Nama bahan	Formula	Jisim (g)
Sodium klorida	NaCl	23.9260 g
Magnesium klorida tetrahidrat	MgCl ₂ .6H ₂ O	10.830 g
Sodium sulfat	Na ₂ SO ₄	4.0080 g
Kalsium klorida	CaCl ₂	1.147 g
Kalium klorida	KCl	0.677 g
Sodium bikarbonat	NaHCO ₃	0.196 g
Kalium bromida	KBr	0.098 g
Asid borik	H ₃ BO ₃	0.026 g
Sodium florida	NaF	0.003 g
Strontium klorida	SrCl ₂	0.024 g
Air suling untuk menjadikan isipadu 1000 ml.		

(Sumber : Kester *et al.*, 1967)

3.3 KEPUTUSAN

Tiga belas pencilan bakteria lain (10 spesies yang terdiri lapan genus) telah diuji dengan ekstrak PE, KLO dan MET *D. trifoliata* serta *H. pylori* sebagai kawalan. Kandungan ekstrak adalah sebanyak 200mg per cakera. Keputusan menunjukkan yang ekstrak PE merencat *P. aeruginosa* (7.33 ± 0.58 mm) dan *V. cholerae* (6.50 ± 0.10 mm) [Jadual 3.2 dan Plat 3.1a & b]. Diameter perencatan dihasilkan oleh ekstrak PE ini terhadap *H. pylori* adalah 42 ± 1.00 mm (Jadual 3.2 dan Plat 3.1n). Keputusan ini mencadangkan yang ekstrak PE tumbuhan *D. trifoliata* tidak spesifik terhadap *H. pylori*.

Ekstrak KLO juga merencat bakteria lain seperti *P. aeruginosa* dengan diameter perencatan (14.00 ± 0.10 mm), *V. cholerae* ($6.5 \text{ mm} \pm 0.10 \text{ mm}$), *V. parahaemolyticus* (7.00 ± 0.10 mm), *S. boydii* (7.00 ± 0.10 mm), *S. dysenteriae* ($7.00 \text{ mm} \pm 0.10 \text{ mm}$), *P. stutzeri* ($7.00 \text{ mm} \pm 0.10 \text{ mm}$) dan *S. paratyphi A* ($7.00 \text{ mm} \pm 0.10 \text{ mm}$) [Jadual 3.2 dan Plat 3.1 a, b, c, h, i, j & m]. Diameter perencatan terhadap bakteria tersebut adalah lebih kecil berbanding dengan diameter perencatan terhadap *H. pylori* (38.00 ± 1.00 mm) [Jadual 3.2 dan Plat 3.1n].

Jadual 3.2 juga menunjukkan diameter perencatan oleh ekstrak MET kepada *P. aeruginosa* (11.00 ± 1.00 mm), *S. aureus* (7.0 ± 0.10 mm), *P. vulgaris* ($12.67 + 0.58$ mm), *Enterobacter* sp.: 8.00 ± 0.10 mm), *E. coli* (8.00 ± 0.10 mm), *Escherihia coli* ATCC 25922 (15.00 ± 1.00 mm) dan *Salmonella* sp. (13.00 ± 1.00 mm) [Plat 3.1 a, d, e, f, g, k & l]. Diameter perencatan terbesar (15.00 ± 1.00 mm) ditunjukkan oleh *E. coli* ATCC 25922 berbanding diameter

perencatan terhadap *H. pylori* yang sebesar 8.5 ± 1.00 mm (Plat 3.1n), mencadangkan yang ekstrak MET tidak begitu aktif terhadap *H. pylori*.

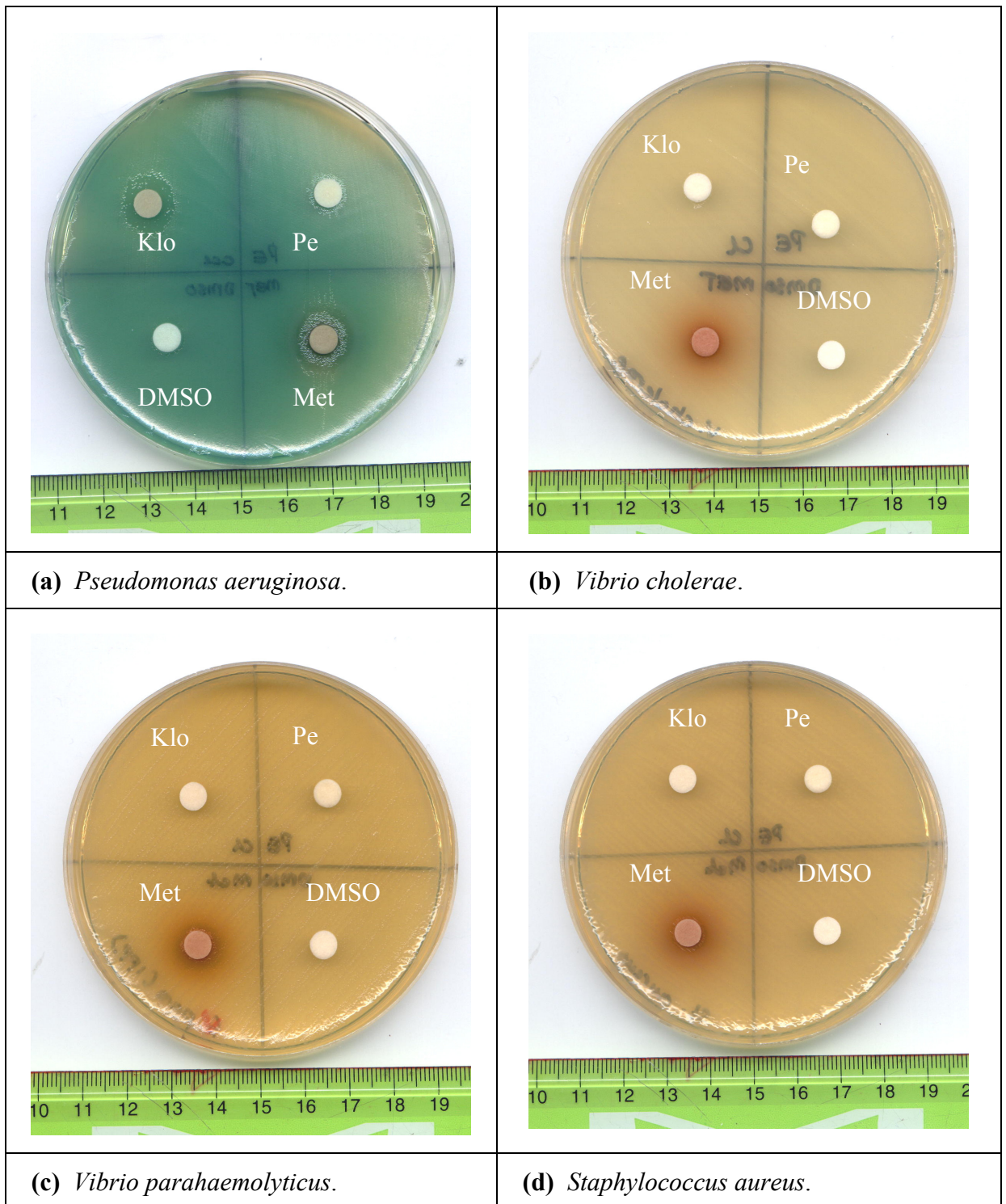
Jadual 3.2 : Diameter perencatan bakteria patogen oleh ekstrak kasar *D. trifoliata*.

Spesies Bakteria Yang Diuji	Diameter* zon perencatan		
	Ekstrak PE (mm)	Ekstrak KLO (mm)	Ekstrak MET (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	7.33 ± 0.58	14.00 ± 1.00	11.00 ± 1.00
<i>V. cholerae</i>	6.50 ± 0.10	6.50 ± 0.10	TZ
<i>V. parahaemolyticus</i>	TZ	7.00 ± 0.10	TZ
<i>S. aureus</i>	TZ	TZ	7.00 ± 0.10
<i>P. vulgaris</i>	TZ	TZ	12.67 ± 0.58
<i>Enterobacter</i> sp.	TZ	TZ	8.00 ± 0.10
<i>E. coli</i>	TZ	TZ	8.00 ± 0.10
<i>S. boydii</i>	TZ	7.00 ± 0.10	TZ
<i>S. dysenteriae</i>	TZ	7.00 ± 0.10	TZ
<i>P. stutzeri</i>	TZ	7.00 ± 0.10	TZ
<i>E. coli</i> ATCC 25922	TZ	TZ	15.00 ± 1.00
<i>Salmonella</i> sp.	TZ	TZ	13.00 ± 1.00
<i>Salmonella paratyphi</i> A	TZ	7.00 ± 0.510	TZ
<i>H. pylori</i> (kawalan)	42.00 ± 1.00	38.00 ± 1.00	8.5 ± 1.00

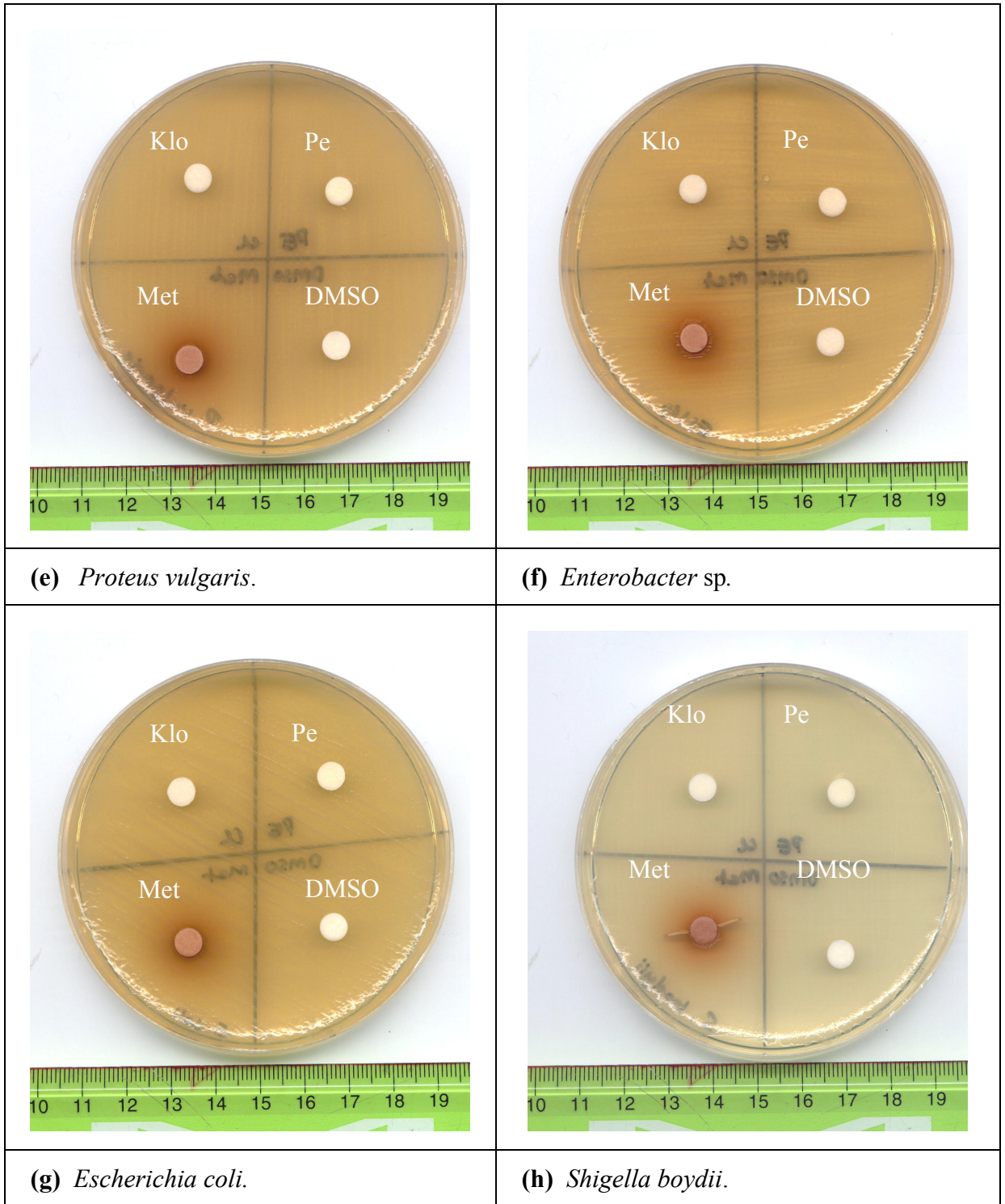
Kekunci Jadual:

* purata tiga bacaan

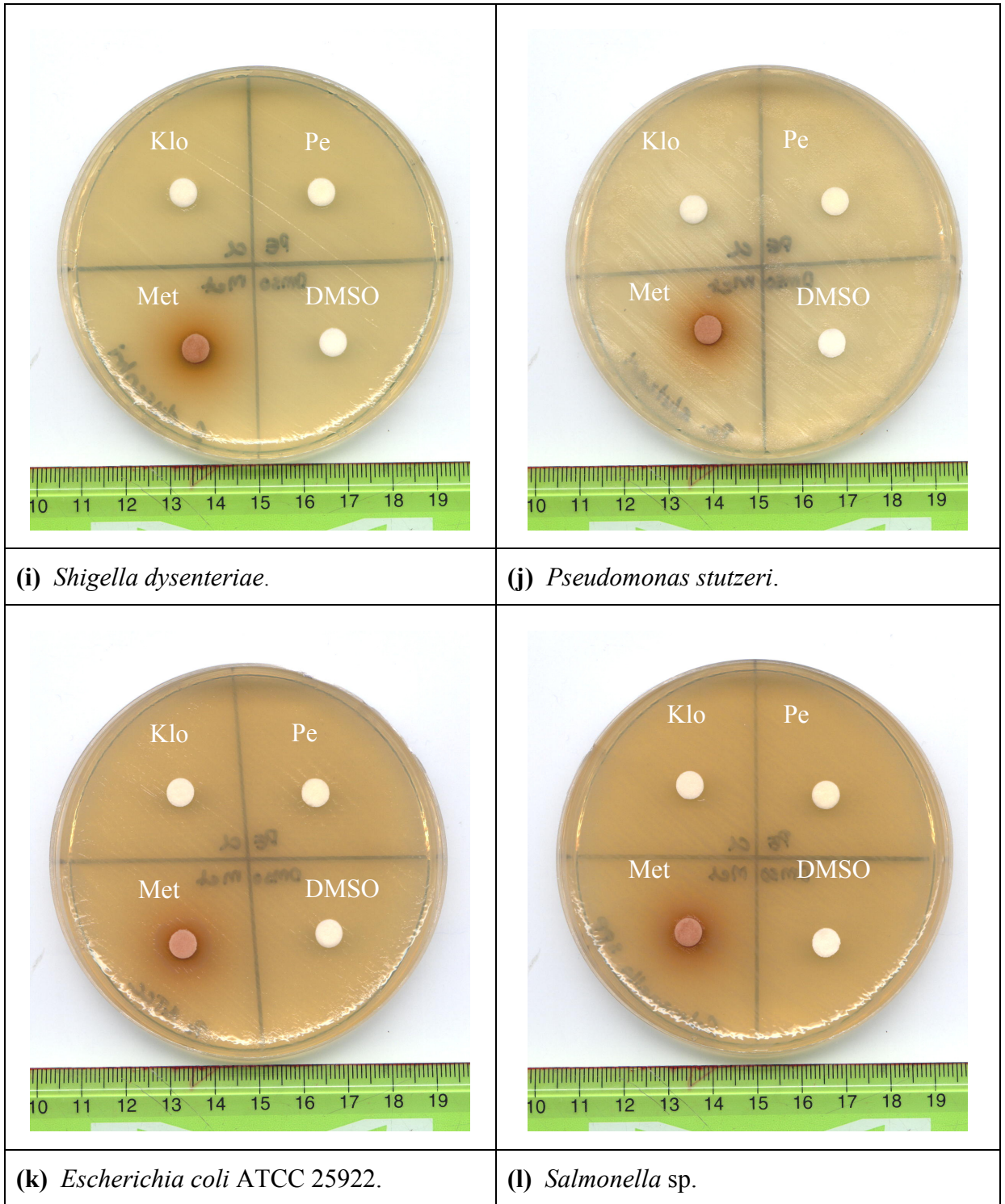
TZ tiada zon perencatan



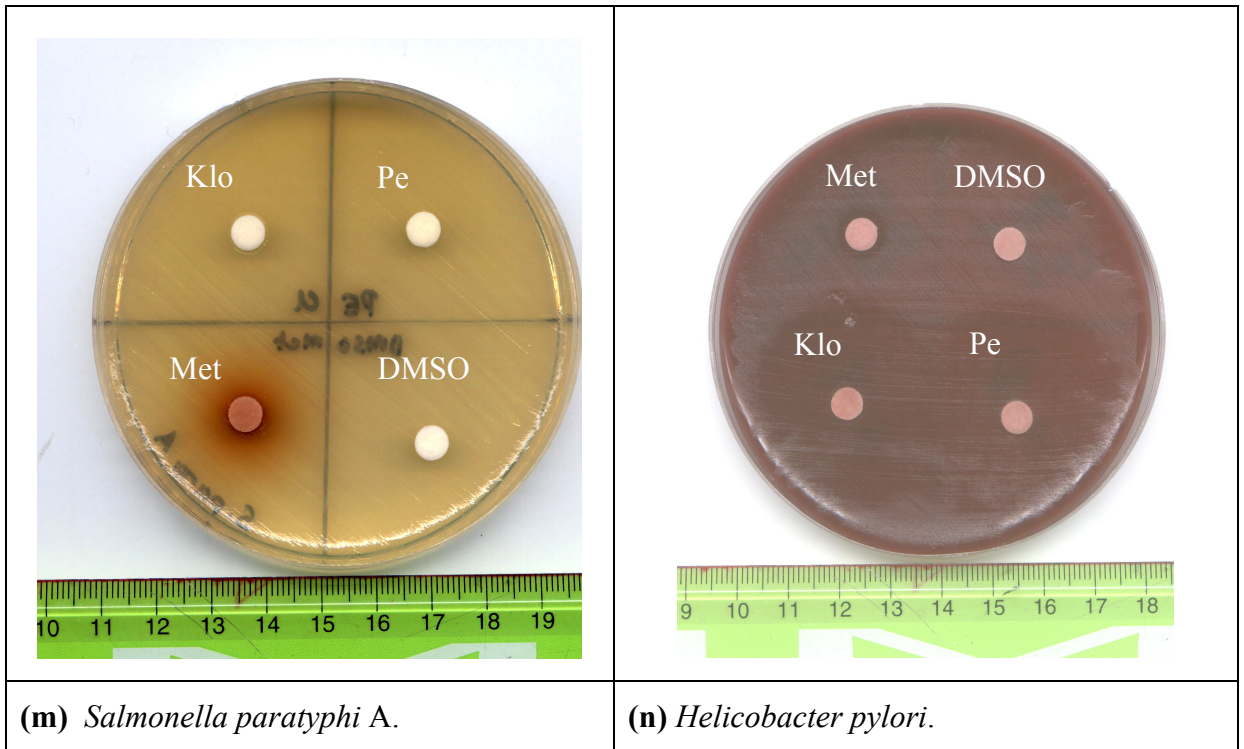
Plat 3.1 : Kesan ekstrak PE, KLO, MET dan DMSO (kawalan) terhadap bakteria patogen lain dan *H. pylori* dengan ujian pembauran cakera.



Plat 3.1 : sambungan



Plat 3.1 : sambungan



Plat 3.1 : sambungan

Ujian ketoksikan telah dijalankan secara tripliket. Bilangan mati, bilangan hidup dan jumlah *A. salina* diambil kira secara purata. Hasil ujian menunjukkan bahawa ekstrak PE *D. trifoliata* memberikan nilai LC₅₀ sebanyak 1.4 µg/ml (Jadual 3.3), ekstrak KLO *D. trifoliata* nilai LC₅₀ adalah 1.1 µg/ml (Jadual 3.4), manakala ekstrak MET *D. trifoliata* pula memberikan nilai LC₅₀ sebanyak 54.9 µg/ml (Jadual 3.5). Kesemua *A. salina* tidak mati dalam DMSO dan air laut tiruan, mencadangkan DMSO dalam ekstrak tidak toksik ke atas *A. salina*.

Jadual 3.3 : Pengiraan LC₅₀ bagi ekstrak PE *D. trifoliata*.

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
128	2.1072	11	0	1	100.00
64	1.8062	12	0	1	100.00
32	1.5051	11	0	1	100.00
16	1.2041	10	0	1	100.00
8	0.9031	11	1	17/19	89.47
4	0.6021	8	3	23/33	69.70
2	0.3010	6	4	19/31	61.29
1	0.0000	5	8	2/5	40.00
Kawalan air		0	12	0	0.00
Kawalan DMSO		0	10	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Di mana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	0.00
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	0.30
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	40.00
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	61.29
Log LC ₅₀	=	0.141		
LC ₅₀	=	1.4		

Jadual 3.4 : Pengiraan LC₅₀ bagi ekstrak KLO *D. trifoliata*.

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
128	2.1072	10	0	1	100.00
64	1.8062	11	0	1	100.00
32	1.5051	13	0	1	100.00
16	1.2041	15	0	1	100.00
8	0.9031	14	0	1	100.00
4	0.6021	15	2	46/51	90.20
2	0.3010	11	5	2/3	66.67
1	0.0000	9	9	13/27	48.15
Kawalan air		0	12	0	0.00
Kawalan DMSO		0	10	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Di mana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	0.00
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	0.30
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	48.15
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	66.67
Log LC ₅₀	=	0.030		
LC ₅₀	=	1.1		

Jadual 3.5 : Pengiraan LC₅₀ bagi ekstrak MET *D. trifoliata*.

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
128	2.1072	9	2	13/16	81.25
64	1.8062	6	4	19/31	61.29
32	1.5051	1	9	1/10	10.00
16	1.2041	0	10	1/32	3.13
8	0.9031	0	11	0	0.00
4	0.6021	0	11	0	0.00
2	0.3010	0	11	0	0.00
1	0.0000	0	10	0	0.00
Kawalan air		0	12	0	0.00
Kawalan DMSO		0	10	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Di mana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	1.51
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	1.81
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	10.00
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	61.29
Log LC ₅₀	=	1.740		
LC ₅₀	=	54.9		

3.4 PERBINCANGAN

Bakteria-bakteria patogen yang lain juga mempunyai kesan terhadap pertumbuhannya apabila dikenakan dengan bahan yang dapat merencat pertumbuhannya. Oleh itu dalam kajian ini, 13 bakteria patogen lain diuji. Ianya terdiri daripada *Salmonella* sp., *Enterobacter* E114, *E. coli* ATCC 25922, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Ps. stutzeri*, *E. coli*, *S. paratyphi* A, *P. vulgaris*, *S. dysenteriae*, *S. aureus*, *S. boydii*, dan *Ps. aeruginosa* dan *H. pylori* bertindak sebagai kawalan positif.

Berdasarkan kajian daripada Bab 2, *D. trifoliata* dipilih disebabkan nisbahnya yang paling tinggi berbanding dengan ekstrak-ekstrak tumbuhan yang lain. Oleh itu bahan yang dihasilkan seperti asid lemak dan asid amino daripada pengestrakan dengan PE didapati hanya dapat merencatkan dengan *Ps. aeruginosa* dan *V. cholerae* serta *H. pylori*. Akan tetapi ianya tidak memberi kesan kepada 11 pencilan bakteria patogen yang lain. Memang ada laporan yang menyatakan asid lemak yang diekstrak menggunakan PE dapat bertindak terhadap bakteria terutama asid lemak jenis Asid alfa-linolenik (Morel *et al.*, 2003).

Ekstrak KLO dan MET pula didapati merencat lebih banyak bakteria-bakteria patogen lain. Bakteria-bakteria yang dapat direncat oleh ekstrak KLO terdiri daripada *Ps. aeruginosa*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *Ps. stutzeri* dan *S. paratyphi* A. Manakala bagi ekstrak kasar MET pula, bakteria-bakteria yang dapat direncatkan ialah *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *Enterobacter* E114, *E. coli*, *E. coli* ATCC 25922 dan *Salmonella* sp.

Keputusan ujian pembauran cakera menunjukkan bahawa ekstrak PE, KLO dan MET *D. trifoliata* tidak bersifat spesifik terhadap *H. pylori*. Dalam satu kajian yang dilakukan keatas 39 spesies pelbagai tumbuhan tradisional Australia, 12 daripadanya didapati mempunyai aktiviti anti bakteria, dimana satu spesies sahaja yang memberi kesan kepada bakteria Gram -ve (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella typhimurium*), lima yang lain pula kepada bakteria Gram +ve (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes*), manakala enam yang lain adalah spesifik kepada *Bacillus cereus* (Palombo & Semple, 2001). Jika keadaan seperti ini berlaku, dimana ekstrak kasar *D. trifoliata* digunakan, ianya akan memberikan beberapa kesan sampingan terhadap flora normal. Ekstrak ini perlu dikaji seterusnya untuk mengambil kira aspek ketoksikan dan keselamatan sebelum boleh digunakan sebagai bahan anti *H. pylori*.

Salah satu kaedah mudah untuk menguji tahap ketoksikan ekstrak adalah melalui ujian ketoksikan terhadap *A. salina*. Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀) yang dilakukan bertujuan untuk menentukan kepekatan bahan yang dianggap bersifat toksik. Sekiranya nilai LC₅₀ mencapai atau melebihi 1000 µg/ml, maka ekstrak tersebut dianggap tidak mendatangkan sebarang kesan toksik dan penggunaannya dianggap sebagai baik serta diakui oleh Institut Kanser Kebangsaan USA (NCIUSA), dalam kajian mereka ke atas bahan anti kanser (Cragg *et al.*, 1994).

Nilai LC₅₀ kesemua ekstrak terhadap *A. salina* dalam kajian ini adalah kurang daripada 1000 µg/ml (LC₅₀ = 1.4 µg/ml untuk ekstrak PE; LC₅₀ = 1.1 µg/ml untuk ekstrak KLO dan LC₅₀ = 54.9 µg/ml untuk ekstrak MET) dan ini

mencadangkan yang kesemua ekstrak ini adalah toksik. Namun, ekstrak KLO aktif terhadap anti-*H. pylori* dan memandangkan ekstrak ini mengandungi alkaloid (Bab 4) yang diketahui juga bersifat anti-*H. pylori* maka ekstrak ini perlu dikaji seterusnya

3.5 KESIMPULAN.

Ekstrak kasar tumbuhan *D. trifoliata* tidak spesifik terhadap *H. pylori* kerana ianya juga merencat bakteria patogen yang lain. Tahap ketoksikan juga tinggi iaitu kurang daripada 1000 µg/ml, oleh itu ekstrak kasar tumbuhan *D. trifoliata* ini tidak sesuai bagi tujuan anti-*H. pylori*. Walaubagaimanapun ekstrak KLO didapati begitu aktif terhadap *H. pylori* dan dipilih untuk kajian selanjutnya.

4 UJIAN FITOKIMIA DAN PENGUMPULAN PELBAGAI FRAKSI EKSTRAK KLOOROFORM TUMBUHAN *DERRIS TRIFOLIATA*.

4.1 PENGENALAN AM

Ujian identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk mengkaji kehadiran sebatian yang terdapat pada ekstrak tumbuhan. Kaedah ini banyak dilakukan dalam kajian perubatan tradisional oleh Bahagian Farmasuetikal Kementerian Kesihatan Malaysia. Dengan melakukan ujian ini terhadap tumbuhan *Derris trifoliata* maka kita dapat mengenal pasti jenis kumpulan kimia yang terkandung di dalam ekstrak tumbuhan tersebut. Sebagai contoh, alkaloid, ia adalah sejenis bes kompleks yang dapat dipisahkan daripada ekstrak tumbuhan. Antara sebatian yang terkandung dan dapat dijadikan rujukan di dalam alkaloid ialah kokein, morfin, striknin dan kuinon. Begitu juga dengan flavonoid, sebagai contoh 2-fenil- α -benzopiron (Wagner & Bladt, 1996). Oleh itu kaedah ini merupakan kaedah awal untuk mengenalpasti tentang kandungan ekstrak tumbuhan *D. trifoliata* yang telah berjaya merencat bakteria terutamanya *H. pylori*.

Setelah kita mengetahui jenis kumpulan kimia di dalam ekstrak PE, KLO dan MET tumbuhan *D. trifoliata*, maka suatu kaedah perlu dilakukan untuk memisahkannya. Kaedah untuk memisahkan ekstrak tersebut mempunyai pelbagai cara contohnya kromatografi lapisan nipis, kromatografi turus, kromatografi gas, kromatografi cecair berprestasi tinggi dan lain-lain lagi. Cara yang sering digunakan dengan meluas adalah dengan kaedah kromatografi lapisan nipis dan kromatografi turus. Kaedah ini lebih mudah dan senang untuk

dilakukan tanpa melibatkan teknik-teknik yang canggih dan penggunaan tenaga yang banyak.

Kromatografi lapisan nipis digunakan untuk mendapatkan seberapa banyak fraksi yang boleh dipisahkan berdasarkan kepada gabungan pelarut yang terlibat. Gabungan pelarut yang digunakan biasanya dibuat dengan berpandukan kepada ujian kandungan kimia dan bahan yang dikehendaki. Gabungan yang memperolehi tompokan atau lapisan yang lebih banyak menunjukkan yang pemisahan ini adalah yang terbaik. Oleh itu ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* yang dipercahayai mengandungi alkaloid akan disisihkan dengan menggunakan teknik ini bagi mengetahui gabungan pelarut yang terbaik.

Selepas gabungan yang terbaik untuk pelarut yang boleh digunakan diperolehi, fraksi yang aktif untuk bertindak sebagai anti *H. pylori* perlu diuji. Bukan itu sahaja, ujian-ujian lain seperti ketoksikan, kepekatan perencatan minimum dan kadar hidup juga perlu dilakukan terhadap fraksi ini. Untuk itu, kuantiti fraksi atau lapisan yang terlibat mestilah mempunyai kuantiti yang mencukupi. Oleh itu, kromatografi turus pula digunakan untuk mengutip kuantiti fraksi secara berasingan. Kaedah ini digunakan berpandukan kepada gabungan pelarut yang telah diperolehi di dalam kaedah kromatografi lapisan nipis.

Objektif utama kajian di dalam bab ini adalah, pertama, untuk menentukan kandungan fitokimia dalam ketiga-tiga ekstrak *D. trifoliata* ; kedua, menyisihkan fraksi-fraksi dalam ekstrak yang mengandungi alkaloid serta menentukan fraksi yang merencat *H. pylori* ; ketiga untuk mengumpul fraksi yang dipilih dengan jumlah yang banyak melalui kaedah kromatografi turus agar ia mencukupi untuk kajian seterusnya.

4.2 BAHAN DAN KAEDAH

4.2.1 Ujian Identifikasi Kandungan Kimia

Di dalam penyediaan sampel untuk ujian kandungan kimia, pengekstrakan dilakukan seperti dalam Bab 2. Hasil daripada pengekstrakan dengan pelarut PE dikenali sebagai ekstrak A, manakala hasil daripada pengekstrakan KLO dikenali sebagai ekstrak B dan akhir sekali pelarut MET dikenali sebagai ekstrak C. Langkah seterusnya ialah menjalankan ujian-ujian biokimia bagi menentukan jenis kumpulan kimia yang terdapat di dalam ekstrak tersebut.

4.2.1.1 Penentuan Kehadiran Lemak Dan Asid Lemak

Sebanyak 10 ml ekstrak A disejatkan hingga kering dengan menggunakan kukusan air. Selepas itu, 10 ml larutan kalium hidroksida (0.5 M dalam etanol) ditambah dan direfluks selama 1 jam sehingga lapisan minyak tidak lagi kelihatan. Ia kemudiannya disejatkan di atas kukusan air. Sisa sejatan yang diperolehi dilarutkan dengan 20 ml air panas dan larutan dipindahkan ke corong pemisah. Bekas dibilas dengan air panas dan air bilasan dimasukkan ke corong pemisah yang sama, seterusnya dibiarkan sejuk. Kemudian, bekas dibilas pula dengan 10 ml eter dan bilasan eter dipindahkan ke corong pemisah yang sama dan digoncang. Ekstrak eter dikumpul dan pengekstrakan diulang sebanyak dua kali dengan 8 ml eter. Ekstrak eter disatukan (dikenali sebagai ekstrak D). Kepada larutan berair, asid hidroklorik (3 M) dititiskan sehingga pH berada antara 3-4. Jika larutan menjadi keruh, ia menunjukkan terdapat kehadiran lemak dan asid lemak yang disebabkan oleh pembebasan asid-asid lemak daripada garam-garamnya.

4.2.1.2 Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak D (10 ml) daripada eksperimen di atas disejatkan sehingga kering dengan menggunakan kukusan air. Baki sisa sejatan yang tinggal dilarutkan dalam 0.5 ml asetik anhidrida dan ditambah dengan 0.5 ml KLO. Larutan campuran ini dipindahkan kedalam satu tabung uji yang kering. sebanyak 1-2 ml asid sulfurik (2.5 M) dilelehkan pada dinding tabung uji dan pembentukkan satu cecincin berwarna merah perang atau ungu di antara dua lapisan dan warna bahagian atas menjadi hijau atau ungu (tindakbalas Liebermann-Burchard) menandakan kehadiran steroid dan triterpenoid.

4.2.1.3 Karotenoid

Ekstrak D (10 ml) disejatkan hingga kering dengan menggunakan kukusan air. Dua hingga tiga titis larutan tepu antimoni (III) klorida dalam KLO ditambah pada sisa sejatan. Pembentukan warna biru yang kemudiannya bertukar menjadi merah menunjukkan kehadiran karotenoid.

4.2.1.4 Alkaloid

Sebanyak 10 ml ekstrak B disejatkan dengan menggunakan kukusan air. Sisa sejatan yang terhasil dilarutkan dalam 1.5 ml asid hidroklorik (0.5 M) dan sebanyak 0.5 ml dipipetkan kedalam setiap satu tabung uji. Tabung uji I bertindak sebagai kawalan. Sebanyak 2 hingga 3 titis reagen Dragendorff ditambah ke dalam tabung uji II dan 2 hingga 3 titis reagen Mayer ditambah kedalam tabung uji III. Terbentuknya kekeruhan atau mendakan jingga keperangan pada tabung uji II dan mendapan putih pada tabung uji III menunjukkan kehadiran alkaloid

4.2.1.5 Terbitan Fenol.

4.2.1.5.1 Fenol

Ekstrak B (1 ml) disejatkan hingga kering dengan menggunakan kukusan air. Beberapa titis campuran larutan kalium heksasianoferat (III) dan ferum klorida (III) ditambah ke dalam sisa sejatan. Kehadiran fenol dapat dijelaskan dengan adanya mendakan biru hingga hitam yang terbentuk.

4.2.1.5.2 Fenil Propanoid

Ekstrak B (3 ml) disejatkan sehingga kering dengan menggunakan kukusan air. Sisa sejatan dilarutkan dengan air panas, dan dibiarkan sejuk. Larutan tersebut dibahagi kepada 2 tabung uji. Tabung uji I untuk kawalan, sementara 0.5 ml larutan ammonia cair ditambah kepada tabung uji II. Pembentukan warna biru atau hijau yang terang di bawah sinaran ultralembayung menunjukkan kehadiran koumarin atau terbitan-terbitannya.

4.2.1.5.3 Flavonoid

Ekstrak B (3ml) disejatkan hingga kering dengan menggunakan kukusan air. Sisa sejatan dilarutkan dalam 2 ml larut akues MET (50i/i) dengan bantuan pemanasan. Serbuk logam magnesium ditambahkan dan akhirnya 4 hingga 5 titis asid hidroklorik (2 M) dititiskan ke dalam larutan tersebut. Perubahan warna larutan menjadi warna merah atau jingga menunjukkan akan kehadiran bahan flavonoid.

4.2.1.5.4 Antrakuinon

Ekstrak B (3 ml) dipindahkan ke tabung uji. Sebanyak 1 ml larutan ammonia (13.5 M) atau larutan natrium hidroksida (2.5 M) ditambah dan kemudiannya dikacau. Larutan akan berubah menjadi merah jika terdapat kehadiran antrakuinon.

4.2.1.6 Garam-garam Alkaloid

Ekstrak C (20 ml) disejatkan hingga kering dengan menggunakan kukusan air. Sisa sejatan dilarutkan dengan 10 ml asid hidroklorik (3.0 M) sambil dipanaskan dan dikacau (dikenali sebagai larutan E). Kemudian 5 ml larutan E dibeskan dengan larutan ammonia cair sehingga pH menjadi 9. Kemudian diekstrak sebanyak tiga kali, setiap kali dengan 10 ml KLO dan dikeringkan. Sisa yang didapati dilarutkan dengan 1.5 ml asid hidroklorik (0.5 M) dan sebanyak 0.5 ml larutan yang diperolehi dipipetkan kedalam setiap satu tabung uji. Tabung uji I bertindak sebagai kawalan. Sebanyak 3 titis reagen Dragendorff dititis ke dalam tabung II dan 3 titis reagen Mayer kepada tabung uji III. Kekерuhan atau terdapatnya mendapan putih kekuningan pada tabung uji II dan mendapan jingga keperangan pada tabung uji III menunjukkan kehadiran alkaloid.

Manakala, 5 ml larutan E berikutnya ditambah dengan 0.5 g natrium klorida dan dikacau. Larutan dituras dengan kertas turas. Kertas turas dicuci dengan 3 ml larutan asid hidroklorik (0.5 M). Seterusnya, 1 ml larutan ditambah dengan reagen Mayer atau Dragendorff. Jika terbentuk mendapan yang berlebihan, larutan berasid dipindahkan ke corong pemisah. Larutan ammonia ditambah hingga pH menjadi 9. Kemudian KLO ditambah sehingga isipadu menjadi 2 kali ganda. Corong digoncang dan lapisan berkloroform dan akues dibiarkan terpisah. Lapisan akues diasidkan dengan larutan asid hidroklorik (3 M) sehingga pH menjadi 3. Larutan dituras dengan kertas turas. Turasan yang didapati seterusnya ditambahkan dengan reagen Mayer dan Dragendorff. Mendapan yang terbentuk menunjukkan kehadiran bes kuarternari atau amina teroksida.

4.2.1.7 Glikosida

Ekstrak C (20 ml) dicampurkan dengan 15 ml larutan asid hidroklorik (3 M). Campuran tersebut direfluks selama 30 minit dan dibiarkan sejuk. Larutan tersebut diekstrak sebanyak tiga kali, dan setiap kali dengan 12 ml eter. Lapisan bereter dikumpulkan dan digoncangkan dengan natrium sulfat kontang dan dituras. Ia dikenali sebagai larutan F. Daripada larutan F ini ujian-ujian seperti ujian kehadiran steroid dan triterpenoid (Bab 4.2.1.2), fenil propanoid (Bab 4.2.1.5.2), flavonoid (Bab 4.2.1.5.3) dan antrakuinon (Bab 4.2.1.5.4) dilakukan.

4.2.1.8 Tanin

Ekstrak C (1 ml) dicairkan dengan 2 ml air suling dan dititiskan dengan 3 titis larutan ferum (III) klorida. Warna larutan bertukar menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman. Warna biru kehitaman menunjukkan kehadiran tanin galat manakala hijau kehitaman menunjukkan kehadiran tanin katekol.

4.2.1.9 Karbohidrat

4.2.1.9.1 Karbohidrat

Ekstrak C (2 ml) disejatkan hingga kering. Sisa sejatan itu dititis dengan 3 titis asid sulfurik (2.5 M) dan biarkan selama 4 minit. Kemudian ditambahkan beberapa titis larutan tepu timol didalam etanol. Warna merah akan terbentuk bagi menunjukkan kehadiran karbohidrat..

4.2.1.9.2 Musilaj

Ekstrak C (2 ml) dititiskan ke dalam tabung uji yang berisi dengan 10 ml etanol. Mendakan yang terbentuk dipisahkan daripada larutan dengan cara mengempar. Mendakan yang terbentuk dicuci dengan etanol dan kemudian

dititiskan larutan biru metilena. Mendapan biru yang terbentuk adalah mengesahkan kehadiran musilaj.

4.2.2 Kaedah Kromatografi Lapisan Nipis

4.2.2.1 Keperluan eksperimen

Kebuk kromatografi digantikan dengan botol penutup biru yang berisipadu 250 ml. Picagari mikro (Merck, Jerman) 25 µl digunakan untuk penompokan ekstrak KLO *D. trifoliata*. Plat kromatografi gel silica 60 F (Merck, Jerman) dipotong pada ukuran 200 x 10 mm dengan ketebalan lapisan sebanyak 0.25 mm.

4.2.2.2 Keperluan Pelarut.

Pelarut adalah terdiri daripada toluena : etil asetat : dietilamina. Gabungan yang digunakan adalah seperti berikut 7:2:1, 7:3:0, 7:0:3 dan 7:1:2. (Wagner & Blat, 1996).

4.2.2.3 Teknik eksperimen yang dijalankan.

Botol tersebut dilapisi dengan sehelai kertas turas di bahagian dalamnya dan cecair fasa bergerak pelarut (gabungan pelarut) dituangkan kedalam botol tersebut sedalam 5 ke 10 mm. Botol tersebut ditutup dan dibiarkan selama 1 jam pada suhu bilik (27 ± 2 °C).

Dengan menggunakan picagari mikro, ekstrak KLO ditompokkan ke atas plat yang telah dipotong. Ianya diulang beberapa kali sehingga jumlah isipadu ekstrak berkenaan adalah sebanyak 20 µl. Penompokan dilakukan sedikit demi sedikit dengan mengeringkan bintik untuk selama lima minit selepas setiap tompokan. Plat dimasukkan ke dalam botol yang telah diisikan dengan gabungan pelarut, dan ia ditetapkan supaya berada dalam posisi menegak, dan

tompokan dipastikan berada di bahagian atas paras pelarut. Botol ditutup dan biarkan sehingga paras pelarut sampai kegarisan yang ditandakan. Plat dikeluarkan dan biarkan kering dalam botol yang berasingan.

4.2.2.4 Pemerhatian keputusan.

Plat dicerap untuk setiap gabungan pelarut yang ditetapkan dengan menggunakan lampu ultralembayung mudah alih pada jarak gelombang panjang (315nm). Tandakan kawasan yang diperlukan ditandakan. Bagi memastikan bahan tersebut adalah alkaloid, reagen Dragendorff disemur pada plat berkenaan.

4.2.3 Kaedah kromatografi turus

Gel silika (40g) direndam didalam gabungan 7:2:1 pelarut yang terdiri daripada toluena : etil asetat: dietilamina dan di masukkan ke dalam turus kaca. Batang rod kaca digunakan untuk mengetuk turus bagi memampatkan lagi gel silica tersebut. Malah ianya dibiarkan semalaman untuk gel silica menjadi mampat.. Sebanyak 2 ml ekstrak KLO *D. trifoliata* dimasukkan perlahan-lahan dengan menggunakan pipet. Turus dibuka dan dibiarkan mengalir pelarut di dalamnya. Pelarut ditambah sehingga setiap fraksi ekstrak dapat dikumpulkan.

Dengan menggunakan lampu ultralembayung mudah alih jarak gelombang panjang (315nm). Pergerakan fraksi dapat dilihat dan dikawal bagi mengutipnya dengan botol mengutip. Setiap pecahan akan dikutip secara berasingan dan dikeringkan didalam oven pada suhu 60⁰C. Berat untuk setiap fraksi diambil untuk ujian selanjutnya.

4.3 **KEPUTUSAN**

4.3.1 Kandungan Kimia Ekstrak Kasar *D. trifoliata*.

Lemak dan asid lemak didapati hadir dalam ekstrak kasar PE tumbuhan *D. trifoliata*. Di samping itu, steroid dan triterpenoid juga terdapat di dalam ekstrak ini. Walaubagaimanapun ekstrak kasar ini tidak menunjukkan kehadiran karotenoid.

Di dalam ekstrak kasar KLO, kehadiran alkaloid dapat dikesan dengan keputusan yang positif pada ujiannya di mana terhasilnya mendakan jingga apabila Reagen Dragendorff ditambahkan, dan kekeruhan kekuningan terhasil apabila mendakan Reagen Mayer ditambahkan. Kehadiran fenol dan flavonoid dapat dikesan, manakala fenil propanoid dan antrakuinon tidak menunjukkan kehadirannya.

Garam-garam alkaloid pula diuji dalam ekstrak kasar MET dan menunjukkan kehadirannya. Di dalam ujian Glikosida, kesemua bahan seperti steroid dan triterpenoid, fenil propanoid dan flavonoid kecuali antrakuinon hadir. Akan tetapi di dalam ujian tanin, kehadiran bahan tersebut tidak dapat dikesan. Manakala dalam ujian karbohidrat, hanya musilaj sahaja yang didapati hadir dalam ujiannya. Secara ringkasnya keputusan ini ditunjukkan pada Jadual 4.1.

Jadual 4.1 : Kandungan kimia ekstrak kasar *D. trifoliata*.

Pelarut	Ujian	Pemerhatian	Keputusan
PE	Kehadiran Lemak dan Asid Lemak	- Larutan menjadi keruh	Hadir.
	Steroid & Triterpenoid	- Pembentukan cincin berwarna perang	Hadir.
	Karotenoid	- Tiada perubahan	Tidak hadir.
KLO (Cl)	Alkaloid i. Kawalan ii. Reagen Dragendorff iii. Reagen Mayer	- Mendakan putih. - Mendakan jingga terhasil - Kekeruhan kekuningan pada mendakan	Hadir. Hadir.
	Terbitan Fenol. i. Fenol-fenol ii. Fenil Propanoid iii. Flavonoid iv. Antrakuinon	- Mendakan biru kehitaman. - Tiada perubahan. - Kekeruhan & gelembung udara. - Tiada perubahan.	Hadir. Tidak hadir. Hadir. Tidak hadir.
MET (MET)	Garam-garam Alkaloid i. Kawalan ii. Reagen Dragendorff iii. Reagen Mayer	- Mendakan putih. - Mendakan jingga terhasil - Kekeruhan kekuningan pada mendakan	Hadir. Hadir.
	Glikosida i. Steroid & Triterpenoid ii. Fenil Propanoid	- Pembentukan cincin berwarna perang - Warna biru di bawah cahaya ultralembayung	Hadir. Hadir.
	iii. Flavonoid iv. Antrakuinon	- Kekeruhan & gelembung udara. - Tiada perubahan.	Hadir. Tidak hadir.
	Tanin	- Warna hijau kehitaman terbentuk	Tidak hadir.
	Karbohidrat i. Karbohidrat ii. Musilaj	- Tiada perubahan. - Mendakan biru terbentuk.	Tidak hadir. Hadir.

4.3.2 Kromatografi Lapisan Nipis

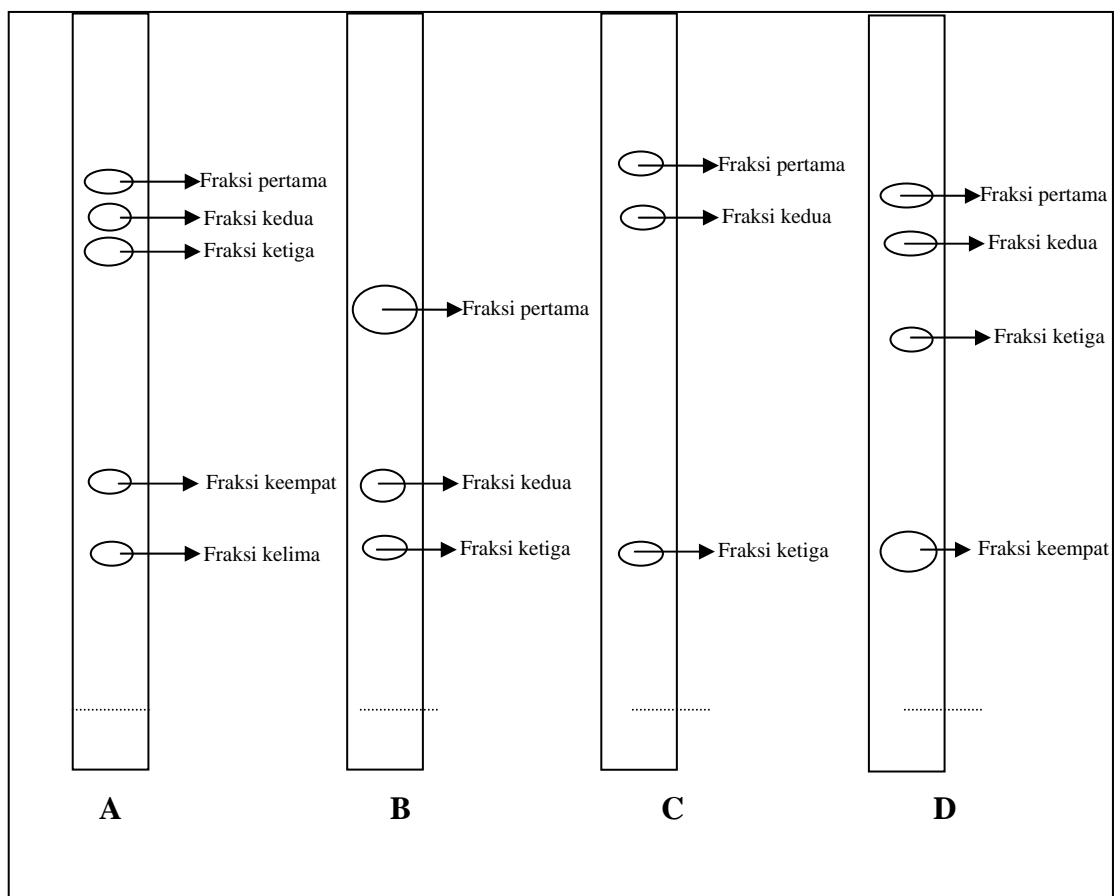
Gabungan pelarut 7:2:1 (toluena : etil asetat: dietilamina) memberikan 5 fraksi. Fraksi-fraksi ini memberikan warna yang berlainan antara satu sama lain apabila dikenakan cahaya ultralembayung padanya. Fraksi yang pertama memberikan warna merah kemerahan, diikuti dengan warna biru pendarflour pada fraksi yang kedua. Fraksi yang ketiga pula memberikan warna hijau keputihan pendarflour dan fraksi yang keempat memberikan warna perang, sementara fraksinasi yang terakhir memberikan warna perang kehitaman. Hal ini digambarkan pada strip A (Rajah 4.1). Warna perang atau merah keperangan yang ditunjukkan apabila disemur dengan reagen Dragendorff pada fraksi kedua, ketiga dan yang terakhir.

Terdapat tiga fraksi sahaja bagi gabungan pelarut 7:0:3 dan 7:3:0 pada strip B dan C (Rajah 4.1). Pada strip B, fraksi pertama memberikan warna perang-kemerahan, diikuti dengan warna hijau keputihan dan akhir sekali warna perang. Pada strip C pula, fraksi yang pertama memberikan warna perang-kemerahan, fraksi kedua warna biru kehijauan dan warna perang pada fraksi terakhir. Semburan reagen Dragendorff juga menunjukkan hanya fraksi kedua dan fraksi ketiga bagi kedua-dua strip ini memberikan warna perang.

Strip D dengan gabungan pelarut 7:1:2 memberikan 4 fraksi. Fraksi yang pertama memberikan warna merah kemerahan, diikuti dengan warna biru pendarflour pada fraksi yang kedua. Fraksi yang ketiga memberikan warna hijau keputihan dan fraksi yang keempat memberikan warna perang kehitaman. Kesemua ini ditunjukkan dalam strip D (Gambarajah 4.1). Hanya fraksi pertama sahaja yang tidak memberikan warna perang apabila disemur dengan reagen Dragendorff, manakala pada fraksi keempat warna perang agak begitu terang.

4.3.3 Turus Kromatografi

Dengan menggunakan gabungan pelarut 7:2:1, setiap fraksi telah dikutip secara berasingan. Untuk setiap 1 ml ekstrak kasar kloroform, ia akan menghasilkan 0.00864 g fraksi 1 (F1), 0.00192 g fraksi 2 (F2), 0.00092 g fraksi 3 (F3), 0.0127 g fraksi 4 (F4) dan 0.0143 g fraksi 5 (F5).



Rajah 4.1 : Gabungan pelarut toluena, etil asetat dan dietilamina; A=7:2:1,

B=7:3:0, C=7:0:3 dan D=7:1:2 untuk pemisahan ekstrak KLO.

4.4 PERBINCANGAN

Daripada kajian yang dijalankan didapati tumbuhan *D. trifoliata* mengandungi bahan-bahan seperti lemak dan asid lemak, steroid dan triterpenoid, alkaloid, fenol dan flavonoid. Di samping itu garam-garam alkaloid dan musilaj juga dapat dikesan di dalam ekstrak batang tumbuhan ini. Ini seiringan dengan kajian oleh Institut Penyelidikan Perhutanan Malaysia (FRIM) yang menyatakan *D. trifoliata* mengandungi flavonoid, lipid dan tanin. Pihak FRIM juga ada membuat kajian akan kebolehan tumbuhan ini sebagai peransang, pelawas, rawatan lumpuh, sakit urat, demam, sakit angin dan bengkak sendi. (<http://www.frim.gov.my/cfdocs2/medicplant/index.cfm>)

Terdapat beberapa sebatian asas yang telah dikaji dan dikenal pasti bertindak sebagai anti *H. pylori*, flavonoid daripada tumbuhan perubatan tradisional di Jepun iaitu *Glycyrrhiza glabra*, *G. inflata* dan *G. uralensis* (Fukai *et al.*, 2002). Kumpulan alkaloid juga didapati banyak memberikan kesan anti *H. pylori*, misalnya alkil metil kuinolon daripada ekstrak herba perubatan Cina (Gosyuyu) yang didapati daripada buah pokok *Evodia rutaecarpa* (Hamasaki, *et al.*, 2000; Tominaga *et al.*, 2002) dan isokuinolon daripada tumbuhan *Sanguinaria* dan *Hydrastis* (Mahady *et al.*, 2003). Oleh itu, satu kaedah yang sesuai perlu diperolehi untuk mendapatkan alkaloid anti-*H. pylori* secara individu atau dalam bentuk fraksi daripada ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata*.

Pengasingan bahan-bahan yang terdapat di dalam ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* ini dilakukan dengan menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis. Pemilihannya adalah berdasarkan akan kehadiran alkaloid di dalam ujian kandungan kimia. Kaedah ini dipilih adalah berdasarkan kepada

kosnya yang rendah, tidak melibatkan penggunaan teknik-teknik yang canggih serta penggunaan tenaga yang paling minimum. Hasil yang ditunjukkan dalam kajian ini mempunyai ciri-ciri yang agak sama tetapi pengasingan pada gabungan nisbah pelarut yang berlainan akan memberikan jumlah fraksi-fraksi yang berbeza. Dengan kehadiran etil asetat dan dietilamina pada gabungan yang sesuai menjadikan pecahan fraksi yang paling banyak berbanding dengan ketiadaan etil asetat atau ketiadaan dietilamina. Jika gabungan diterbalikkan dengan nisbah dietilamina ditingkatkan berbanding dengan etil asetat, jumlah fraksi yang dihasilkan adalah empat. Keadaan fraksi yang terlibat adalah sama dengan gabungan yang pertama iaitu 7:2:1 tetapi fraksi yang keempat sahaja yang tidak dapat dikeluarkan kerana warna perang kehitaman sahaja yang keluar pada peringkat akhir gabungan 7:1:2.

Berdasarkan kepada hal ini, kita dapat lihat pengaruh jenis pelarut dan nisbahnya memainkan peranan penting dalam fraksi ekstrak KLO batang *D. trifoliata*. Berdasarkan kepada kepolaran, toluena merupakan bahan paling kurang polar diikuti dengan etil asetat. Manakala dietilamina pula merupakan bahan yang polar. Oleh itu tarikan terhadap bahan-bahan yang kurang polar kepada yang polar menjadikan ekstrak kasar *D. trifoliata* itu berpecah mengikut kepolaran masing-masing.

Walaupun bagaimanapun kajian ini menjurus kepada kebolehan fraksi-fraksi ini untuk bertindak sebagai anti-*H. pylori*. Oleh itu kuantiti fraksi yang diperlukan mestilah mencukupi bagi menjalankan eksperimen yang berikutnya. Oleh itu kromatografi turus dijalankan untuk mendapatkan fraksi-fraksi yang terlibat. Gabungan pelarut yang dipilih dalam turus kromatografi adalah 7:2:1 (toluena : etil asetat : dietilamina). Ianya berdasarkan pada kebolehan gabungan

ini untuk menghasilkan fraksi yang paling banyak berbanding dengan gabungan yang lain.

Terdapat sedikit perbezaan dan segi warna yang dihasilkan ketika cahaya ultralembayung dikenakan ke atas turus ini. Fraksi yang pertama menghasilkan warna jingga kemerahan diikuti dengan warna biru kehijauan pendarflour pada fraksi kedua. Fraksi yang ketiga pula memberikan warna hijau keputihan pendarflour. Manakala, fraksi yang keempat pula memberikan warna perang. Akhir sekali fraksi yang kelima memberikan warna hijau pendarflour. Fraksi yang kelima amat susah untuk dikeluarkan, dan dengan itu pelarut yang lebih polar digunakan iaitu MET bagi membantu pengeluaran bahan tersebut daripada turus.

Di antara fraksi yang terlibat, fraksi yang kedua, ketiga dan terakhir dipercayai alkaloid memandangkan ia memberi warna biru atau biru kehijauan pendarflour di bawah cahaya ultralembayung dan warna perang apabila disemur dengan reagen Dragendorff. Dicadangkan fraksi yang pertama adalah klorofil memandangkan warna merah dan jingga yang dihasilkan di bawah cahaya ultralembayung. Manakala, fraksi ke empat didapati tidak memberikan sebarang cahaya pendarflour dan keadaan ini, menjadikannya bukan terdiri daripada alkaloid. Kedua dua fraksi ini juga tidak memberikan sebarang warna apabila disemur dengan reagen Dragendorff.

Hasil yang diperolehi daripada kegiatan mengumpulkan fraksi yang terbabit menunjukkan kandungan fraksi-fraksi yang terlibat adalah berbeza sama sekali. Berat fraksi yang paling banyak sekali adalah fraksi yang terakhir diikuti dengan fraksi yang keempat. Fraksi yang ketiga pula adalah paling sedikit diikuti dengan fraksi kedua dan pertama.

4.5 KESIMPULAN.

Ekstrak PE tumbuhan *D. trifoliata* mengandung lemak dan asid lemak, steroid dan triterpenoid. Ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* pula mengandung alkaloid, fenol dan flavonoid, sementara itu pula ekstrak MET tumbuhan *D. trifoliata* mengandung garam-garam alkaloid dan musilaj. Oleh kerana alkaloid merupakan suatu bahan yang boleh bertindak sebagai anti-*H. pylori*, maka ekstrak kasar KLO yang mengandung sebatian ini telah disisihkan dengan kaedah kromatografi lapisan nipis. Dengan gabungan pelarut toluena : etil asetat : dietilamina (7:2:1) yang terbaik yang mana dapat menyisihkan fraksi yang terbanyak, telah digunakan dalam kromatografi turus. Penghasilan fraksi yang berwarna hijau atau biru kehijauan pendarflour di bawah cahaya ultralembayung dan warna perang apabila disemur dengan reagen Dragendorff menjadikan ianya lebih kuat untuk dikatakan bahawa fraksi tersebut adalah alkaloid. Oleh itu, lima fraksi yang diperolehi, perlu diuji akan sifat anti-*H.pylori* untuk menentukan fraksi yang terbaik pada kajian yang selanjutnya.

5 PEMILIHAN FRAKSI YANG SELEKTIF TERHADAP *H. PYLORI* DAN PENENTUAN KETOKSIKANNYA.

5.1 PENGENALAN

Penggunaan ekstrak kasar kloroform tumbuhan *Derris trifoliata* secara terus adalah tidak sesuai kerana sifat ketoksikan yang ditunjukkan sangat tinggi. Oleh itu dengan menggunakan kaedah pemisahan seperti yang dilakukan dalam bab 4 sebelum ini, maka dapat dilihat beberapa fraksi telah diperolehi. Hal ini biasa dan telah banyak telah dilakukan terutamanya di negara Jepun. Sebagai contohnya Derrisin, sejenis rotenoid yang disisihkan daripada ekstrak *Derris malaccensis* bertindak sebagai anti-*H. pylori*. (Takashima *et al.*, 2002).

Kajian yang dilakukan ini akan memberi maksud atau maklumat tentang kebolehan fraksi yang telah diasing. Terdapat 5 fraksi yang telah berjaya diasingkan dengan penggunaan kolum kromatografi seperti yang telah dilakukan dalam Bab sebelum ini. Fraksi-fraksi ini di labelkan sebagai F1, F2, F3, F4 dan F5. Kesemua fraksi tersebut mempunyai ciri-ciri tertentu apabila di lihat di bawah cahaya ultralembayung, walaupun ianya bukan ekstrak yang benar-benar tulen. Kos dan masa untuk mendapatkan ekstrak yang benar-benar tulen adalah amat tinggi. Ini kerana lebih banyak sampel tumbuhan diperlukan, penyisihan hendaklah dilakukan dengan menggunakan lebih daripada satu sistem pelarut dan ekstrak tumbuhan kaya dengan klorofil yang mengganggu proses penulenan. Maka, sisihan komponen yang diperolehi dalam kajian ini

hanyalah peringkat awal sisihan sahaja dengan menggunakan satu sistem pelarut.

Dengan itu, satu kajian penyaringan terhadap lain-lain bakteria patogen untuk memberikan maklumat tentang keupayaan spesifik fraksi - fraksi yang terlibat terhadap bakteria *H. pylori*. Hal ini penting untuk kita memilih fraksi yang seboleh-bolehnya hanya spesifik kepada perencatan *H. pylori* sahaja.

Kebolehan fraksi - fraksi yang berpotensi terhadap kegiatan anti *H. pylori* menjadi tidak begitu berkesan jika ia mempunyai kadar ketoksikan yang tinggi. Oleh itu ujian ketoksikan perlu dijalankan bagi tujuan mengetahui akan tahap ketoksikan fraksi yang terlibat. Hal ini penting, kerana ianya dapat membezakan kebolehpupayaan sesuatu fraksi merencat pertumbuhan atau membunuh *H. pylori* adalah bukan disebabkan oleh ketoksikan tetapi ianya mestilah disebabkan oleh kandungan fraksi itu sendiri yang bersifat anti *H. pylori*. Jika fraksi dalam kajian ini mempunyai tahap ketoksikan yang tinggi, maka ianya tidak sesuai untuk digunakan kerana ianya mungkin boleh menjejaskan atau memberi kesan sampingan kepada penggunaannya.

Pelbagai kajian dijalankan untuk menguji ketoksikan sesuatu bahan sampel ekstrak atau fraksi. Kajian yang sering dilakukan adalah menggunakan anak udang brin, *A. salina* sebagai petunjuk kandungan toksik. Battinelli *et al.*, (2001) menggunakan kaedah ini dalam menguji ketoksikan ekstrak *Epilobium*. Ianya telah mula diperkenalkan oleh Micheal dan rakan-rakan pada tahun 1956 dan diperkembangkan oleh Vanhaecke dan rakan-rakan pada tahun 1981 dan ditambahbaikkkan pada 1983 oleh Sleet dan Brendel (Carballo *et al.*, 2002). Kos kajian ini murah dan senang untuk dikendalikan kerana ianya tidak melibatkan penggunaan teknoLogi yang tinggi. Walaupun menggunakan air laut untuk

membiak *A. salina*, ianya boleh disediakan dengan tiga cara alternatif iaitu mengambil air laut yang asli dan mengautoklaf atau menapis dengan menggunakan penuras yang bersaiz liang kecil ($0.2 \mu\text{m}$), kedua dengan menyediakan air laut dengan garam khas dan akhir sekali air laut tiruan boleh disediakan dengan campuran bahan-bahan kimia mengikut sukatan yang telah ditentukan.

Objektif kajian dalam bab ini ialah untuk melakukan penyaringan untuk mengecam fraksi yang merencat *H. pylori*. Kebolehan fraksi yang terlibat dinilai dengan jarak perencatan yang diberikan oleh setiap fraksi terhadap pertumbuhan *H. pylori*. Fraksi yang berjaya memberikan keputusan yang baik akan dipilih untuk kajian berikutnya.

5.2 **BAHAN DAN KAEDAH**

Bahan dan kaedah yang sama digunakan dalam Bab tiga dengan perbezaan sampel yang digunakan. Dalam Bab ini sampel yang digunakan adalah daripada eksperimen sebelum ini Bab 4, sampel-sampel di klasifikasikan dengan fraksi satu (F1), fraksi dua (F2), fraksi tiga (F3), fraksi empat (F4) dan fraksi lima (F5) mengikut yang mana keluar dahulu. Kepekatan yang digunakan adalah 0.0046 g/ml. Untuk kajian lain-lain bakteria patogen dan ujian ketoksikan hanya F1, F2 dan F3 sahaja digunakan dengan kepekatan 0.0046 g/ml.

5.3 KEPUTUSAN

5.3.1 Diameter Perencatan Pertumbuhan *H. pylori*

Fraksi F1 dan F2 memberikan diameter perencatan sebanyak 42 ± 1.00 mm manakala F3 memberikan diameter 35 ± 1.00 mm (Jadual 5.1 dan Plat 5.1a). F4 dan F5 masing-masing memberikan bacaan diameter 17 ± 1.00 mm dan 17.16 ± 1.07 mm sahaja berbanding dengan ekstrak KLO yang memberikan bacaan diameter sebanyak 41 ± 1.00 mm (Jadual 5.2 dan Plat 5.1b). Kawalan iaitu H₂O dan DMSO tidak menunjukkan sebarang kesan perencatan.

Jadual 5.1 : Diameter perencatan pertumbuhan *H. pylori* yang ditunjuk oleh Plat 5.1a.

Sampel	F1	F2	F3	H ₂ O	DMSO
*Diameter (mm)	42 ± 1.00	42 ± 1.00	35 ± 1.00	T.Z.	T.Z.

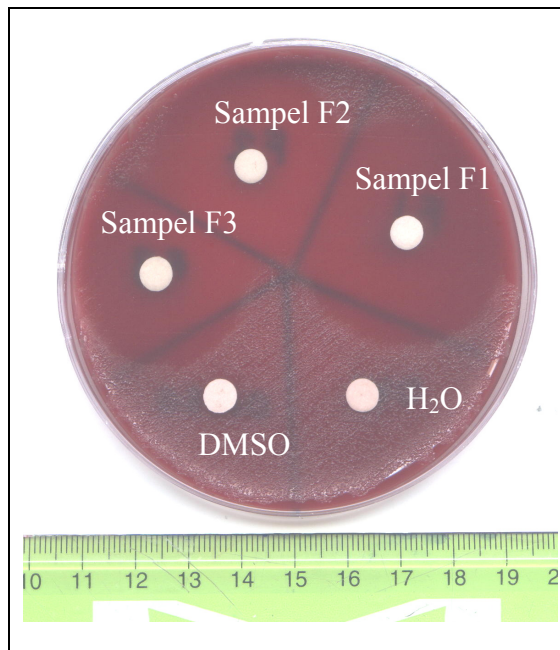
Jadual 5.2 : Diameter perencatan pertumbuhan *H. pylori* yang ditunjuk oleh Plat 5.1b.

Sampel	F4	F5	KLO	H ₂ O	DMSO
*Diameter (mm)	17 ± 1.00	7.2 ± 1.04	41 ± 1.00	T.Z.	T.Z.

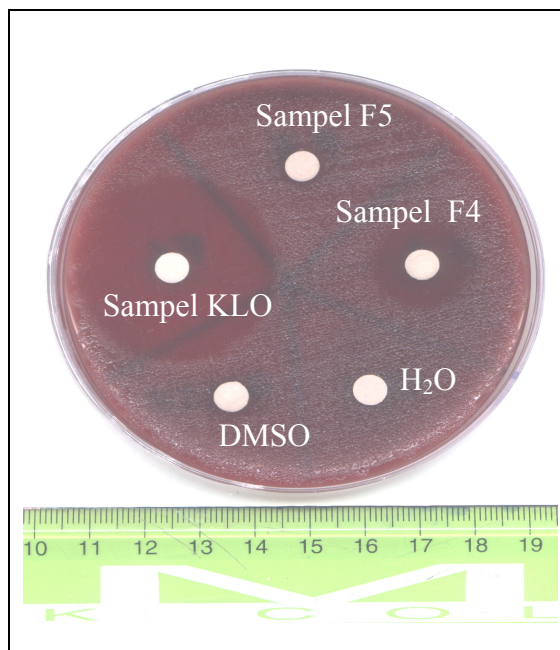
Kekunci Jadual:

* purata tiga bacaan

TZ : tiada zon perencatan



(a) Fraksi F1, F2 , F3 dan kawalan DMSO dan H₂O



(b) Fraksi F4, F5, KLO dan kawalan DMSO dan H₂O

Plat 5.1 : Kesan lima fraksi F1, F2, F3, F4, F5 dan ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* terhadap *H. pylori* dengan ujian pembauran cakera.

5.3.2 Diameter Perencatan Pertumbuhan Bakteria Patogen lain.

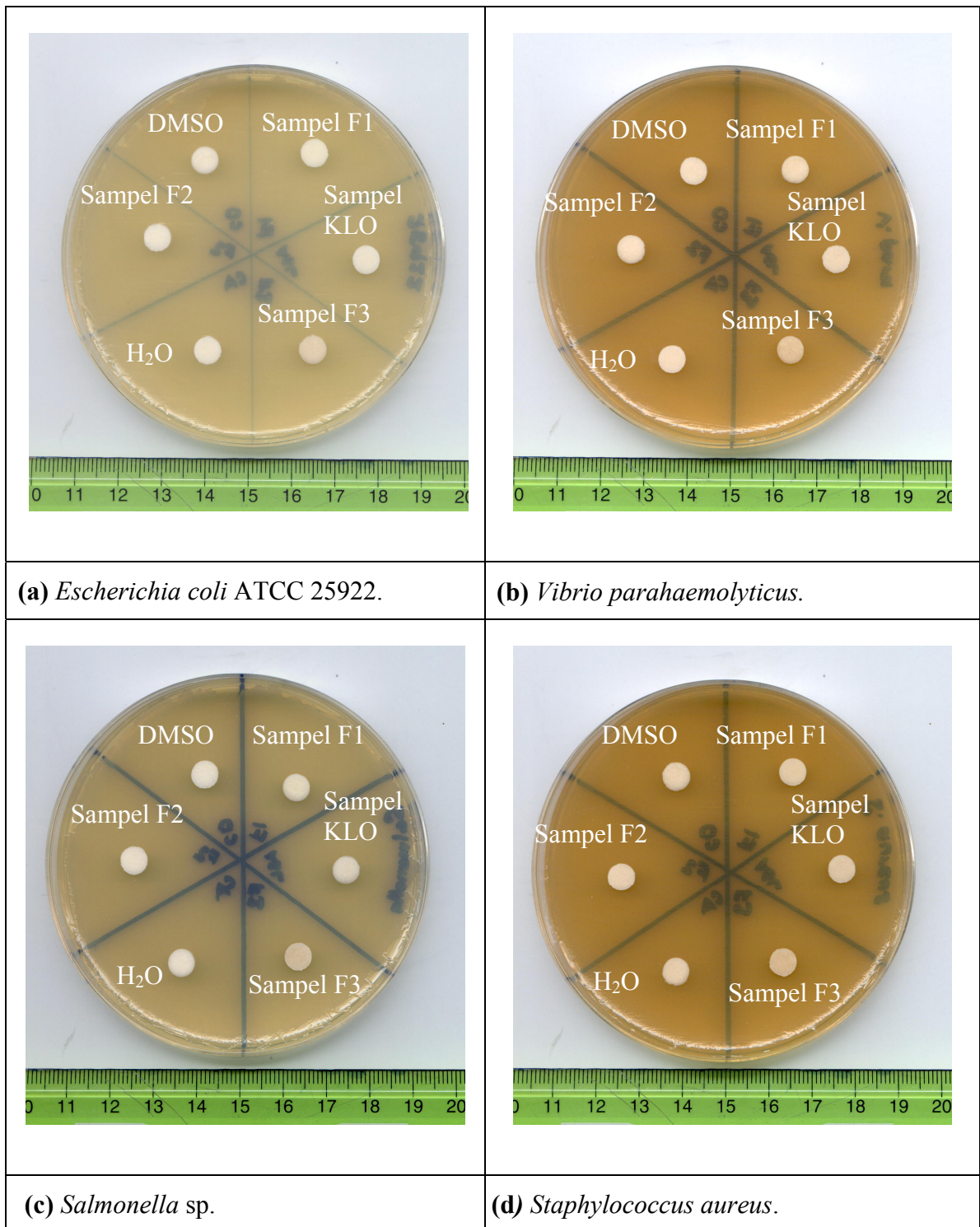
Jadual 5.3 menunjukkan bahawa F1 dan F2 tidak memberikan sebarang kesan perencatan kepada semua jenis bakteria-bakteria patogen yang telah diuji kecuali kepada bakteria *H. pylori* sahaja (kawalan positif). Akan tetapi fraksi F3 dan ekstrak kasar KLO batang *D. trifoliata* memberikan kesan terhadap perencatan pertumbuhan tujuh spesies bakteria patogen dan juga *H. pylori*. Bakteria-bakteria yang terbabat adalah *V. parahaemolyticus* 7.00 ± 0.10 mm (Plat 5.2b), *V. cholerae* 7.00 ± 0.10 mm (Plat 5.2f), *S. paratyphi* A 7.00 ± 0.10 mm (Plat 5.2g), *S. boydii* 7.00 ± 0.10 mm (Plat 5.2h), *S. dysenteriae* 9.00 ± 0.63 mm pada F3 dan 10.17 ± 0.75 mm pada ekstrak KLO (Plat 5.2i), *Ps. aeruginosa* 12.17 ± 1.17 mm pada F3 dan 12.5 ± 1.87 mm pada ekstrak KLO (Plat 5.2k) dan akhir sekali *Ps. slutzeri* 7.00 ± 0.00 mm (Plat 5.2l). Nilai-nilai diameter perencatan pada *H. pylori* pula menunjukkan ekstrak KLO memberikan nilai diameter perencatan terbesar (41.00 ± 1.10 mm), diikuti oleh F2 (40.00 ± 1.79 mm), serta F1 (38.00 ± 1.79 mm) dan F3 (32.33 ± 0.82 mm). Keputusan ini diringkaskan dalam Jadual 5.3 dan digambarkan pada Plat 5.2n.

Jadual 5.3 :Diameter perencatan pertumbuhan 13 bakteria patogen dan *H. pylori* oleh tiga fraksi dan ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata*.

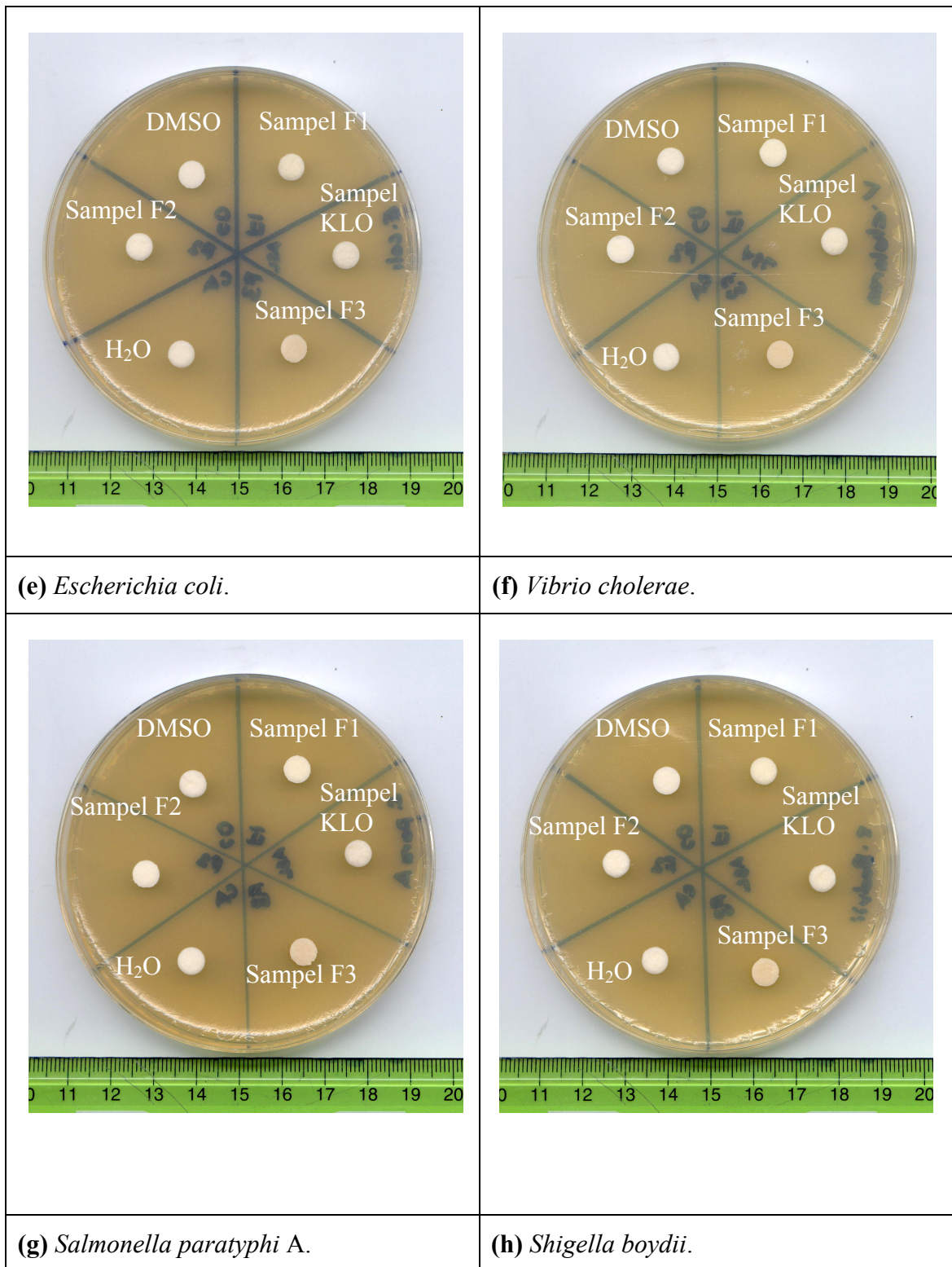
Kultur Bakteria	F1 (mm)	F2 (mm)	F3 (mm)	KLO (mm)	Kawalan (mm)	
					DMSO	H ₂ O
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TZ	TZ	7.00 ± 0.10	7.00 ± 0.10	TZ	TZ
<i>Salmonella</i> sp.	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Escherichia coli</i>	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Vibrio cholerae</i>	TZ	TZ	7.00 ± 0.10	7.00 ± 0.10	TZ	TZ
<i>Salmonella para typhi</i> A	TZ	TZ	7.00 ± 0.10	7.00 ± 0.10	TZ	TZ
<i>Shigella boydii</i>	TZ	TZ	7.00 ± 0.10	7.00 ± 0.10	TZ	TZ
<i>Shigella dysenteriae</i>	TZ	TZ	9.00 ± 0.63	10.17 ± 0.75	TZ	TZ
<i>Proteus vulgaris</i>	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TZ	TZ	12.17 ± 1.17	12.50 ± 1.87	TZ	TZ
<i>Pseudomonas slutzeri</i>	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Enterobacter</i> sp.	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ	TZ
<i>Helicobacter pylori</i>	38.00 ± 1.79	40.00 ± 1.79	32.33 ± 0.82	41.00 ± 1.10	TZ	TZ

Kekunci Jadual

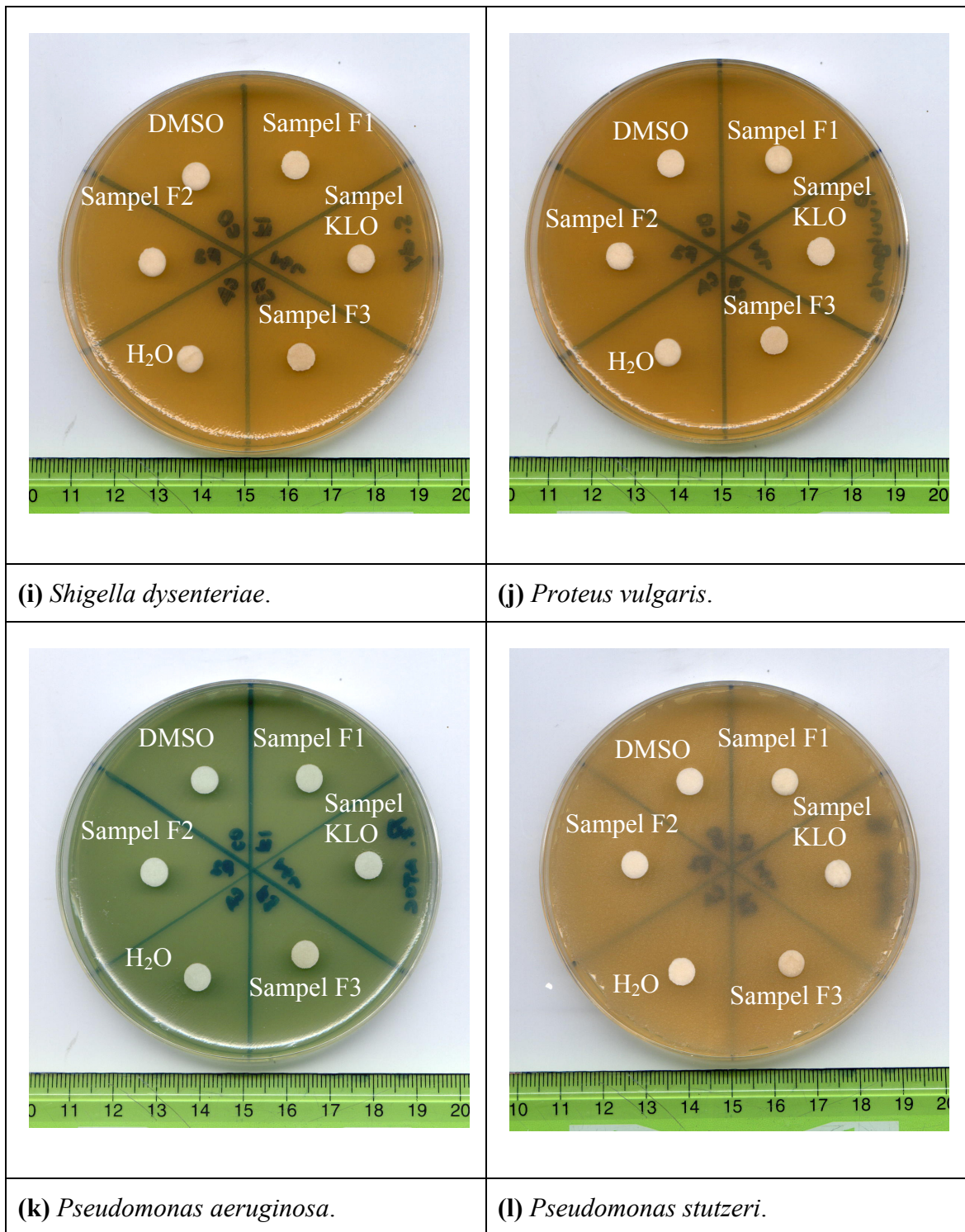
TZ : tiada zon perencatan



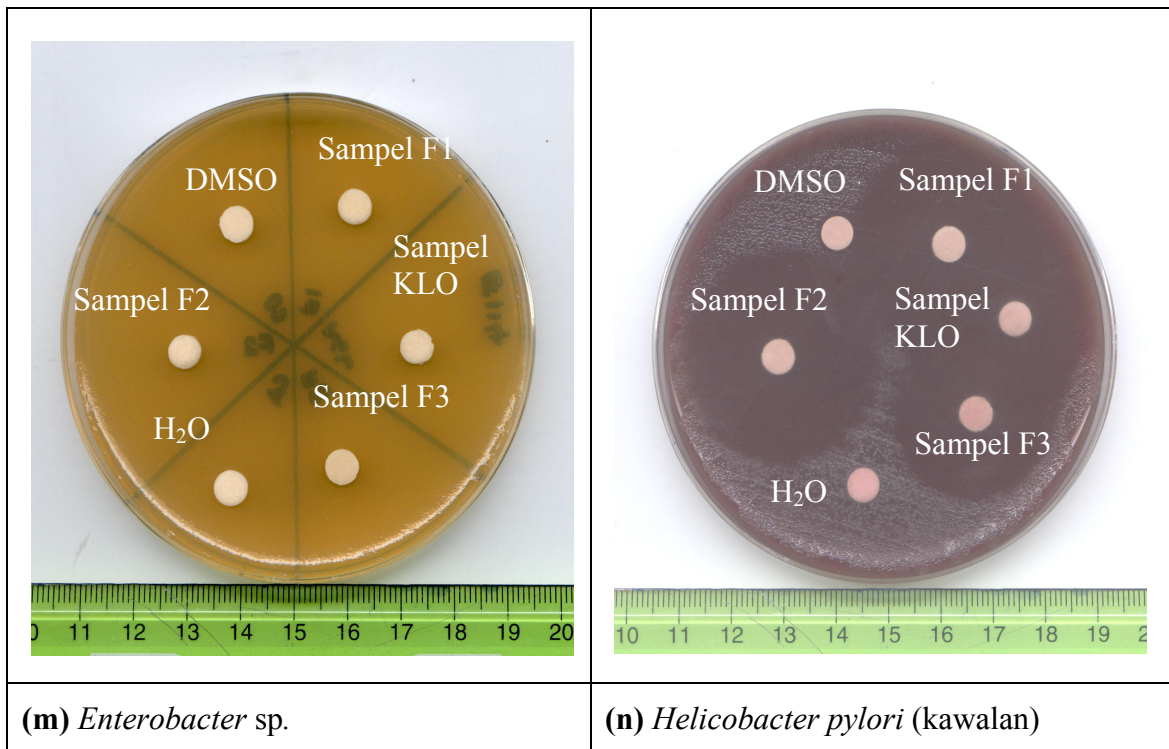
Plat 5.2 : Kesan tiga fraksi F1, F2, F3, dan ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata* terhadap patogen lain dan *H. pylori* (kawalan) dengan ujian pembauran cakera.



Plat 5.2 : sambungan



Plat 5.2 : sambungan



Plat 5.2 : sambungan

5.3.3 Tahap Ketoksikan Ekstrak

Ujian ketoksikan telah dijalankan dengan cara triplikat terhadap empat jenis sampel iaitu F1, F2, F3 dan ekstrak KLO dengan DMSO dan air suling steril sebagai kawalan. Bilangan mati, bilangan hidup dan jumlah *A. salina* diambil kira secara purata. Hasil ujian menunjukkan bahawa F1 memberikan nilai LC_{50} sebanyak 8.8 $\mu\text{g/ml}$ (Jadual 5.4). F2 pula memberikan nilai LC_{50} ialah 966.5 $\mu\text{g/ml}$ (Jadual 5.5) . Manakala F3 pula memberikan nilai LC_{50} untuk adalah 60.4 $\mu\text{g/ml}$ (Jadual 5.6). Akhir sekali ekstrak KLO memberikan nilai LC_{50} sebanyak 1.1 $\mu\text{g/ml}$ (Jadual 5.3.7).

Jadual 5.4 : Pengiraan LC₅₀ bagi F1

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
128	2.1072	15	0	1	100.00
64	1.8062	12	0	1	100.00
32	1.5051	13	0	1	100.00
16	1.2041	13	3	38/47	80.85
8	0.9031	5	6	5/11	45.45
4	0.6021	4	10	11/40	27.50
2	0.3010	0	12	0	0.00
1	0.0000	0	12	0	0.00
Kawalan air		0	13	0	0.00
Kawalan DMSO		0	12	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Dimana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	0.90
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	1.20
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	45.45
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	80.85
Log LC ₅₀	=	0.942		
LC ₅₀	=	8.8		µg/ml

Jadual 5.5 : Pengiraan LC₅₀ bagi F2

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
2048	3.3113	10	7	3/5	60.00
1024	3.0103	10	9	29/55	52.73
512	2.7093	3	12	1/5	20.00
256	2.4082	2	11	3/20	15.00
128	2.1072	15	10	1/16	6.25
64	1.8062	12	15	0	0.00
32	1.5051	13	15	0	0.00
16	1.2041	13	16	0	0.00
8	0.9031	5	15	0	0.00
4	0.6021	4	17	0	0.00
2	0.3010	0	14	0	0.00
1	0.0000	0	16	0	0.00
Kawalan air		0	15	0	0.00
Kawalan DMSO		0	16	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Dimana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	2.7093
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	3.0103
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	20.00
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	52.73
Log LC ₅₀	=	2.985		
LC ₅₀	=	966.5	µg/ml	

Jadual 5.6 : Pengiraan LC₅₀ bagi F3

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
128	2.1072	10	7	3/5	60.00
64	1.8062	10	9	29/55	52.73
32	1.5051	3	12	1/5	20.00
16	1.2041	2	11	3/20	15.00
8	0.9031	1	10	1/16	6.25
4	0.6021	0	15	0	0.00
2	0.3010	0	15	0	0.00
1	0.0000	0	16	0	0.00
Kawalan air		0	15	0	0.00
Kawalan DMSO		0	16	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Dimana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	1.51
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	1.81
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	20.00
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	52.73
Log LC ₅₀	=	1.781		
LC ₅₀	=	60.4		µg/ml

Jadual 5.7 : Pengiraan LC₅₀ bagi ekstrak KLO (kawalan)

Kepekatan ekstrak (mg/ml)	Log kepekatan	Bil mati	Bil Hidup	Nisbah Mati:Jumlah	Peratusan % kematian
128	2.1072	10	0	1	100.00
64	1.8062	11	0	1	100.00
32	1.5051	13	0	1	100.00
16	1.2041	15	0	1	100.00
8	0.9031	14	0	1	100.00
4	0.6021	15	2	46/51	90.20
2	0.3010	11	5	2/3	66.67
1	0.0000	9	9	13/27	48.15
Kawalan air		0	16	0	0.00
Kawalan DMSO		0	15	0	0.00

Formula Pengiraan kepekatan maut (LC₅₀)

$$\frac{\text{Log LC}_{50} - \text{Log kepekatan a}}{\text{Log kepekatan b} - \text{Log kepekatan a}} = \frac{\% \text{LC}_{50} - \% m}{\% n - \% m}$$

Dimana,

Log kepekatan a	=	Log kepekatan sebelum LC ₅₀	=	0.00
Log kepekatan b	=	Log kepekatan selepas LC ₅₀	=	0.30
m	=	Peratus kematian sebelum LC ₅₀	=	48.15
n	=	Peratus kematian selepas LC ₅₀	=	66.67
Log LC ₅₀	=	0.030		
LC ₅₀	=	1.1		µg/ml

5.4 PERBINCANGAN

Fraksi-fraksi yang diperolehi daripada Bab empat telah diuji akan keberkesannya terhadap perencatan bakteria *H. pylori*. Lima fraksinasi yang terlibat dalam ujian ini iaitu F1, F2, F3, F4 dan F5. Ekstrak kasar kloroform batang *D. trifoliata* juga digunakan sebagai kawalan positif. Ternyata F1 dan F2 memberikan kesan perencatan yang hampir sama dengan kesan yang diberikan oleh ekstrak kasar kloroform tersebut. Manakala F3 memberikan kesan yang sederhana iaitu sekitar 35.00 mm. Akan tetapi kesan fraksi F4 dan F5 amat kurang terutamanya kepada F5 yang hanya memberikan nilai sekitar 7.16 mm sahaja, manakala fraksi F4 pula sebanyak 17.00 mm. Ini menunjukkan terdapat perbezaan daripada segi keupayaan setiap fraksi - fraksi yang terlibat. Dalam kes ini, F1 dan F2 memberikan kesan yang maksimum seperti kesan yang diberikan oleh ekstrak kasar. Ini menunjukkan bahawa kandungan F1 dan F2 yang ada di dalam ekstrak kasar memberikan kesan tersebut kerana fraksi - fraksi yang berikutnya hanya memberikan kesan perencatan yang agak kecil.

Kajian selanjutnya dilakukan dengan menguji fraksi - fraksi tersebut terhadap empat belas pencilan bakteria patogen termasuklah *H. pylori* sebagai kawalan positif untuk dilihat akan kesan perencatannya. Disamping itu juga kita dapat melihat akan keupayaan memilih fraksi yang terlibat untuk memberi kesan perencatan terhadap *H. pylori*. Oleh itu tiga fraksi yang utama sahaja yang dipilih F1, F2 dan F3 memandangkan nilai perencatan yang diberikan oleh fraksi - fraksi ini agak besar. Daripada keputusan yang diperolehi, F1 dan F2 tidak memberikan apa-apa kesan perencatan kepada kesemua bakteria

patogen yang diuji kecuali kepada *H. pylori* sahaja. Akan tetapi F3 dan ekstrak kasar dapat memberikan kesan perencatan kepada lapan spesies daripada empat belas spesies yang diuji. Spesies yang terbahit adalah *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *S. para typhi* A, *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. slutzeri* dan *H. pylori*.

Ekstrak kasar yang digunakan dalam ujian ini bertindak sebagai kawalan positif. Apa yang menarik perhatian di sini ialah kebolehan F1 dan F2 memberikan kesan perencatan hampir sama dengan yang diberikan oleh ekstrak kasar terhadap *H. pylori* iaitu sekitar 38.00 – 42.00 mm. Malah ianya tidak mengalami perubahan yang besar berbanding dengan ujian pembauran yang dilakukan pada Bab ketiga.

Berikutan dengan keupayaan F1 dan F2 memilih untuk memberikan kesan perencatan, maka satu lagi ujian dilakukan untuk menentukan tahap ketoksikan bahan-bahan yang ada di dalam fraksi tersebut. Kajian ini melibatkan ketiga-tiga fraksi dan ekstrak kasar kloroform batang *D. trifoliata* dengan menggunakan *A. salina*. Kajian ini digunakan untuk menguji sebatian bioaktif di dalam ekstrak tumbuhan (Yang *et. al.*, 2001).

Satu keputusan yang amat menarik diperolehi dalam ujian ini di mana F1, F3 dan ekstrak kasar masing-masing mempunyai tahap ketoksikan yang tinggi dengan nilai LC_{50} yang rendah iaitu 8.75, 60.41 dan 1.07 $\mu\text{g/ml}$. Akan tetapi F2 memberikan tahap ketoksikan yang rendah dengan nilai LC_{50} yang tinggi iaitu 966.48 $\mu\text{g/ml}$. Nilai ini sudah menghampiri nilai yang dibenarkan oleh Institut Kanser Kebangsaan (NCIUSA) dalam kajian mereka kepada bahan anti kanser iaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Cragg *et. al.*, 1994).

Daripada keputusan yang diperolehi ini, jelas memberikan kita satu penyelesaian akan ketoksikan yang wujud sebelum ini pada ekstrak kasar tumbuhan ini. Ketoksikan yang wujud pada ekstrak kasar sebelum ini adalah disebabkan oleh kehadiran bahan-bahan toksik pada F1 dan F3. Oleh itu kesan perencatan yang ada pada fraksi - fraksi ini boleh diragui kerana ianya mungkin disebabkan oleh ketoksikannya. Maka, F2 yang mempunyai ketoksikan yang rendah dapat diterima dengan baik sebagai bahan yang dapat memberikan kesan yang besar terhadap perencatan pertumbuhan *H. pylori*. Bukan itu saja, malah kesannya juga hampir menyamai ekstrak kasar.

Daripada segi sifat yang ditunjukkan oleh F2, ia merupakan bahan yang terdiri daripada kumpulan alkaloid. Penemuan ini adalah amat menarik kerana kajian di Jepun telah membuktikan yang sejenis alkaloid iaitu alkil metil kuinolon daripada sejenis ubat tradisional China (Gosyuyu) begitu aktif *in vivo* terhadap *H. pylori* (Hamasaki *et. al.*, 2002). Begitu juga dengan kajian yang dilakukan di Amerika dimana dua alkaloid iaitu benzotenanhridin daripada *Sanguinaria canadensis* dan berberina serta betahidrastina daripada *Hydrastri canadensis* digunakan untuk ujian *in vitro* terhadap *H. pylori* (Mahady *et. al.*, 2003). Kebanyakan bahan-bahan ini diperolehi daripada ekstrak kasar sebelum diperhalusi ekstraknya bagi mendapatkan komponen yang lebih tulen. Oleh itu, kumpulan alkaloid yang ada dalam tumbuhan *D. trifoliata* dapat bertindak sebagai bahan yang merencatkan pertumbuhan *H. pylori*.

5.5 KESIMPULAN.

Fraksi yang dihasilkan dalam Bab 4 telah diuji keberkesannya terhadap perencatan *H. pylori*. Daripada ujian yang dijalankan, Fraksi F2 yang mempunyai sejenis bahan yang dipercayai kumpulan alkaloid telah didapati bertindak sebagai bahan perencat yang spesifik terhadap pertumbuhan *H. pylori* dan tidak kepada bakteria patogen lain yang diuji. Tahap ketoksikannya yang rendah (966.5 µg/ml) menjadikan bahan ini sesuai untuk kajian selanjutnya sebagai bahan anti-*H. pylori*.

6 FRAKSI TERPILIH (FRAKSI F2) : PENENTUAN KEPEKATAN PERENCATAN MINIMUM (MIC) DAN KESANNYA TERHADAP PERTUMBUHAN SERTA PERUBAHAN MORFOLOGI *H.PYLORI*.

6.1 PENGENALAN

Kepekatan perencatan minimum (MIC) adalah penting dalam kajian ini. Kajian ini amat praktikal dilakukan bagi mengenalpasti kepekatan minimum ekstrak yang diperlukan untuk merencat sehingga 50% (MIC₅₀) atau 90% (MIC₉₀) daripada kultur kajian. Dua contoh kajian MIC terhadap strain *H. pylori* telah dilakukan sebelum ini seperti ekstrak *Myroxylon peruiferum* yang memberikan nilai MIC 62.5 µg/ml (Ohsaki *et al.*, 1999) dan *Anthemis melanolepsis* pula memberikan nilai MIC di antara 0.625 hingga 5.00 µg/ml (Stamatis *et al.*, 2003). Dalam kajian ini MIC₅₀ dan MIC₉₀ akan memberikan satu keputusan yang menunjukkan tahap keupayaan F2.

Koloni *H. pylori* apabila diberi tindakan dengan bahan kimia atau bahan perencat akan mula mengalami masalah terutamanya dalam perubahan bentuk fizikal. Secara tidak langsung, strain itu menjadi lemah, dan ia akan mati atau bertukar ke bentuk kokoid. *H. pylori* cenderung berubah daripada bentuk spiral kepada bentuk kokoid sekiranya persekitaran medium tidak lagi menyokong pertumbuhannya (Nakamura *et al.*, 2000). Perubahan *H. pylori* kepada bentuk kokoid menjadikan ianya tidak dapat membentuk koloni. Kematian atau peralihan bentuk spiral ke kokoid ini menjelaskan tentang kejatuhan nilai CFU akhir apabila dibandingkan dengan nilai CFU awal kemandirian *H. pylori*.

Kiraan langsung sel *H. pylori* berdasarkan bacaan slaid kepada dua bentuk fizikal. Dengan perwarnaan mudah, bentuk pertama ialah bentuk spiral, bentuk yang hidup dan boleh menghasilkan koloni. Sel *H. pylori* yang berbentuk heliks atau spiral merupakan sel yang aktif membahagi dan dengan itu ia dapat dikulturkan (Cole *et al.*, 1997). Keduanya adalah kokoid, yang berbentuk bulat sepenuhnya. Pada bentuk ini *H. pylori* tidak lagi menjalankan sifatnya sebagai bakteria dan ianya tidak dapat dikulturkan lagi. Penambahan ekstrak yang mengandungi bahan antimikrob tertentu ke dalam medium pertumbuhan atau keadaan persekitaran yang tidak sesuai sebenarnya mempercepatkan lagi perubahan morfologi daripada bentuk spiral kepada bentuk kokoid (Kusters *et al.*, 1997). Pada teorinya bilangan bentuk spiral akan berkurangan apabila ianya telah ditindakan dengan bahan perencat. Oleh itu bilangan bentuk kokoid pula akan bertambah.

Pemerhatian melalui mikroskop elektron pensakanan (SEM) akan menjelaskan lagi kajian ini. Dari sini dapat dilihat bentuk *H. pylori* yang berubah stukturanya bila dikenakan bahan anti *H. pylori* dari sel spiral terus berubah menjadi kokoid. Hal ini akan membawa kepada kajian terhadap bahan aktif tersebut. Bahan aktif yang terlibat biasanya mempunyai cara tersendiri untuk bertindak. Mikonazol misalnya, mampu mengganggu metabolisime kolestrol dalam penyakit 'recklinghausen' (Itoh *et al.*, 1998).

Terdapat bahan aktif yang mampu membunuh terus dengan cara memecahkan sel bakteria atau ada yang menghalang reseptor-reseptor tertentu yang menjadikan sel bakteria tidak dapat berfungsi dengan baik. Di dalam kajian *H. pylori*, kebanyakan bahan aktifnya bertindak mengganggu atau menghalang reseptor-reseptor sel, menjadikan *H. pylori* tidak stabil dengan

keadaan persekitarannya. Oleh itu, *H. pylori* akan berubah bentuk kepada kokoid. Kesan antimikrob terhadap pembentukan kokoid inilah yang mengurangkan keupayaan *H. pylori* untuk dikulturkan.

Oleh itu, objektif kajian ini adalah; pertama untuk menentukan MIC₅₀ dan MIC₉₀ bagi fraksi F2 dan ekstrak KLO untuk perencatan *H. pylori* dan membuat perbandingan dengan antibiotik yang selalu digunakan dalam rawatan jangkitan *H. pylori*; kedua menentukan tahap kemandirian *H. pylori* di dalam medium kaldu yang diberikan fraksi F2 pada kepekatan yang berlainan; ketiga, memerhatikan perubahan morfologi *H. pylori* apabila diberikan fraksi F2 pada kepekatan yang berlainan.

6.2 BAHAN DAN KAEDAH

6.2.1 Peralatan Dan Keperluan Eksperimen

Peralatan disteril seperti yang dinyatakan di dalam Bab 2.2.1 dan medium pengkulturan, pengeraman kultur, medium pengawetan dan pengawetan kultur adalah seperti yang dinyatakan di dalam Bab 2.2.3, Bab 2.2.4, Bab 2.2.5 dan Bab 2.2.6.

6.2.2 Penyediaan Agar Yang Mengandungi Fraksi F2 Dan Antibiotik (Tetrasiklin, Metronidazola Dan Amoksisilin) Dan Ekstrak KLO Dan Penentuan MIC.

Julatan kepekatan muktamad F2 (Bab 4), ekstrak KLO tumbuhan *D. trifoliata*, antibiotik yang sering digunakan dalam rawatan *H. pylori* seperti Tetrasiklin, Metronidazola dan Amoksisilin di tunjukkan dalam Jadual 6.1. Agar EBA tanpa rawatan dan agar EBA dicampur dengan julatan DMSO bertindak sebagai eksperimen kawalan.

Sebanyak 45 pencilan klinikal atau kultur *H. pylori* yang berbeza telah diuji. Kesemua kultur tersebut diperolehi daripada pesakit-pesakit yang diendoskopkan di Hospital Seberang Jaya, Pulau Pinang sepanjang tahun 1998-2002 (Jadual 6.2). Ampaian sel piawai disediakan seperti dinyatakan dalam Bab 2.2.7. Kemudian, 10 µl daripada setiap 45 inokulum tadi dipipetkan pada setiap petak pada agar EBA yang mengandungi siri kepekatan muktamad ekstraknya.

Selepas 84 jam pengeraman, pertumbuhan *H. pylori* diperhatikan. Pertumbuhannya dicatat sama ada positif (ada pertumbuhan) atau negatif

(tiada pertumbuhan) pada setiap julat kepekatan yang ditetapkan. Seterusnya nilai MIC₅₀ dan MIC₉₀ dihitung.

Jadual 6.1: Siri kepekatan F2, ekstrak KLO kloroform batang tumbuhan *D. trifoliata*, Tetrasiklin, Metronidazola dan Amoksisilin untuk penentuan MIC.

Fraksi 2 ($\mu\text{g/ml}$)	Ekstrak KLO ($\mu\text{g/ml}$)	Tetrasiklin ($\mu\text{g/ml}$)	Metronidazola ($\mu\text{g/ml}$)	Amoksisilin ($\mu\text{g/ml}$)
1	1	1	1	0.007
2	2	2	2	0.015
4	4	4	4	0.03
8	8	8	8	0.06
16	16	16	16	0.12
32	32	32	24	0.24
64	64	64	32	0.48
128	128	128	40	0.96
256	256			1.92
512	512			
1024	1024			

Jadual 6.2: Sumber 45 kultur *H. pylori* yang digunakan dalam penentuan MIC.

Bil	Pencilan	Bangsa	Jantina	Umur	Penemuan endoskopi
1	SJ 46	Melayu	Lelaki	50	Gastritis antrum
2	SJ 47	India	Wanita	60	Gastritis antrum
3	SJ 65	Cina	Wanita	46	Gastritis antrum
4	SJ 69	Cina	Wanita	70	Normal
5	SJ 70	Cina	Wanita	63	Normal
6	SJ 77	Melayu	Lelaki	24	Gastritis antrum
7	SJ 98	Cina	Lelaki	69	Ulser duodenum
8	SJ 109	India	Lelaki	47	Gastritis antrum
9	SJ 115	Cina	Lelaki	26	Gastritis antrum
10	SJ 136	India	Lelaki	37	Ulser duodenum
11	SJ 137	India	Lelaki	33	Antral gastritis
12	SJ 143	Cina	Lelaki	45	Antral gastritis
13	SJ 147	India	Lelaki	40	Normal
14	SJ 148	India	Lelaki	45	Gastritis antrum
15	SJ 152	India	Lelaki	56	Ulser pra pilorus
16	SJ 153	Cina	Lelaki	67	Ulser pra pilorus
17	SJ 154	Cina	Lelaki	42	Ulser pra pilorus
18	SJ 157	Cina	Lelaki	70	Gastritis antrum
19	SJ 160	India	Lelaki	60	Gastritis
20	SJ 164	Cina	Lelaki	51	Gastritis antrum
21	SJ 175	Bangladesh	Lelaki	30	Gastritis
22	SJ 179	India	Lelaki	30	Gastritis antrum
23	SJ 184	India	Lelaki	41	Gastritis pilorus
24	SJ 185	India	Lelaki	46	Gastritis antrum
25	SJ 195	Cina	Lelaki	67	Tiada laporan
26	SJ 198	Cina	Lelaki	37	Gastritis antrum
27	SJ 205	India	Wanita	55	Gastritis
28	SJ 248	Bangladesh	Lelaki	47	Normal dispepsia tanpa ulser
29	SJ 251	Melayu	Lelaki	45	Gastritis antrum
30	SJ 255	India	Lelaki	60	Gastritis antrum
31	SJ 270	India	Lelaki	42	Gastritis antrum
32	SJ 295	Bangladesh	Lelaki	25	Normal dispepsia tanpa ulser
33	SJ 300	Cina	Wanita	55	Gastritis antrum
34	SJ 334	Melayu	Lelaki	38	Gastritis
35	SJ 371	Cina	Lelaki	45	Ulser duodenum
36	SJ 381	Melayu	Lelaki	45	Gastritis antrum
37	SJ 392	India	Lelaki	48	Ulser pra pylori
38	SJ 393	India	Wanita	45	Normal dispepsia tanpa ulser
39	SJ 422	India	Wanita	48	Gastritis
40	SJ 443	India	Lelaki	60	Gastritis
41	SJ 452	Bangladesh	Lelaki	32	Gastritis
42	SJ 779	Bangladesh	Lelaki	43	Duodenitis
43	SJ 808	Cina	Lelaki	62	Ulser duodenum
44	SJ 815	Melayu	Lelaki	70	Duodenitis
45	SJ 885	India	Lelaki	56	Duodenitis

6.2.3 Penentuan Kesan Fraksi F2 Terhadap Pertumbuhan *H. pylori*.

6.2.3.1 Ujian Kadar Hidup.

Sebanyak 5 siri tiub disumbatkan dengan kapas steril. Bagi setiap tiub, air suling, inokulum (Ampaian sel piawai disediakan seperti dinyatakan dalam Bab 2.2.7), kaldu Eugon serta F2 dengan kepekatan yang berbeza dimasukkan mengikut seperti dalam Jadual 6.3, di mana isipadu akhir adalah sebanyak 500 μl . Tiub pertama dan kedua mengandungi DMSO dan H_2O menggantikan F2 yang bertindak sebagai kawalan.

Bagi setiap tiub, pencairan bersiri 10 ganda dijalankan. Sebanyak 10 μl daripada sampel dari setiap tiub sampel pada pencairan 10^{-1} dicairkan dengan 90 μl air suling dalam tiub. Pencairan bersiri 10-ganda dijalankan daripada 10^{-1} hingga 10^{-6} . Sebanyak 10 ml setiap pencairan (secara tripliket), dipipetkan ke atas EBA dan dieramkan (Bab 2.2.4) untuk selama 84 jam, sebelum koloni dihitung. Kaedah ini diulangi untuk setiap 24, 48, 72 dan 84 jam.

6.2.3.2 Kaedah Hitungan Langsung

Hitungan langsung untuk menentukan bentuk spiral dan kokoid *H. pylori* dapat dilakukan menerusi pemerhatian di bawah mikroskop cahaya. Sebanyak 10 μl daripada setiap pencairan (Bab 6.2.4) dipipetkan ke atas slaid kaca dan disebarikan seluas 1 cm persegi. Slaid dilayarkan dengan melalukannya di atas nyala penunu Bunsen. Setelah didapati kering, coretan diwarnakan dengan safranin, dibiarkan selama 10 minit, dibilas di bawah aliran air paip sebelum dikeringkan. Slaid kemudiannya diperhatikan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali di bawah kanta rendaman minyak. Morfologi *H. pylori* dapat dikenalpasti, iaitu berbentuk spiral, perantaraan spiral-kokoid,

serta kokoid. Bilangannya dalam setiap tiub dicatat bermula dari jam sifar hingga 84 jam.

Jadual 6.3: Kandungan kaldu Eugon yang mengandungi fraksi F2 serta air suling dan DMSO sebagai kawalan.

Tiub	Kaldu Eugon [ds] (μ l)	Darah (μ l)	Inokulum <i>H. pylori</i> [10^7 CFU/ml] (μ l)	Air suling / DMSO (μ l)	F2 [50 μ g/ml] (μ l)	[F2] (akhir) (μ g/ml)	Jumlah isipadu (μ l)
1 (kawalan)	500	100	150	250 (DMSO)	0	0	1000
2 (kawalan)	500	100	150	250	0	0	1000
3	500	100	150	230	20	1	1000
4	500	100	150	210	40	2	1000
5	500	100	150	170	80	4	1000

Nota:

ds: kekuatan dua kali

6.2.4 Pemerhatian Morfologi *H. pylori* Dengan Mikroskop Elektron Penskanan (SEM).

Satu siri kepekatan disediakan (Bab 6.2.3.1 dan Jadual 6.3). Tidak semua siri kepekatan dapat dilihat di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM), ini kerana faktor penghad kepada 8 sampel sahaja. Oleh itu siri kepekatan yang dapat dilihat ialah kawalan DMSO selama (jam) 0, 48 dan 84. Diikuti pula dengan F2 yang berkepekatan 1 µg/ml selama (jam) 48 dan 84. Akhir sekali F2 yang berkepekatan 4 µg/ml selama (jam) 0, 48 dan 84. Langkah-langkah yang dilakukan ialah:-

- i. Sampel diemparkan di dalam tiub Eppendorff 1.5 ml selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g.
- ii. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan McDowell-Trump yang disediakan dalam 0.1M penimbal fosfat (pH 7.2) selama 2 jam bagi tujuan penetapan. Ia juga boleh disimpan dahulu di dalam peti sejuk (0-8⁰ C) bagi tujuan pengumpulan sampel sebelum dibawa ke Unit Mikroskop Elektron.
- iii. Kemudian, ia diemparkan selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 0.1 M penimbal fosfat (W1) .
- iv. Kemudian, ia diemparkan sekali lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 0.1M penimbal fosfat (W2) .
- v. Kemudian, ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 1%

(b/i) Osmium tetrosida yang disediakan dalam penimbal fosfat bagi tujuan penetapan kedua.

- vi. Kemudian, ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan air suling (PW1). (Langkah v dan vii mesti lakukan di dalam kebuk wasap di bawah pengawasan staf di Unit Mikroskop Elektron. Ini adalah kerana Osmium tetrosida adalah bahan kimia yang sangat toksik).
- vii. Kemudian, ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan air suling (PW2).
- viii. Sekali lagi ia diemparkan selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 50% etanol dan dibiarkan selama 15 minit.
- ix. Ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 75% etanol dan dibiarkan selama 15 minit.
- x. Ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 95% etanol (W1 dan dibiarkan selama 15 minit.
- xi. Ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 95% etanol (W2) dan dibiarkan selama 15 minit.
- xii. Ia diemparkan lagi selama 15 minit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 100% etanol. (W1) dan dibiarkan selama 20 minit.

- xiii. Ia diemparkan lagi selama 15 menit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan 100% etanol (W2) dan dibiarkan selama 20 menit.
- xiv. Ia diemparkan lagi selama 15 menit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan HMDS (Hesametildisilazin) (W1) dan dibiarkan selama 5 menit.
- xv. Ia diemparkan lagi selama 15 menit dengan kelajuan 2000 g. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal diampaiakan dengan HMDS (Hesametildisilazin) (W2) dan dibiarkan selama 5 menit.
- xvi. Ia kemudiannya dibiarkan kering di dalam alat desikator untuk selama 2 hingga 3 hari.
- xvii. Sampel yang telah kering akan dilekatkan dengan “double sided sticky tape” pada tapak sampel mikroskop elektron penskanan (SEM).
- xviii. Kemudian ia akan dikatkan dengan emas.
- xix. Sampel kemudiannya akan disejukbekukering dengan cecair nitrogen.
- xx. Akhir sekali barulah sampel berkenaan dapat diamati dengan mikroskop elektron penskanan (SEM).

6.3 KEPUTUSAN

6.3.1 Nilai MIC₅₀ dan MIC₉₀ Fraksi F2 Dan Antibiotik (Tetrasiklin, Metronidazola Dan Amoksisilin) Dan Ekstrak KLO

Pada Jadual 6.4, didapati kesemua pencilan *H. pylori* mati pada kepekatan 1024 hingga 32 µg/ml fraksi F2, tetapi pada kepekatan 16 µg/ml terdapat pertumbuhan satu pencilan *H. pylori* iaitu pencilan SJ 251. Ini menjadikan kepekatan pada 16 µg/ml tersebut memberikan kesan perencatan sebanyak 97.78%. Manakala, pada kepekatan 8 µg/ml, 10 pencilan *H. pylori* didapati rintang kepadanya dan menjadikan sebanyak 77.78% dapat direncatkan oleh F2 ini (Jadual 6.4). Hal ini menjadikan nilai MIC₉₀ F2 adalah sebanyak 8-16 µg/ml (Jadual 6.5).

Nilai MIC₅₀ untuk F2 pula adalah terletak di antara 2- 4 µg/ml (Jadual 6.4). Ini disebabkan 40% daripada pencilan *H. pylori* direncatkan pada kepekatan 2 µg/ml dan sebanyak 60% direncatkan pada kepekatan 4 µg/ml. Akhir sekali F2 memberikan kesan perencatan sebanyak 22.22% pada kepekatan 1 µg/ml (Jadual 6.4).

Ekstrak KLO pula didapati tidak merencat pertumbuhan dua pencilan *H. pylori* pada kepekatan 4 µg/ml iaitu pencilan SJ 175 dan SJ 392. Ini menjadikan 95.56% pencilan-pencilan *H. pylori* dapat direncat pertumbuhannya, manakala pada kepekatan 2 µg/ml, 64.44% dan 1 µg/ml, sebanyak 35.56% dapat direncat pertumbuhan *H. pylori* ini (Jadual 6.6). Oleh itu nilai MIC₉₀ adalah terletak diantara nilai kepekatan 2 – 4 µg/ml dan nilai MIC₅₀ pula adalah diantara 1 - 2 µg/ml (Jadual 6.5).

Jadual 6.4: Keputusan pertumbuhan *H. pylori* pada siri kepekatan fraksi F2.

Pencilan	Siri kepekatan fraksi F2 ($\mu\text{g/ml}$)											DMSO	H ₂ O
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1		
SJ 46	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 47	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 65	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 69	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 70	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 77	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 98	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 109	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 115	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 136	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 137	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 143	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 147	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 148	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 152	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 153	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 154	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 157	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 160	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 164	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 175	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 179	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 184	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 185	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 195	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 198	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 205	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 248	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 251	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 255	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 270	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 295	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 300	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 334	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 371	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 381	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 392	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 393	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 422	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 443	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 452	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 779	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 808	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 815	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 885	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
% perencatan	100	100	100	100	100	100	97.78	77.78	60.00	40.00	22.22	0	0
% tumbuh	0	0	0	0	0	0	2.22	22.22	40.00	60.00	77.78	100	100

Kekunci : M = direncat T = rintang

Jadual 6.5: Perbandingan nilai MIC₅₀ dan MIC₉₀ fraksi F2 dan antibiotik (tetrasiklin, metronidazola dan amoksisilin) dan ekstrak KLO.

	Fraksi F2 (µg/ml)	Ekstrak KLO (µg/ml)	Tetrasiklin (µg/ml)	Metronidazola (µg/ml)	Amoksisilin (µg/ml)
MIC ₅₀	4-2	2-1	>1	< 40	0.03-0.015
MIC ₉₀	16-8	4-2	32-16	< 40	0.48-0.24

Kekunci:

> = kurang daripada.
 < = lebih daripada.

Jadual 6.6: Keputusan pertumbuhan *H. pylori* pada siri kepekatan ekstrak KLO.

Pencilan	Siri kepekatan ekstrak KLO ($\mu\text{g/ml}$)											DMSO	H_2O
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1		
SJ 46	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 47	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 65	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 69	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 70	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 77	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 98	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 109	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 115	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 136	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 137	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 143	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 147	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 148	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 152	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 153	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 154	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 157	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 160	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 164	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 175	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 179	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 184	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 185	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 195	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 198	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 205	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 248	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 251	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 255	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 270	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 295	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 300	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 334	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 371	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 381	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 392	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 393	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 422	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 443	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 452	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 779	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 808	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 815	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 885	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
% perencatan	100	100	100	100	100	100	100	100	95.56	64.44	35.56	0	0
% tumbuh	0	0	0	0	0	0	0	0	4.44	35.56	64.44	100	100

Kekunci : M = direncat T = rintang

Tetrasiklin pula menghalang pertumbuhan *H. pylori* sebanyak 95.56% pada kepekatan 128 µg/ml, 93.33% pada kepekatan 64 µg/ml dan 32 µg/ml, 88.89% pada 16 µg/ml, 86.67% pada 8 µg/ml, 80% pada 4 µg/ml, 68.89% pada 2 µg/ml dan akhir sekali 51.11% pada 1 µg/ml (Jadual 6.7). Oleh itu Jadual 6.5 menunjukkan yang nilai MIC₉₀ adalah terletak di antara kepekatan 16-32 µg/ml dan nilai MIC₅₀ pula terletak pada kepekatan yang kurang daripada 1 µg/ml.

Keadaan yang berbeza berlaku kepada metronidazola, dimana bahan anti-*H. pylori* ini hanya merencat pertumbuhan pencilan SJ 47 pada semua kepekatan dan SJ 153, SJ 157, SJ 381 dan SJ 815 telah direncat pertumbuhannya pada kepekatan 24 hingga 40 µg/ml (Jadual 6.8) sahaja. Pada 8 µg/ml pula bahan ini didapati merencat pertumbuhan SJ 779. Di dalam kes ini, Metronidazola tidak dapat memberi bacaan nilai MIC₉₀ dan MIC₅₀ kerana sehingga ke kepekatan sebanyak 40 µg/ml (Jadual 6.5) didapati kurang daripada 50% pencilan yang berjaya direncat (Jadual 6.8).

Antibiotik yang sering digunakan dalam rawatan *H. pylori* seperti amoksisilin memberikan sebanyak 95.56% perencatan pertumbuhan pada kepekatan 1.92 dan 0.96 µg/ml, manakala pada kepekatan 0.48, 0.24, 0.12, 0.06 dan 0.03 µg/ml, masing-masing merencat pertumbuhan *H. pylori* sebanyak 91.11%, 80.00%, 60.00%, 55.56%, dan 51.11%. Akhir sekali sebanyak 26.67% pertumbuhan *H. pylori* direncat pada kepekatan 0.015 dan 0.007 µg/ml (Jadual 6.9). Oleh itu, nilai MIC₉₀ adalah diantara 0.24 – 0.48 µg/ml sementara nilai MIC₅₀ pula adalah diantara 0.015 hingga 0.03 µg/ml (Jadual 6.5).

Jadual 6.7: Keputusan pertumbuhan *H. pylori* pada siri kepekatan tetrasiklin.

Pencilan	Siri kepekatan tetrasiklin ($\mu\text{g/ml}$)									DMSO	H ₂ O
	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5		
SJ 46	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 47	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 65	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 69	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 70	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 77	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 98	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 109	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 115	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 136	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 137	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 143	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 147	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 148	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 152	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 153	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 154	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 157	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 160	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 164	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 175	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 179	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 184	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 185	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 195	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 198	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 205	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 248	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 251	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 255	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 270	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 295	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 300	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 334	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 371	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 381	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 392	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 393	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 422	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 443	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 452	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 779	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 808	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 815	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 885	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
% perencatan	95.56	93.33	93.33	88.89	86.67	80.00	68.69	51.11	0	0	0
% tumbuh	4.44	6.67	6.67	11.11	13.33	20.00	31.11	48.89	100	100	100

Kekunci : M = direncat T = rintang

Jadual 6.8: Keputusan pertumbuhan *H. pylori* pada siri kepekatan metronidazola.

Pencilan	Siri kepekatan metronidazola ($\mu\text{g/ml}$)										DMSO	H ₂ O
	40	32	24	16	8	4	2	1	0.5	0.25		
SJ 46	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 47	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T
SJ 65	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 69	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 70	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 77	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 98	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 109	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 115	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 136	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 137	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 143	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 147	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 148	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 152	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 153	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 154	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 157	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 160	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 164	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 175	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 179	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 184	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 185	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 195	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 198	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 205	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 248	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 251	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 255	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 270	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 295	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 300	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 334	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 371	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 381	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 392	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 393	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 422	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 443	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 452	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 779	T	T	T	T	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 808	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 815	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 885	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
% perencatan	11.11	11.11	11.11	2.22	4.44	2.22	2.22	2.22	2.22	0	0	0
% tumbuh	88.89	88.89	88.89	97.78	95.56	97.78	97.78	97.78	97.78	100	100	100

Kekunci : M = direncat T = rintang

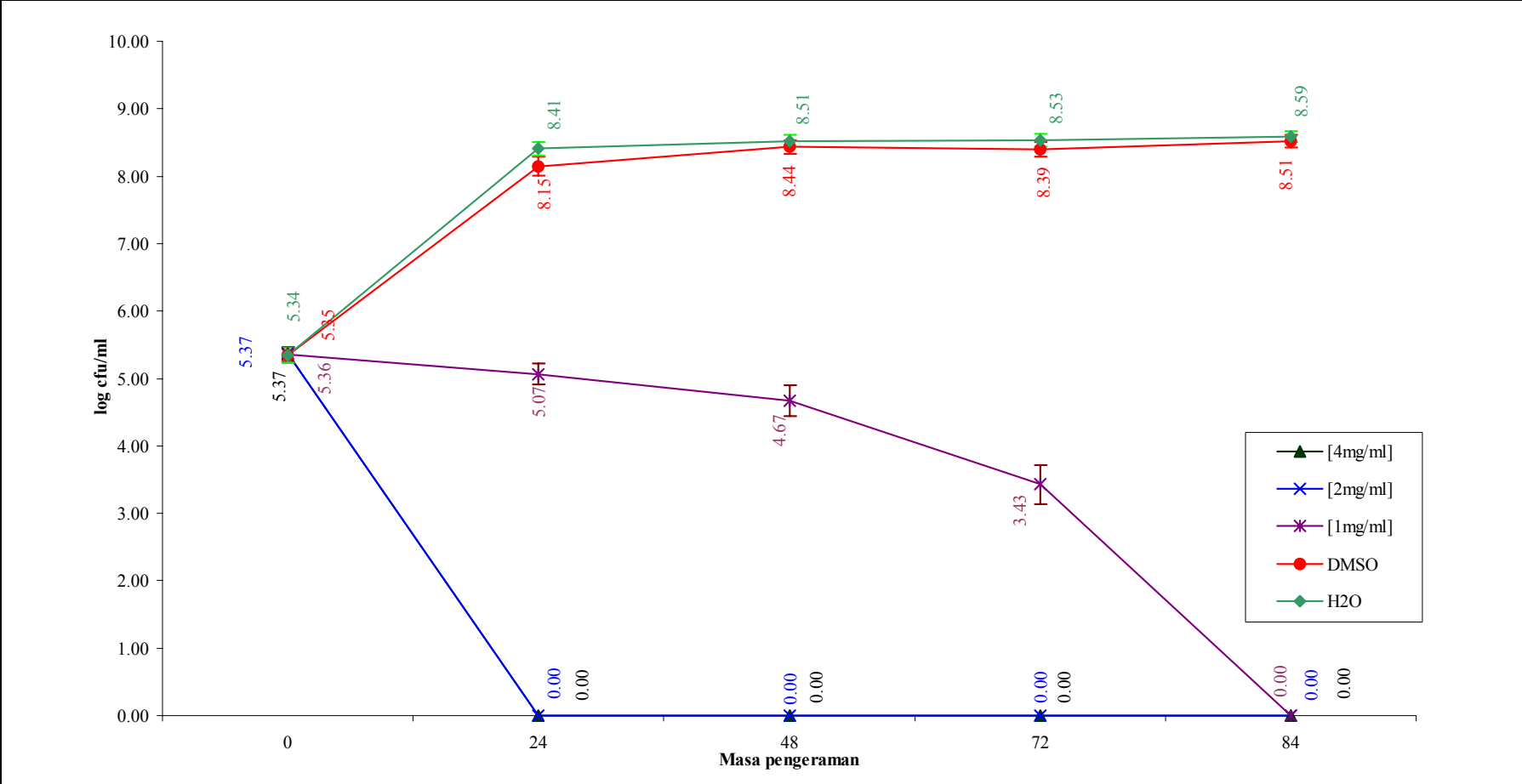
Jadual 6.9: Keputusan pertumbuhan *H. pylori* pada siri kepekatan amoksisilin.

Pencilan	Siri kepekatan amoksisilin ($\mu\text{g/ml}$)									DMSO	H ₂ O
	1.92	0.96	0.48	0.24	0.12	0.06	0.03	0.015	0.007		
SJ 46	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 47	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 65	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 69	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 70	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 77	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 98	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 109	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 115	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 136	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 137	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 143	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 147	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 148	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 152	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 153	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 154	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 157	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 160	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 164	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 175	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 179	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 184	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 185	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 195	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 198	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 205	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 248	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 251	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 255	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 270	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 295	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 300	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 334	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 371	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T	T
SJ 381	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 392	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 393	M	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T
SJ 422	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 443	M	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T
SJ 452	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 779	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
SJ 808	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T	T
SJ 815	M	M	M	M	M	T	T	T	T	T	T
SJ 885	M	M	M	M	M	M	M	M	M	T	T
% perencatan	95.56	95.56	91.11	80.00	60.00	55.56	51.11	26.67	26.67	0	0
% tumbuh	4.44	4.44	8.89	20.00	40.00	44.44	48.89	73.33	73.33	100	100

Kekunci : M = direncat T = rintang

6.3.2 Perubahan Bilangan Koloni *H. pylori* Dalam Kaldu Yang Mengandung Fraksi F2

H. pylori tumbuh dengan baiknya dalam masa 24 jam pertama di dalam medium yang mengandung air dan DMSO (Rajah 6.1), memandangkan kultur yang digunakan ini adalah kultur viabel dan mampu untuk tumbuh dengan baik. Selepas 24 jam pengeraman, kultur ini mula memasuki fasa pegun dalam pertumbuhannya. Akan tetapi di dalam kultur yang mengandung fraksi F2 (1, 2 dan 4 µg/ml) bilangan *H. pylori* didapati menurun. Malah, penurunan ini amat ketara dalam kepekatan 2 dan 4 µg/ml yang mana sel viabel *H. pylori* tidak dapat dikesan langsung pada 24 jam pengeraman. Sebaliknya, pada kepekatan 1 µg/ml, bilangan sel *H. pylori* didapati menurun secara perlahan-lahan sehingga 84 jam pengeraman, kemudian barulah sel viabel *H. pylori* tidak dapat dikesan langsung.



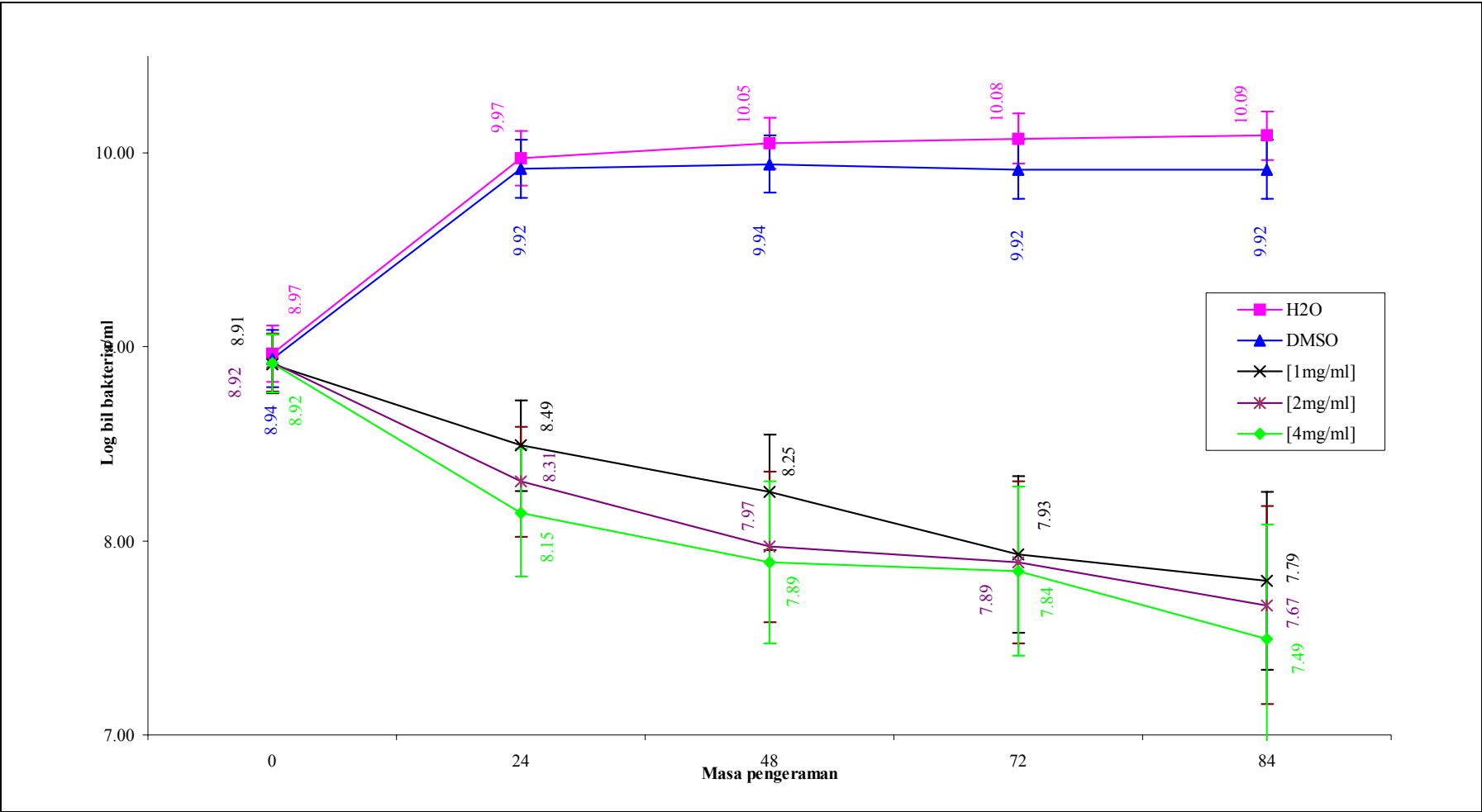
Rajah 6.1 : Perubahan bilangan sel *H. pylori* (CFU/ml) mengikut masa apabila dikulturkan di dalam medium yang mengandungi fraksi F2 pada kepekatan yang berbeza.

6.3.3 Perubahan Bilangan Jumlah Sel (Spiral dan Kokoid) *H. pylori* Apabila Dikulturkan Dalam Medium Yang Mengandung Fraksi F2 Yang Berbeza Kepekatan.

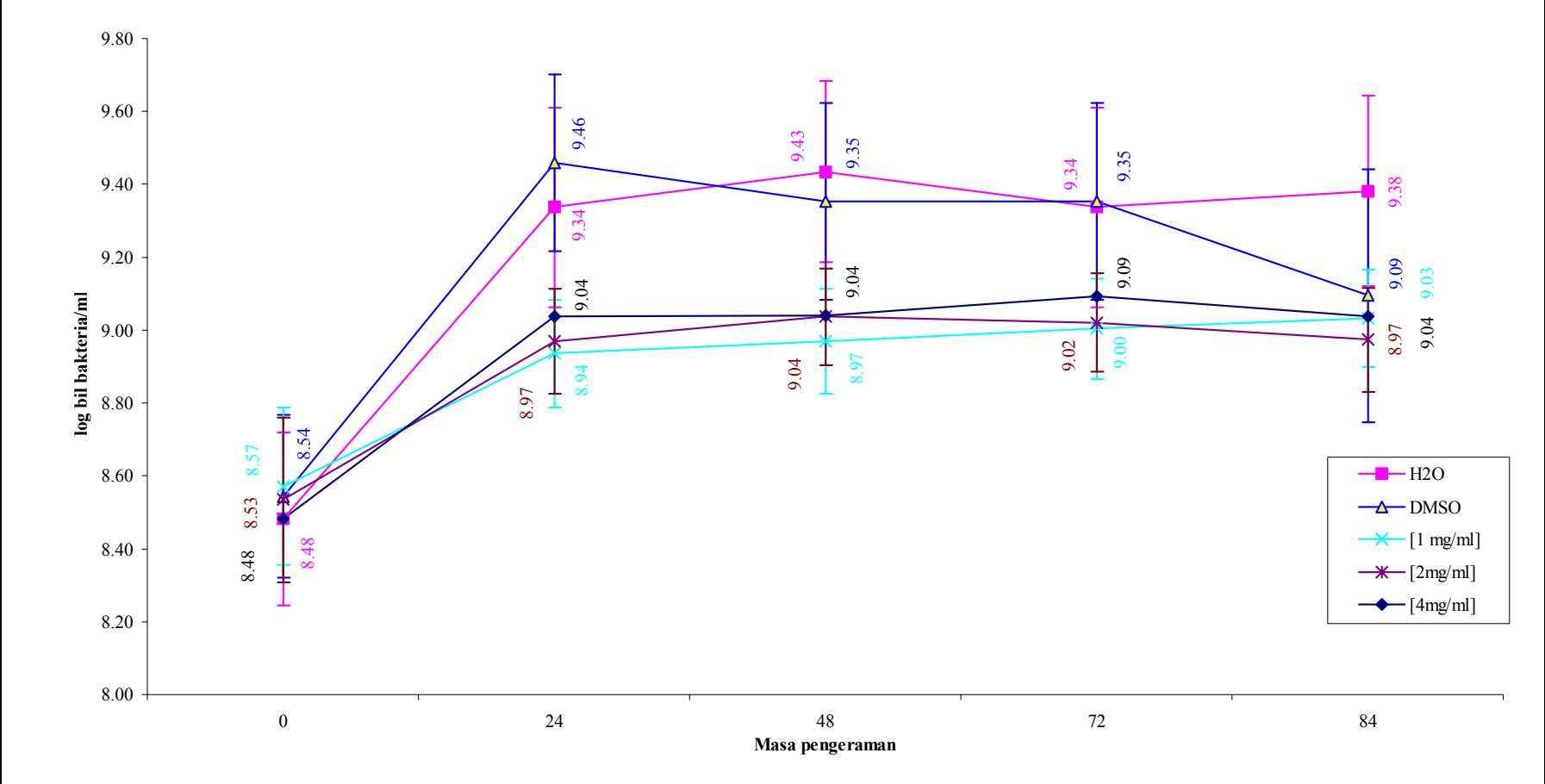
Log bilangan sel bakteria per ml bagi kawalan H₂O dan DMSO meningkat pada 24 jam pertama pengeraman untuk semua bentuk *H. pylori* sama ada spiral atau kokoid (Rajah 6.2 dan 6.3). Pertambahan tidak berlaku lagi selepas 24 jam berikutnya kerana memasuki fasa pegun pertumbuhan. Terdapat sedikit penurunan dalam pada kawalan DMSO pada bentuk kokoid (Rajah 6.3) selepas 24 jam berikutnya dan selepas 72 jam ianya mengalami penurunan tetapi penurunan tersebut adalah amat sedikit sekali iaitu masih lagi dalam lingkungan satu log.

Di dalam Rajah 6.2, log bilangan sel bakteria per ml untuk bentuk spiral menurun dari 0 hingga 84 jam pada kepekatan 1, 2 dan 4 µg/ml fraksi F2 ini. Kejatuhan paling ketara adalah pada kepekatan 4 µg/ml.

Sebaliknya pula bentuk kokoid meningkat pada 0 hingga 84 jam. Pada kepekatan 1 µg/ml fraksi F2 pertambahan bilangan bakteria jelas ditunjukkan dalam Rajah 6.3. Peningkatan log bilangan bakteria pada kepekatan 2 dan 4 µg/ml adalah amat ketara sekali.



Rajah 6.2 : Perubahan bilangan sel *H. pylori* (hitungan langsung) mengikut masa apabila dikulturkan di dalam medium yang mengandungi fraksi F2 pada kepekatan yang berbeza untuk bentuk spiral.



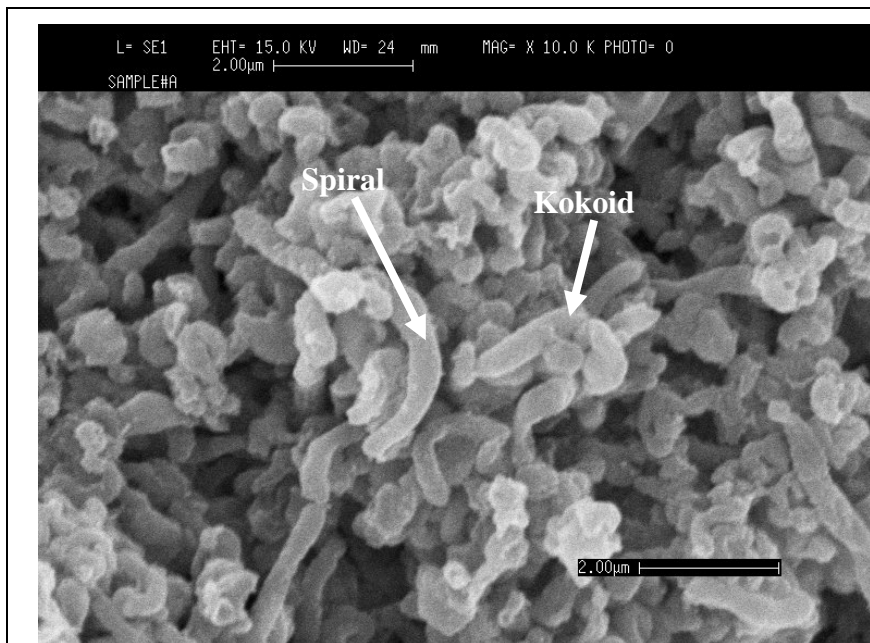
Rajah 6.3 : Perubahan bilangan sel *H. pylori* (hitungan langsung) mengikut masa apabila dikulturkan di dalam medium yang mengandungi fraksi F2 pada kepekatan yang berbeza untuk bentuk kokoid.

6.3.4 Perubahan Bentuk Morfologi *H. pylori* Daripada Spiral Ke Kokoid Akibat Tindakan Faksi F2.

Pada sampel yang diberikan rawatan dan tanpa rawatan pada 0 jam, bentuk asal *H. pylori* (spiral) dapat dilihat dengan banyaknya pada sampel yang diberikan tanpa rawatan dan yang diberikan rawatan 4 µg/ml. Walaubagaimanapun terdapat juga bentuk kokoid pada sampel ini (Plat 6.1a dan Plat 6.1b)

Selepas 48 jam, sekali bagi sampel yang terdiri daripada rawatan dengan 1 µg/ml F2, 4 µg/ml F2 dan tanpa rawatan ini dilihat di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM). Keputusan yang dapat dilihat adalah terdapat bentuk spiral diperolehi pada sampel dengan rawatan 1 µg/ml dan 4 µg/ml (Plat 6.1c dan Plat 6.1d). Akan tetapi pada sampel tanpa rawatan, terdapat banyak bentuk spiral yang masih wujud selepas 48 jam (Plat 6.1e).

Sampel-sampel ini sekali lagi dilihat di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM) selepas 84 jam. Jelas dilihat pada Plat 6.1f dan 6.1g di mana bentuk spiral masih dapat dilihat walaupun bentuk kokoid mendominasi pada sampel dengan rawatan 1 µg/ml dan 4 µg/ml. Pada sampel tanpa rawatan, bentuk spiral dan kokoid masih dapat dilihat (Plat 6.1h).

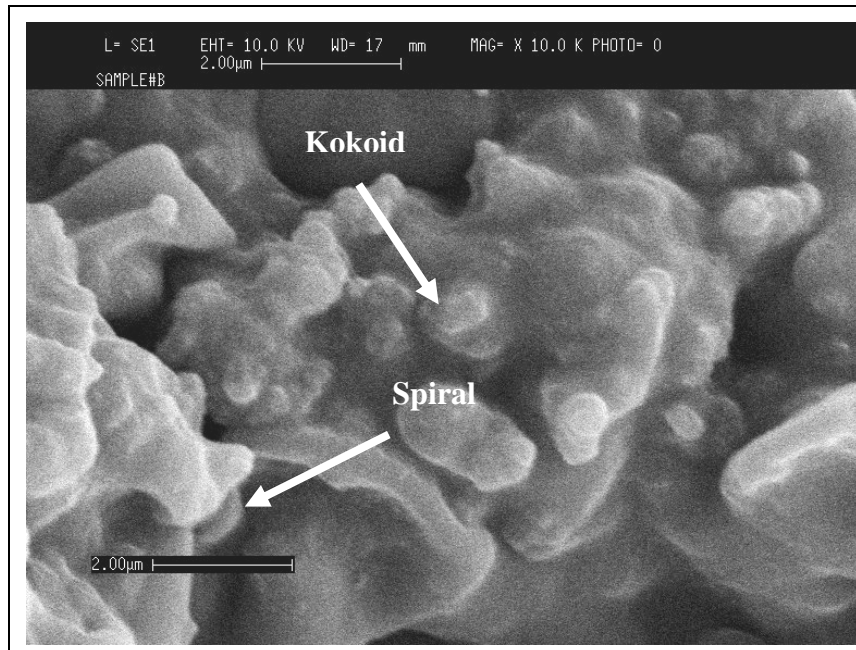


(a) Morfologi *H. pylori* pada 0 jam tanpa rawatan

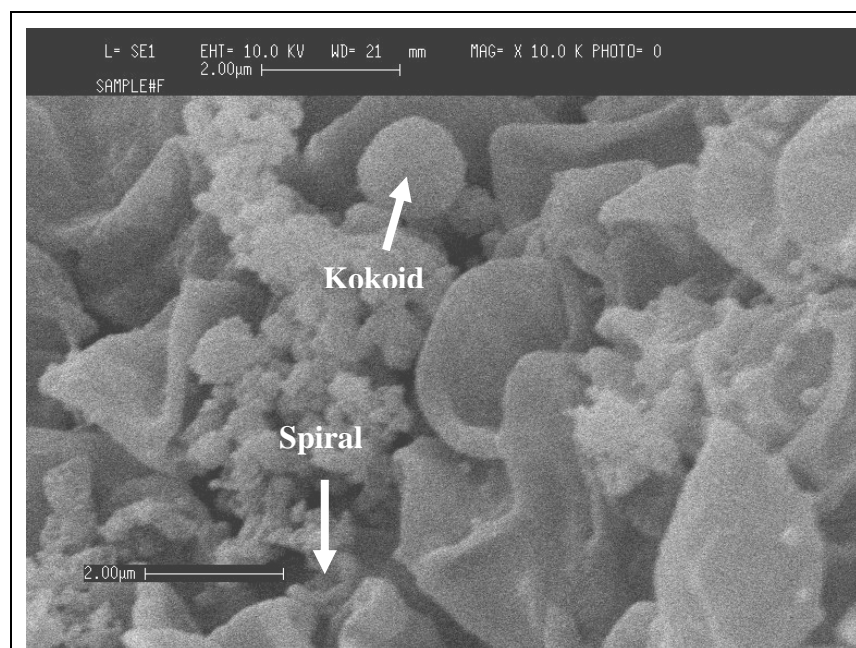


(b) Morfologi *H. pylori* pada 0 jam dengan rawatan 4 µg/ml.

Plat 6.1: Mikrograf elektron pensakanan (SEM) untuk menunjukkan perubahan morfologi *H. pylori* selepas ditindakkan dengan fraksi F2

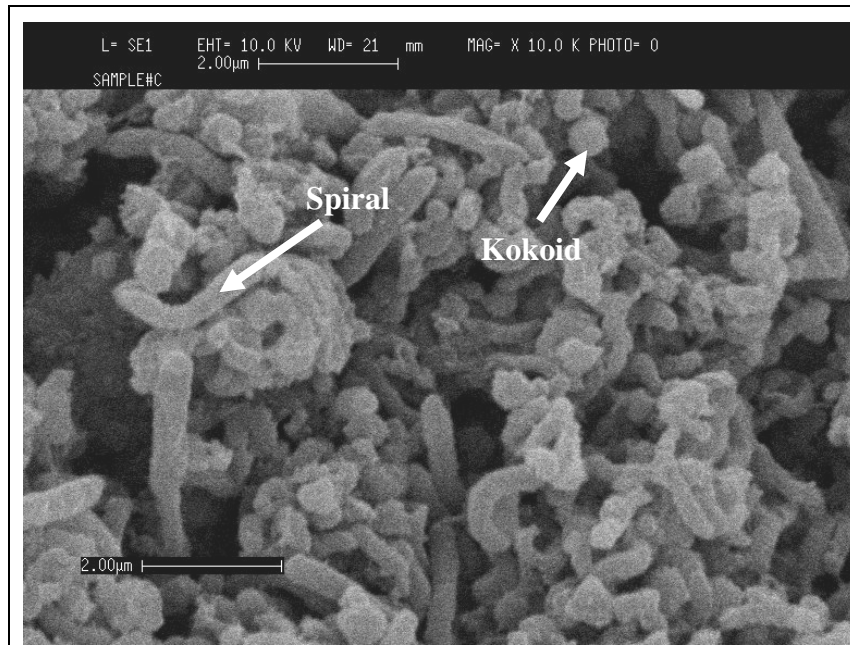


(c) Morfologi *H. pylori* pada 48 jam dengan rawatan 1 µg/ml

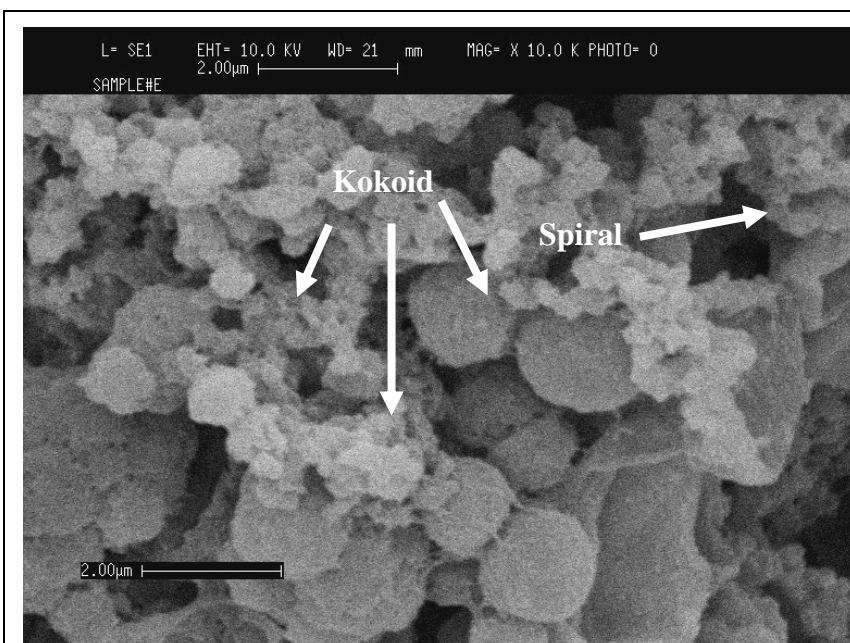


(d) Morfologi *H. pylori* pada 48 jam dengan rawatan 4 µg/ml.

Plat 6.1: sambungan

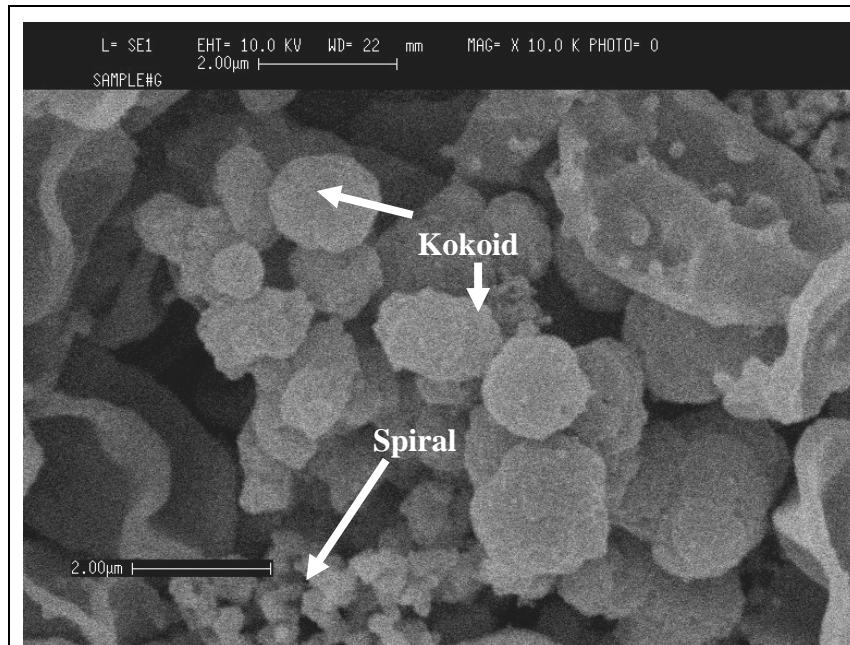


(e) Morfologi *H. pylori* pada 48 jam tanpa rawatan

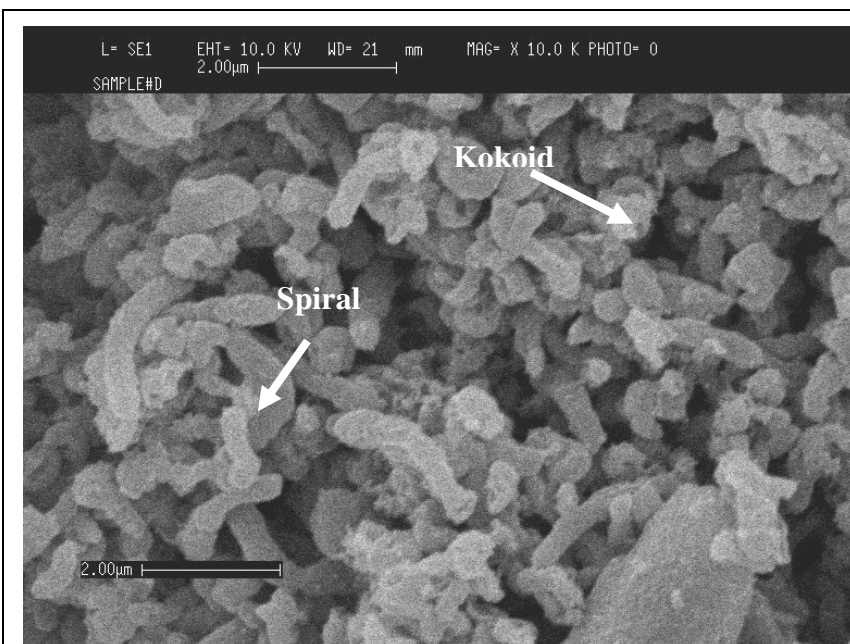


(f) Morfologi *H. pylori* pada 84 jam dengan rawatan 1 µg/ml.

Plat 6.1: sambungan



(g) Morfologi *H. pylori* pada 84 jam dengan rawatan 4 µg/ml.



(h) Morfologi *H. pylori* pada 84 jam tanpa rawatan

Plat 6.1: sambungan

6.4 **PERBINCANGAN**

Nilai MIC₉₀ fraksi F2 iaitu antara 8-16 µg/ml dan MIC₅₀ iaitu 2-4 µg/ml adalah lebih tinggi berbanding MIC₉₀ (2-4 µg/ml) dan MIC₅₀ (1-2 µg/ml) bagi ekstrak KLO. Nilai ketoksikan fraksi F2 secara perbandingannya adalah rendah iaitu LC₅₀ 966 µg/ml bagi fraksi F2 dan 1.1 µg/ml bagi ekstrak KLO.

Nilai MIC₉₀ dan MIC₅₀ fraksi F2 hampir menyamai nilai antibiotik yang biasa digunakan terhadap *H. pylori*. Oleh itu kepentingan untuk melihat akan nilai-nilai MIC bagi bahan-bahan tersebut menjadi penting. Dalam kajian ini, MIC₉₀ tetrasiklin terhadap *H. pylori* ialah antara 16-32 µg/ml, manakala MIC₉₀ amoksisilin terhadap patogen yang sama ialah antara 0.24-0.48 µg/ml. Hanya MIC₉₀ metronidazola yang melebihi kepekatan 40 µg/ml. Manakala, nilai MIC₅₀ tetrasiklin dan amoksisilin terhadap *H. pylori* ialah kurang daripada 1 µg/ml, tetapi MIC₅₀ metronidazola melebihi 40 µg/ml. Sebagai perbandingan, MIC terhadap *H. pylori* bagi rabeprazole ialah 2.25 mg/L, lansoprazole 42.5 mg/L, esomeprazole 360 mg/L (He *et al.*, 2003), metronidazola 8 µg/ml dan Klaritomisin 1 µg/ml (Eun *et al.*, 2003). MIC₅₀ esomeprazole terhadap *H. pylori* ialah 16 mg/L manakala MIC₉₀ ialah 32 mg/L (Gatta *et al.*, 2003).

MIC₉₀ fraksi F2 adalah lebih baik berbanding dengan MIC₉₀ tetrasiklin yang biasa digunakan dalam rawatan anti *H. pylori* terutamanya dalam terapi ganda empat. Walaubagaimanapun *H. pylori* rintang terhadap metronidazola pada kepekatan yang tinggi iaitu lebih besar daripada 40 g/ml sedangkan MIC yang kurang daripada 8 µg/ml telah dikira sebagai rintang (Eun *et al.*, 2003 ;

Proctor *et al.*, 2003). Walaubagaimanapun didalam kes ini nilainya telah mencapai kepada 40 µg/ml. Di negara tropika, kerintangan terhadap metronidazole memang menjadi masalah besar dan mengganggu keberkesanan rawatan (Teo *et al.*, 2000). Di Malaysia secara khusus, masalah ini memang sudah ada dilaporkan (Parasakthi dan Goh, 1992; Goh, 2002).

Di dalam kajian hitungan hidup *H. pylori* tumbuh dengan baiknya pada 24 jam pertama peneraman di dalam medium kawalan. Ini mencadangkan yang kultur yang digunakan merupakan kultur yang kompeten. Akan tetapi di dalam medium yang mengandungi fraksi F2 (2 µg/ml dan 4 µg/ml) *H. pylori* gagal dikulturkan pada masa 24 jam peneraman. Penemuan *H. pylori* yang masih lagi wujud dalam bentuk spiral dalam kajian hitungan langsung, mencadangkan yang *H. pylori* berbentuk spiral sudah tidak dapat membentuk koloni atau dianggap mati. Keputusan ini menggambarkan yang fraksi F2 (2 µg/ml dan 4 µg/ml) adalah bersifat bakteriasid.

Pada kepekatan 1 µg/ml fraksi F2, tindakannya tidak sehebat pada kepekatan 2 µg/ml dan 4 µg/ml. Pada kepekatan 1 µg/ml fraksi F2 membunuh secara perlahan-lahan dan pada 84 jam tidak dapat dikulturkan sedangkan dengan hitungan langsung, bentuk spiral masih lagi dapat diperhatikan. Keadaan ini mencadangkan yang spiral itu tidak dapat membentuk koloni atau dianggap mati. Oleh itu kajian ini membuktikan bahawa dengan kepekatan yang rendah *H. pylori* masih dapat membentuk koloni selepas 24 jam pendedahan kepada fraksi F2, sebaliknya pada kepekatan yang tinggi, pertumbuhan tidak dapat dilihat lagi. Ini mencadangkan bahawa fraksi F2 merencat pertumbuhan *H. pylori* disebabkan oleh tindakan bahan yang terdapat di dalam fraksi F2.

Pada pemerhatian menerusi mikroskop elektron pensakanan (SEM), bentuk asas *H. pylori* iaitu spiral dapat dilihat dengan banyaknya pada sampel tanpa fraksi F2, disamping bentuk kokoid yang juga wujud pada keadaan ini. Apabila diberi fraksi F2 bentuk spiral masih wujud, namun begitu bentuk kokoid mula menguasai keadaan dan amat sukar untuk melihat bentuk spiral.

6.5 KESIMPULAN.

Nilai MIC₅₀ dan MIC₉₀ fraksi F2 adalah setanding dengan antibiotik yang digunakan dalam rawatan *H. pylori*. *H. pylori* rintang terhadap metronidazola dengan nilai MIC lebih besar (>40 µg/ml). Fraksi F2 membunuh sel spiral dan menghalang pembentukan koloni secara langsung pada kepekatan 2 µg/ml dan 4 µg/ml tetapi pada kepekatan 1 µg/ml ia juga didapati mampu membunuh secara langsung namun pada kadar yang perlahan. Kajian menggunakan mikroskop elektron pensakanan (SEM) membuktikan yang sel spiral masih mempunyai struktur luaran yang kelihatan tidak rosak walaupun diberikan fraksi F2.

7 FRAKSI F2 : PENGESAHAN KEHADIRAN KUMPULAN ALKALOID DAN KEAKTIFAN ANTI-*H. PYLORI* OLEH DUA PECAHANNYA.

7.1 PENGENALAN AM

Dalam kajian yang dilakukan dalam Bab 4, 5 dan 6, keberkesanan fraksi F2 sebagai anti-*H. pylori* dengan nilai MIC₉₀ jauh lebih rendah daripada nilai ketoksikannya. Malah, ia juga didapati mengandungi alkaloid berdasarkan ujian kimia dan warna yang diberikan apabila cahaya ultralembayung dikenakan kepadanya dalam turus kromatografi.

Terdapat beberapa kumpulan alkaloid yang terdiri daripada kuinin, alkaloid tropani, alkaloid ergot, alkaloid morfin, vinkristin dan lain lain lagi. Kumpulan-kumpulan ini diasingkan mengikut struktur-struktur yang dibentuk oleh sebatian yang terbabit. Kebanyakan alkaloid utama dan stukturanya diulas oleh Kutchan (1995).

Untuk mengenal pasti struktur asas kumpulan alkaloid yang mungkin terdapat di dalam fraksi F2, maka kita harus mengetahui spektrum jisim bahan tersebut. Oleh itu dengan menggunakan Kromatografi Gas - Spektrofotometer Jisim (GC-MS) dan Kromatografi Cecair - Spektrofotometer Jisim (LC-MS) sebatian yang wujud dalam fraksi F2 berdasarkan spektrum jisimnya dapat dikenal pasti. GC-MS digunakan untuk menyisahkan sebatian yang meruap dalam fraksi F2 manakala LC-MS pula digunakan untuk menyisahkan bahan yang tidak meruap.

Keputusan yang diperolehi daripada langkah-langkah ini akan dirujuk dengan perpustakaan spektrum jisim. Oleh itu, kita akan dapat mengetahui

struktur bahan dalam fraksi F2 jika ianya mempunyai nilai yang sama dalam perpustakaan berkenaan. Sebaliknya kita hanya akan dapat mengetahui akan struktur bahan fraksi F2 secara andaian dengan mencari spektrum jisim yang hampir dengannya.

Sejenis bahan yang digunakan dalam kemoterapi iaitu Docataxel dikaji strukturnya dengan menggunakan LC-MS (Daniel *et al.*, 2002). Dalam kajian ini fraksi F2 dilarutkan dengan MET kerana GC-MS hanya boleh menerima pelarut MET yang tidak sifat air tetapi polarnya setanding air. Semasa menjalankan kajian pada LC-MS, terdapat dua lapisan yang terbentuk hasil daripada tindakbalas MET dengan sebatian F2. Maka, dalam kajian ini F2 dibahagikan kepada dua komponen iaitu komponen A dan B dan kedua-dua komponen ini disuntik ke dalam turus. Di samping itu kajian asas iaitu, ujian pembauran cakera untuk menentukan komponen mana yang mempunyai sifat anti *H. pylori* juga dijalankan.

Objektif kajian ini adalah; pertama, untuk mengesahkan fraksi F2 mengandungi alkaloid dengan menentukan jenis kumpulan alkaloid dengan menggunakan GC-MS dan LC-MS; kedua, menentukan keaktifan bahan daripada pecahan fraksi F2 akibat tindakbalas MET semasa menjalankan ujian LC-MS.

7.2 **BAHAN DAN KAEDAH**

7.2.1 Kaedah Kromatografi Gas- Spektrofotometer Jisim (GC-MS)

Komposisi sebatian kimia di dalam ekstrak dan peratusannya seterusnya dianalisis menggunakan kaedah GC-MS di P.P.Sains Kimia, USM. Alat Spektrofotometer digunakan untuk mengenal pasti komponen-komponen yang terkandung di dalam ekstrak ini dengan menyisihkannya berdasarkan jisim molekul. Setiap molekul daripada komponen yang berbeza akan meruap lalu menghasilkan puncak bergantung kepada pergerakan relatif yang akan dikesan oleh Spektrofotometer. Molekul berjisim rendah akan bergerak lebih cepat dan menghasilkan puncak pada masa yang lebih awal berbanding molekul yang lebih tinggi berat jisimnya. Pergerakan puncak-puncak telah dicetak ke atas kertas menggunakan sistem pencetak berkomputer. Puncak elusi telah dibandingkan dengan masa penahanan sebatian piawai dan data daripada perpustakaan GC-MS. Data yang mempunyai persamaan melebihi 70% adalah dianggap sebagai molekul atau sebatian yang tepat bagi puncak tersebut.

Penyediaan alat GC-MS dan ujikaji adalah seperti berikut. Alat GC-MS model GC-14A (Shimadzu, Jepun) dengan turus kapilari silika-terikat Supelco sepanjang 30 m dan berdiameter dalaman 0.25 mm telah distabilkan mengikut piawai. Alat pengesan pengionan nyala (FID) dihubungkan kepada pemprosesan data C-R6A (Chromatopac, Jepun). Suhu dinaikkan pada kadar 70⁰C per 1 minit, kemudian 4⁰C per minit sehingga ke 200⁰C. Suhu dibiarkan stabil selama 30 minit. Masa penahanan telah ditetapkan 1 minit dan 4 minit pada peringkat awal dan akhir pemisahan masing-masing. Gas pembawa adalah helium yang dialirkan pada kadar 1.50 kg/cm³, dan hidrogen pada kadar 0.65

kg/cm³. Kadar aliran udara termampat ialah pada 0.60 kg/cm³. Suhu di dalam alat penyuntik dan FID telah dicatatkan pada 250⁰C. Larutan ekstrak dilarutkan di dalam MET pada kepekatan 50 mg/ml lalu disuntik ke dalam alat penyuntik dengan isipadu suntikan 0.5 –1.0 µl.

7.2.2 Kaedah Kromatografi Cecair- Spektrofotometer Jisim (LC-MS)

LC-MS digunakan untuk menentukan kandungan bahan yang ada dalam fraksi F2. Pelarut yang digunakan sebagai fasa bergerak adalah asetonitril-air (Fisher Chemicals, U.K) dan disimpan dalam sistem pam Spectra System P400 (Finnigan LCQ Duo, USA). Pelarut ditentukan untuk menghasilkan pemecahan sebatian yang efektif. Peratus asetonitril yang digunakan bermula dari 0% hingga 90%(i/i) dalam masa 20 minit dengan kadar kelajuan 0.2 ml/mm pada suhu bilik (27 ± 2 °C) dalam bekas fasa bergerak Spectra System SCM1000 (Finnigan LCQ Duo, USA). Pada fasa tetap turus RP – 18 (100 x 2.1 mm, ODS Hypersil, 5 µm, Hewlett Packard) digunakan. Sebanyak 50 µl komponen fraksi F2 *Derris trifoliata* disuntik masuk ke dalam injektor Spectra System AS300 (Finnigan LCQ Duo, USA) dan ianya akan diasing atau dipecahkan di dalam sistem kromatografi cecair. Sebatian yang dihasilkan oleh pecahan tersebut dapat dikesan oleh detektor ultralembayung Spectra System UV600LP (Finnigan LCQ Duo, USA) pada jarak gelombang 220 nm mengikut turutan kepada spektrum jisim (MS).

Jisim spektrum fraksi F2 diperolehi dengan ESI (Electro Spray Ionization) MS detector (Finnigan LCQ Duo, USA). Spektrofotometer jisim dihubungkan dengan kromatografi cecair melalui permukaan semburan kelajuan ion pada suhu 200 °C. Pengionan berjaya sampai ke mod positif

dengan semburan permukaan ion pada voltan pengionan 4.5 kV. Di dalam sistem ini, gas nitrogen tulen (99.99%) telah digunakan pada 5×10^{-4} Pa. Software Xcalibur (Finnigan LCQ Duo, USA) digunakan untuk perolehan dan penilaian data.

7.2.3 Penentuan Kadar Perencatan Komponen A Dan B Terhadap *H. pylori* Dengan Menggunakan Kaedah Pembauran Cakera.

Dalam ujian ini, bahan dan kaedah yang sama diterangkan dalam Bab 2 digunakan dengan menggantikan ekstrak dengan komponen A dan B. Dalam Bab ini, fraksi F2 yang dilarutkan dengan MET telah menghasilkan mendakan dan dengan menggunakan pengempar, dua lapisan dapat dipisahkan. Supernatan telah dilabelkan sebagai komponen A dan palet yang diampaiakan telah dilabelkan sebagai komponen B.

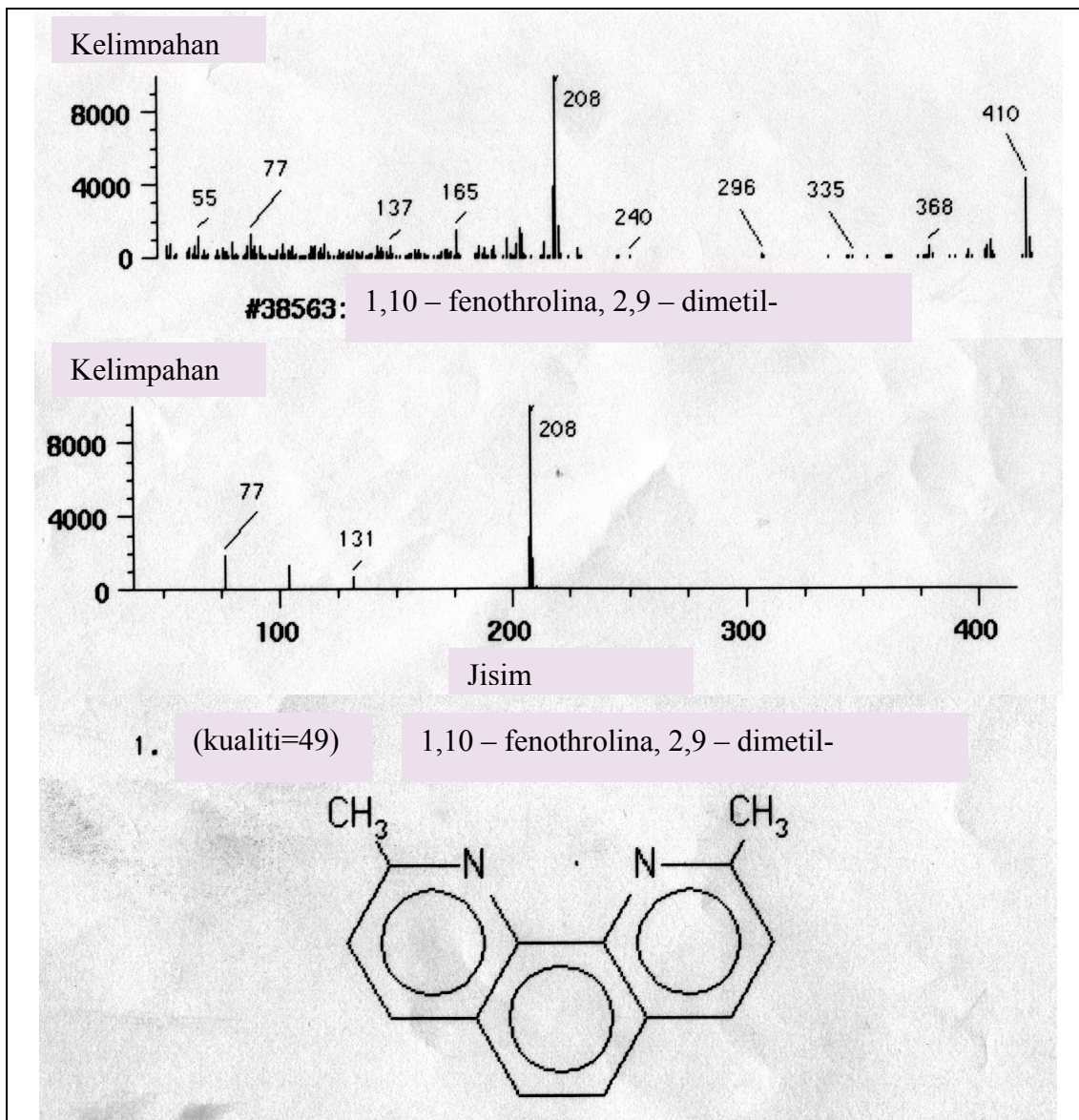
7.3 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

7.3.1 Analisis Kromatografi Gas Spektrofotometer Jisim (GC-MS)

Fraksi F2 telah disisihkan dengan menggunakan GC-MS untuk mengenalpasti sebatian-sebatian meruap yang terdapat di dalam fraksi berkenaan. Rajah 7.1 dan 7.2 menunjukkan dua corak spektrum jisim yang diperolehi berserta dengan perbandingan dengan data perpustakaan GC-MS. Keputusan ini menunjukkan terdapat dua sebatian meruap yang diperolehi daripada fraksi berkenaan.

Rajah 7.1 menunjukkan spektrum jisim bagi sebatian yang telah dikenalpasti mempunyai 49% persamaan dengan masa retensi 2.498 hingga 2.751 min. Walaubagaimanapun sebatian ini didapati mempunyai 2 puncak ion maksimum iaitu pada 410 dan 208. Daripada rujukan perpustakaan GC-MS, 1,10 – fenothrolina, 2,9 – dimetil- pula mempunyai spektrum jisim maksimum 208 (Jadual 7.1). Ini mencadangkan kemungkinan dua struktur ini bergabung bersama bagi menghasilkan spektrum jisim 410.

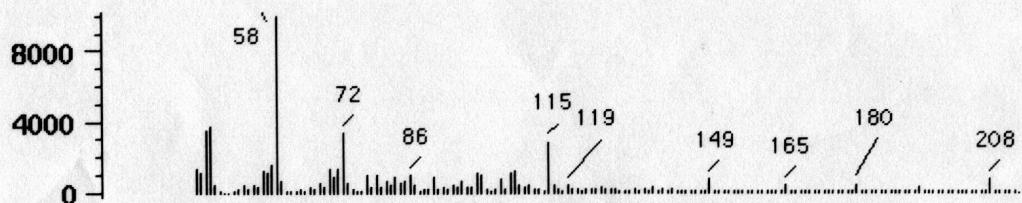
Rajah 7.2 pula menunjukkan sebatian meruap kedua yang dikenalpasti adalah pada masa retensi 0.749 hingga 1.005 min, dengan 59% persamaan. Tetapi corak spektrum jisim yang ditunjukkan adalah sama. Pecahan ion yang ditunjukkan oleh sebatian ini adalah 115, diikuti oleh 86.72 dan 58. Daripada perpustakaan GC-MS sebatian ini dikenalpasti sebagai N,N,-dietil asetamida (Jadual 7.1).



Rajah 7.1 : Sebatian 1,10 – fenothrolina, 2,9 – dimetil- daripada rujukan perpustakaan GC-MS

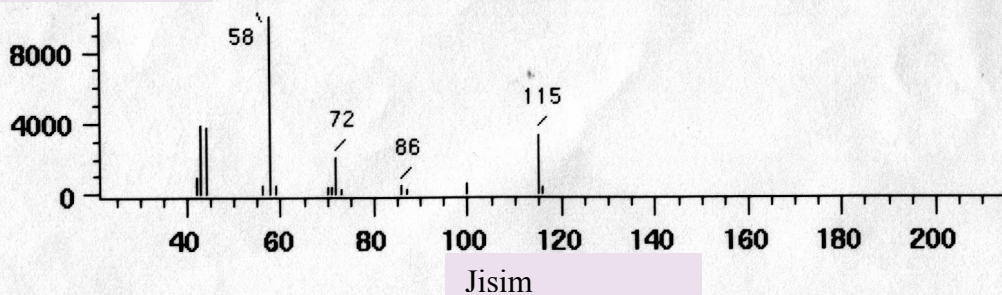
Average of 0.749 to 1.005 min. from 45.6421-MS.d SCALED

Kelimpahan



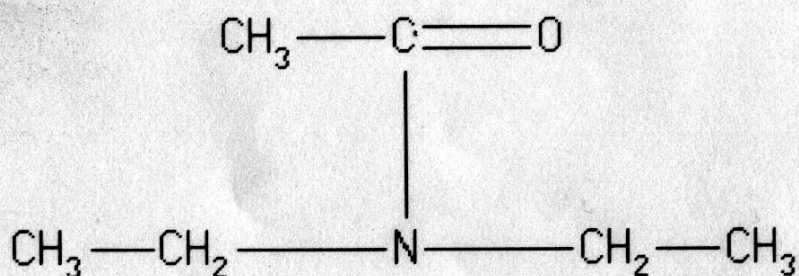
#116621: N,N,-dietil asetamida

Kelimpahan



Jisim

1. (kualiti=59) N,N,-dietil asetamida



Rajah 7.2 : Sebatian N,N,-dietil asetamida daripada rujukan perpustakaan GC-MS

Jadual 7.1 : Berat molekul, formula empirikal, corak pemecahan ion dan nama sebatian yang terdapat dalam F2.

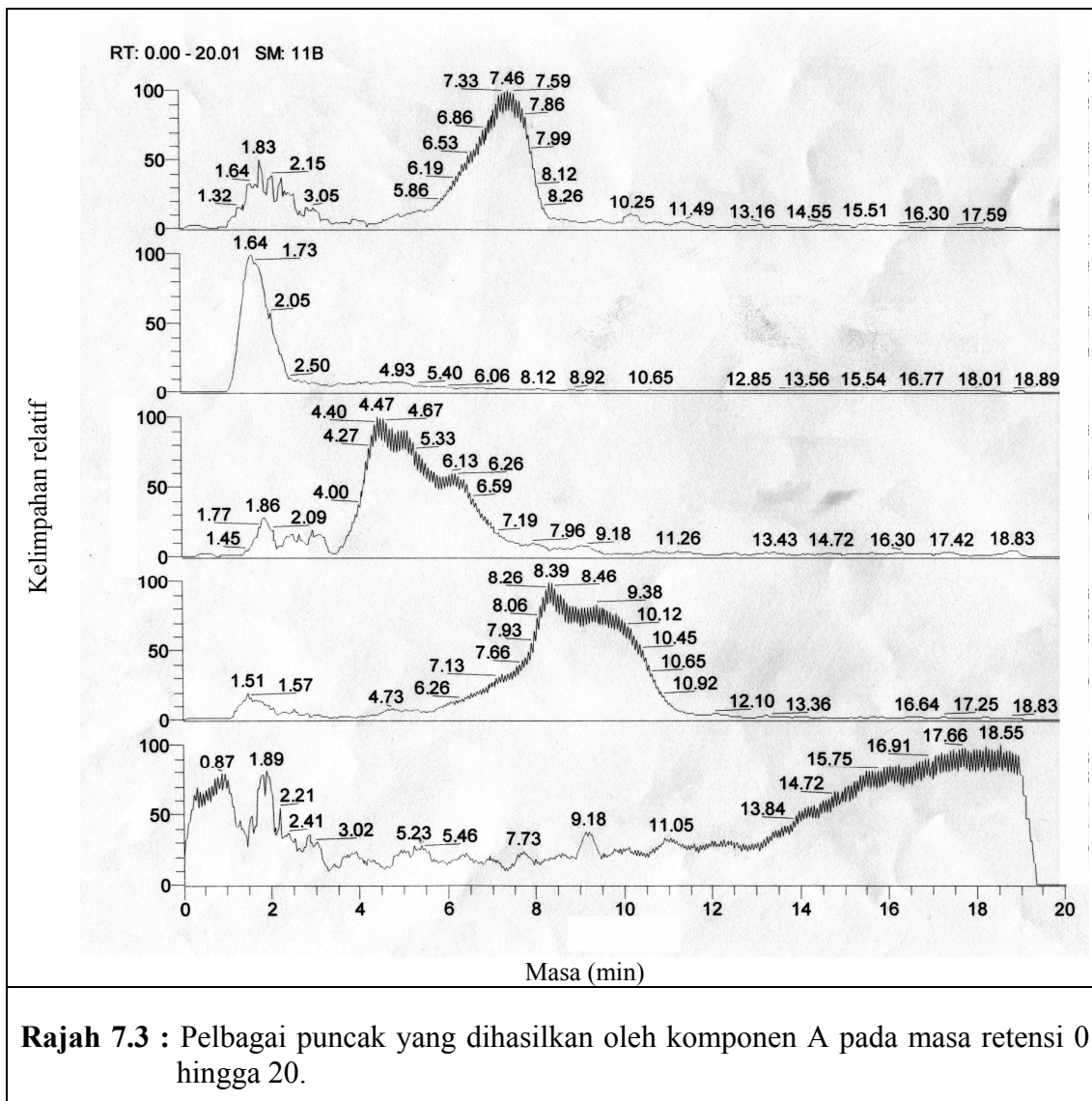
G/raja	Masa retensi (min)	Berat Molekul	Formula empirikal	Corak pemecahan ion	Nama sebatian
7.3.1	2.498-2.751	208	C ₁₄ H ₁₂ N ₂	208,105,137,77,55.	1,10 – fenonthrolina, 2,9 – dimetil
7.3.2	0.749-1.005	115	C ₆ H ₁₃ NO	115,86,72,58	N,N,-dietil asetamida.

7.3.2 Analisis Kromatografi Cecair Spektrofotometer Jisim (LC-MS)

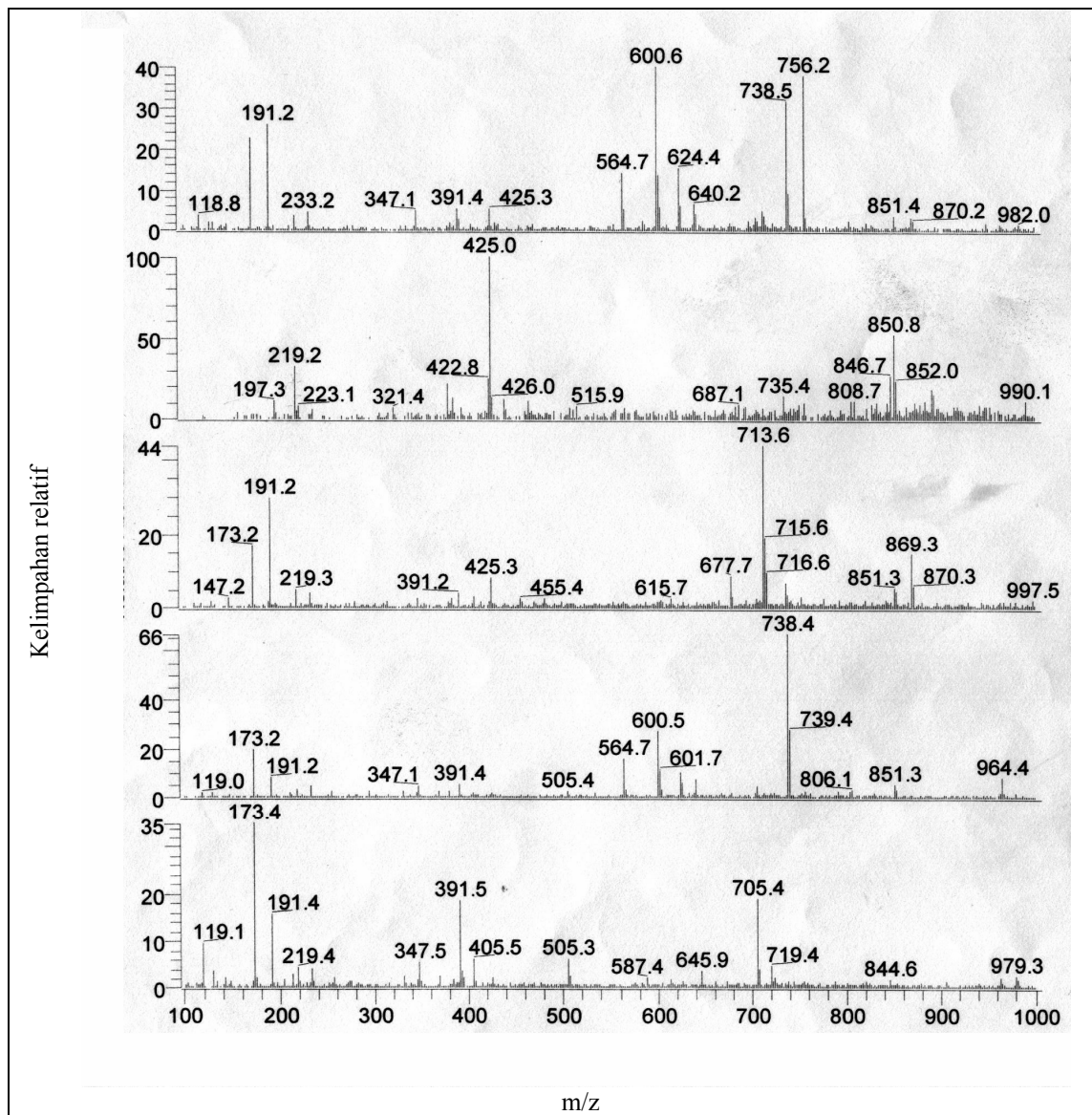
Komponen A didapati menghasilkan 5 puncak pada masa retensi yang berbeza dan puncak yang paling utama diperolehi pada masa retensi 1.64 hingga 2.50 (Rajah 7.3). Puncak-puncak lain mempunyai julat masa retensi yang agak luas dan ini menyebabkannya tidak begitu tajam. Corak pemecahan ion dan spektrum jisim maksimum bagi setiap puncak yang diperolehi daripada LC-MS ini ditunjukkan dalam Rajah 7.4. Empat puncak, mempunyai spektrum jisim maksimum lebih daripada 700, tetapi pada puncak bagi masa retensi 1.64 hingga 2.50 (Rajah 7.5), ia mempunyai spektrum jisim maksimum pada 425 (Rajah 7.6) serta mempunyai puncak kromatografi yang amat jelas dan tajam.

Sebatian ini mungkin merupakan terbitan atau gabungan sebatian meruap yang diperolehi daripada keputusan GC-MS iaitu sebatian 1,10 – fenonthrolina, 2,9 – dimetil. Gabungan sebatian ini membentuk struktur yang lebih kompleks yang mempunyai berat molekul semaksimum 990 yang mana menurut data perpustakaan GC-MS ia adalah pennogenin 3-0- γ -L-rhamropiranosid- (1-2)-B-D-glucosilpranosid asetat. Akan tetapi pengkalan data Institut Piawai dan Teknologi Kebangsaan, (NIST USA) memaklumkan bahawa berat molekul 425 adalah berkemungkinan sebatian difenoksin (424.53) atau oktanamida, N,N'-1,10-dekanidelbis (424.70) atau asid benzoik, 2,4,6-trinitro, dodesil ester (425.18) atau bis-3-(triethoxysily) propilamine (425.71) atau tetra-iso-amilammonium iodide (425.47) atau tetrapentilammonium iodide (425.47).

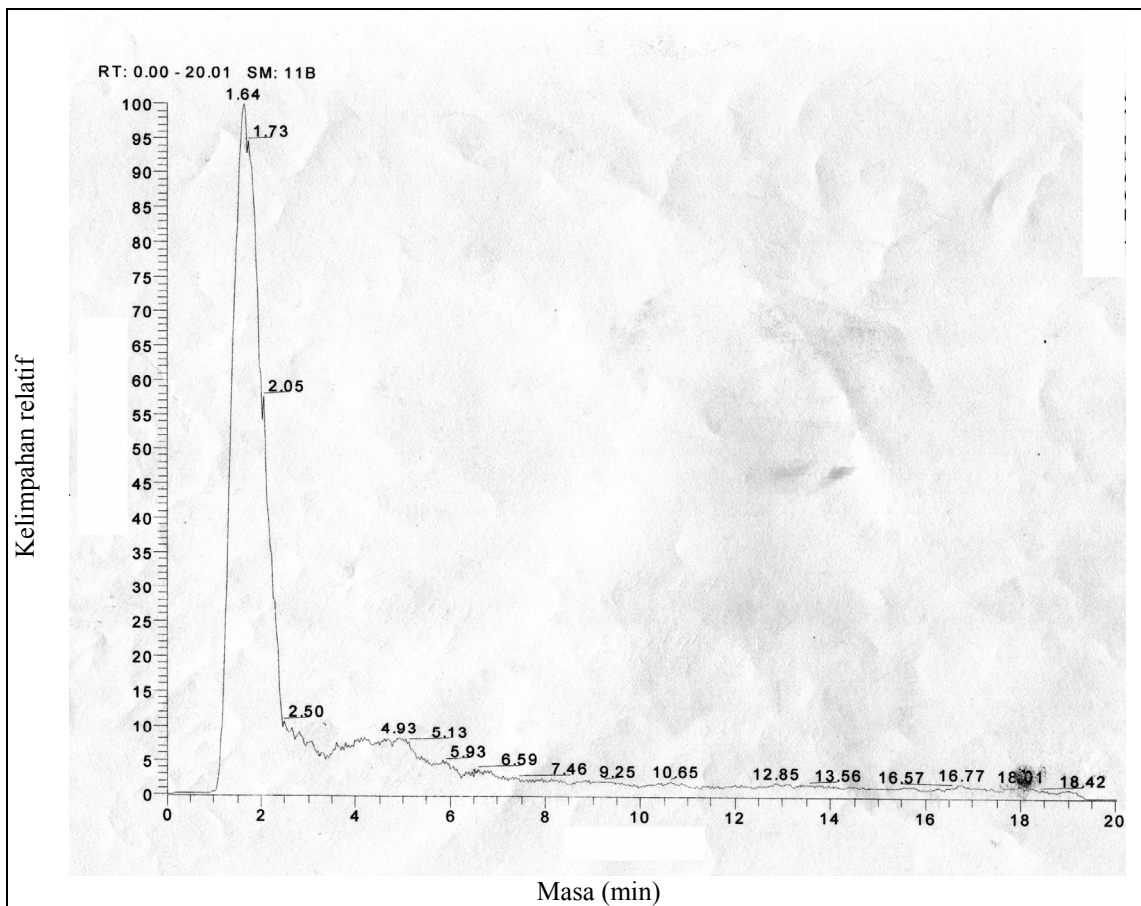
Berpandukan kepada pengkalan data NIST USA yang menggunakan nilai berat molekul, corak pemecahan ion, masa retensi dan formula empirikal, kelima-lima puncak yang berjaya disisihkan adalah daripada komponen A (Jadual 7.2), dicadang penamaan sebatian.



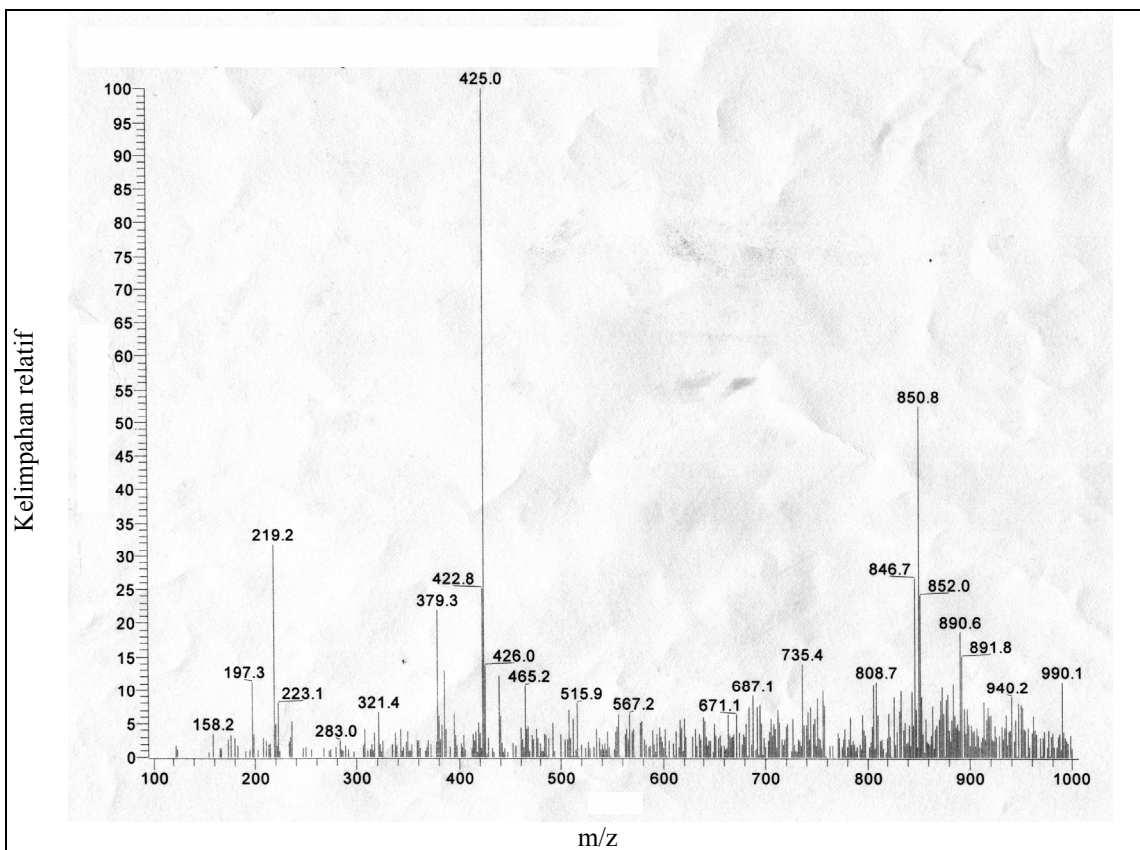
Rajah 7.3 : Pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen A pada masa retensi 0 hingga 20.



Rajah 7.4 : Spektrum jisim pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen A daripada Rajah 7.3



Rajah 7.5 : Puncak yang paling tajam dan jelas yang dihasilkan oleh komponen A pada masa retensi 0 hingga 20.



Rajah 7.6 : Spektrum jisim puncak yang paling tajam dan jelas yang dihasilkan oleh komponen A daripada Rajah 7.5

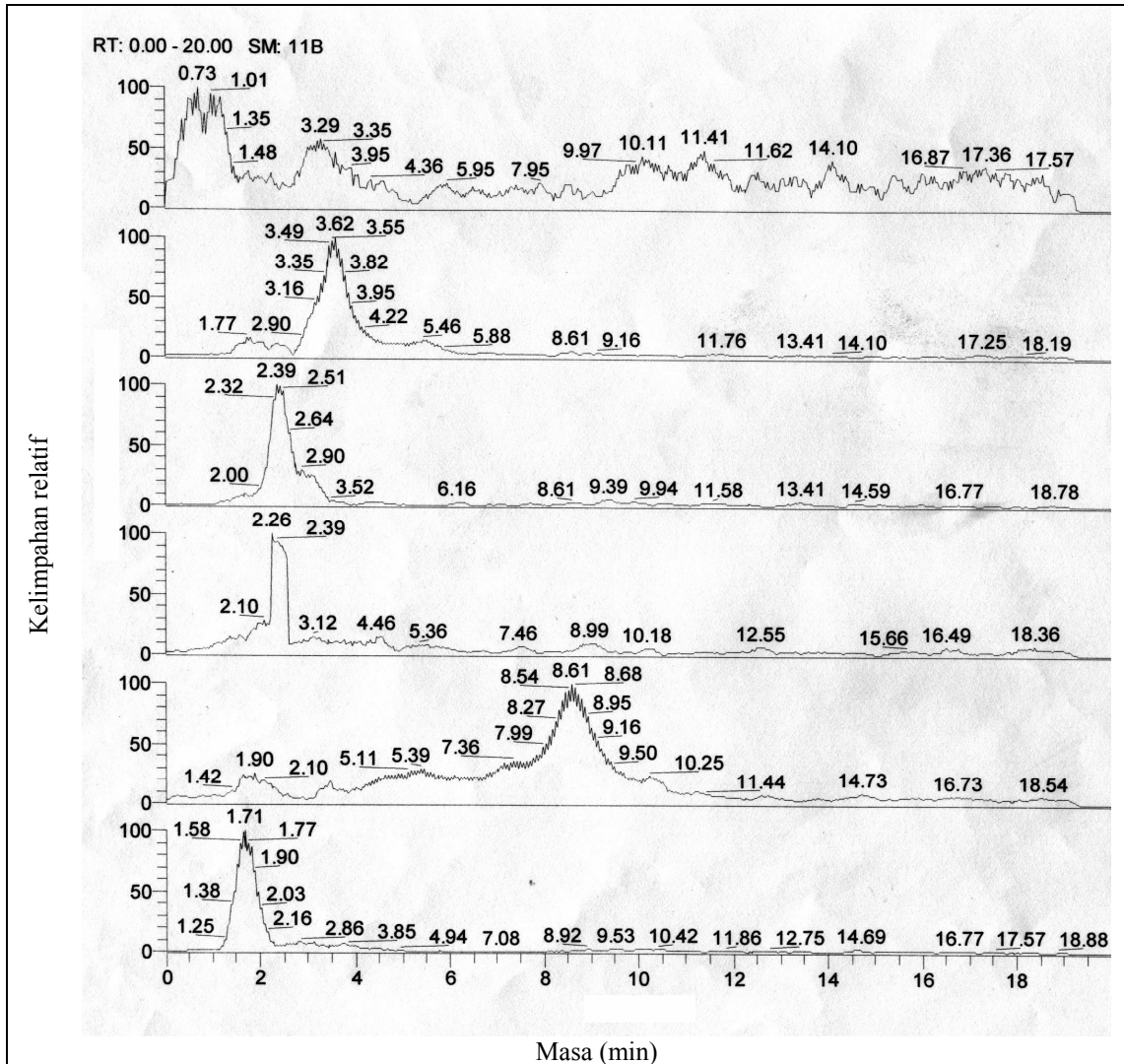
Jadual 7.2 : Berat molekul, formula empirikal, corak pemecahan ion dan nama sebatian yang terdapat dalam komponen A (LC-MS)

	Masa retensi	Berat molekul	Formula empirikal yang dicadangkan	Corak pemecahan ion.
1.	5.86-8.26	756.5	Tiada maklumat	756, 738.5, 640.2, 624.4
2.	1.64 - 2.50	850.8 - 425.0	$C_{28}H_{28}N_2O_2$ (Difenosin)	850.8, 846.7,
3.	4.00 – 7.19	713.6	$C_{21}H_6N_{12}O_{18}$ (2,4,6-Tripicryltriazine)	713.6, 677.7, 615.7
4.	7.13 – 10.92	738.4	$C_{32}H_{72}CdCl_4N_2$ (Bis-hexadecylammonium tetrachlorocadmium)	738.4, 601.7, 600.5
5.	13.84 – 18.55	705.4	Tiada maklumat	705.4, 645.9

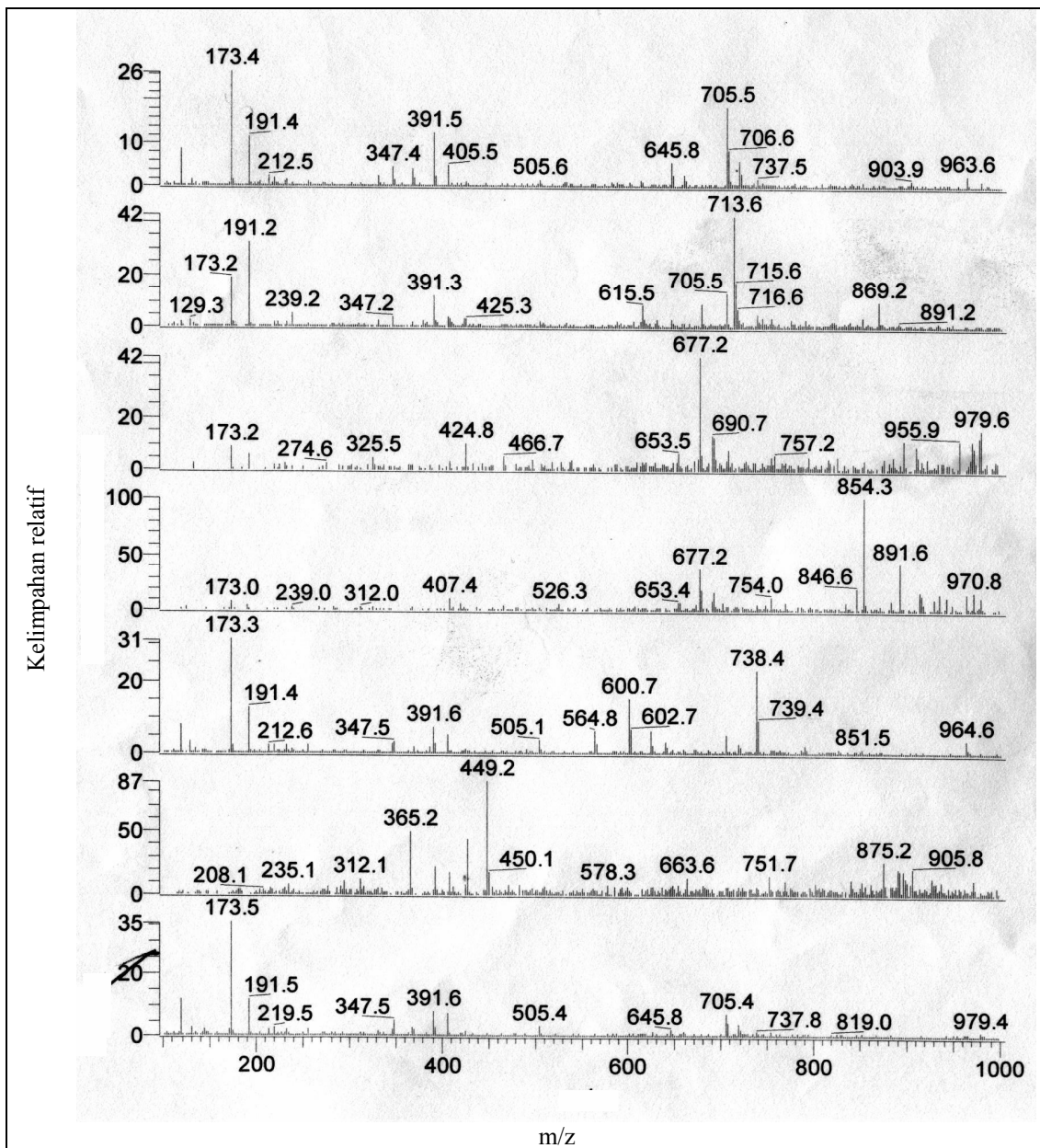
Bagi komponen B pada lapisan bawah yang terdiri daripada mendakan putih yang diampaikan, 6 puncak berjaya disisihkan (Rajah 7.7). Akan tetapi ia menunjukkan banyak sebatian dan bercampur memandangkan puncak-puncak yang dihasilkan adalah terlalu banyak dan masa retensi untuk keenam-enam puncak ini ialah 0 hingga 20. Manakala Rajah 7.8 menunjukkan corak pemecahan ion-ion spektrum jisim maksimum bagi keenam-enam puncak tersebut.

Berdasarkan maklumat pengkalan data NIST USA, penamaan sebatian dicadangkan mengikut nilai berat molekul. Satu senarai ringkas nilai berat molekul, corak pemecahan ion, masa retensi dan formula empirikal keenam-enam puncak yang berjaya disisihkan daripada komponen B ini (Jadual 7.3) dilakukan.

Walaupun bagaimanapun kajian yang lebih lanjut dan terperinci adalah diperlukan bagi membuktikan kehadiran sebatian-sebatian tersebut. Untuk membuat sesuatu penekanan dengan menggunakan data spektrum jisim, kita tidak boleh hanya bergantung kepada nilai spektrum jisim maksimum sahaja. Perbandingan corak spektrum dengan data perpustakaan spektrum adalah perlu bagi mengenal pasti sebatian yang diperolehi secara tentatif. Namun begitu, untuk kajian ini perbandingan tidak dapat dijalankan memandangkan LC-MS yang digunakan tidak disertakan dengan perpustakaan data.



Rajah 7.7 : Pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen B pada retensi masa 0 hingga 20.



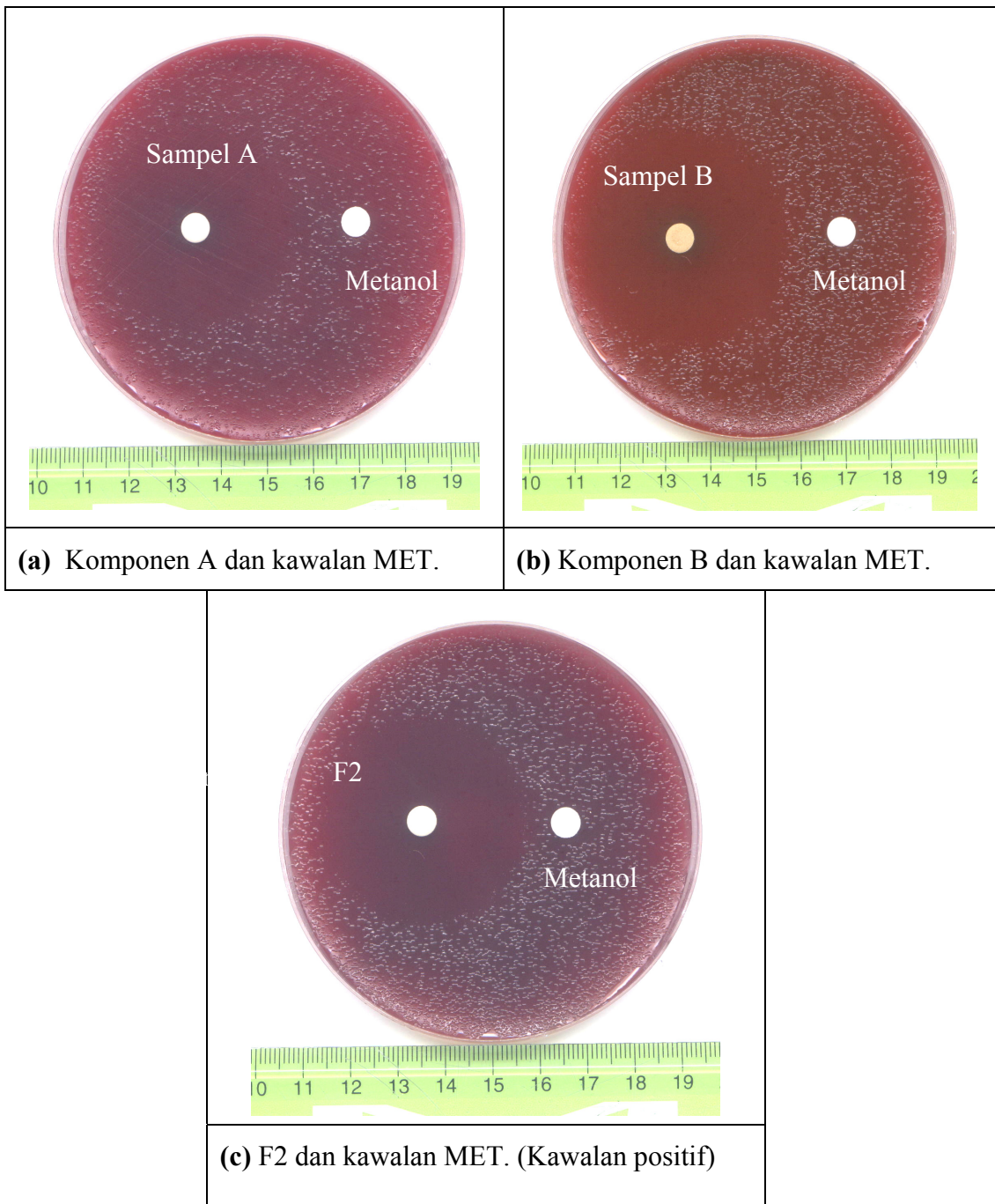
Rajah 7.8 : Spektrum jisim pelbagai puncak yang dihasilkan oleh komponen B daripada Rajah 7.7

Jadual 7.3 : Berat molekul, formula empirikal, corak pemecahan ion dan nama sebatian yang terdapat dalam komponen B (LC-MS)

	Masa retensi	Berat molekul	Formula empirikal yang dicadangkan.	Corak pemecahan ion.
1.	0.00-1.48	173.4	$C_9H_{23}N_3$ 3,3'-Bis(methylamino)-n-methyldipropylamine	173.4
2.	2.90 – 4.22	713.6	$C_{21}H_6N_{12}O_{18}$ 2,4,6-tripicryltriazine	713.6, 705.5, 615.5
3.	2.00 – 3.52	677.2	$C_{15}H_3F_{18}FeO_6$ Iron tris (1,1,1,5,5,5-hexafluoroacetylacetate)	677.2, 653.5, 466.7
4.	2.10 – 3.12	854.3	Tiada maklumat	854.3, 846.6, 754.0
5.	7.36 – 9.50	173.3	$C_{10}H_{25}N_2^+$ 1,10-Diaminodecane, protonated	173.3
6.	7.36 – 9.50	449.2	$C_{13}H_{30}CoNO_8P_2$ Bis(triethylphosphite(p))cobalt carbonyl nitrosyl)	449.2, 365.2, 312.1

7.3.3 Pemerhatian Diameter Perencatan Pertumbuhan *H. pylori*

Komponen A dan B yang diasingkan daripada fraksi F2 memberikan diameter perencatan *H. pylori* yang agak berbeza iaitu diameter perencatan komponen B adalah lebih besar daripada komponen A dengan perbezaan sekitar 6 mm. Berdasarkan keputusan yang diperolehi, komponen A memberikan nilai 40.00 ± 2.00 mm (Plat 7.1a), manakala komponen B memberikan nilai 46.00 ± 1.00 mm (Plat 7.1b). Sebagai kawalan positif, F2 memberikan bacaan 42.00 ± 1.00 mm (Plat 7.1c). Ini menunjukkan komponen B adalah lebih aktif sebagai bahan anti-*H. pylori*. Walaubagaimanapun komponen B masih tidak tulen berdasarkan keputusan LC-MS.



Plat 7.1 : Kesan komponen A dan komponen B daripada fraksi F2 dan fraksi F2 (kawalan) terhadap *H. pylori* dengan ujian pembauran cakera.

7.4 KESIMPULAN.

Daripada kajian yang dilakukan ini, masih terdapat banyak sebatian yang hadir dalam komponen A atau B, walaupun telah dipisahkan daripada fraksi F2. Komponen B yang dipisahkan daripada F2 lebih berkesan merencat pertumbuhan *H. pylori* berbanding dengan komponen A atau fraksi F2. Berbanding dengan komponen A, satu puncak yang jelas dan tajam serta hampir tulen sebatianya diperolehi daripada GC-MS dan LC-MS.

Walaupun bagaimanapun sebatian – sebatian tersebut adalah daripada kumpulan alkaloid berdasarkan kepada kehadiran unsur nitrogen dan ikatan secara cecincin (ring binding). Oleh itu kajian lanjut perlu dibuat untuk menentukan identiti sebatian alkaloid yang sebenarnya wujud dalamnya.

8 PERBINCANGAN UMUM DAN WAWASAN

Kaedah pengekstrakan sebatian kimia daripada sampel tumbuhan dengan pelarut kimia seperti PE, KLO, MET dan menggunakan air suling mendatangkan impak yang baik. Daripada kajian yang dijalankan, tidak dinafikan banyak tumbuhan tempatan mempunyai kesan anti-*H. pylori*. Oleh itu pemilihan tumbuhan untuk kajian selanjutnya merupakan satu perkara yang paling penting. Walaupun membaaur dengan baik dan menghasilkan diameter perencatan besar, hal ini tidak bermakna jika kuantiti ekstrak per cakera adalah tinggi. Ini berbeza bagi pembentukan diameter perencatan yang kecil dan hanya memerlukan kuantiti ekstrak per cakera yang sedikit.

Hasil ekstrak tumbuh-tumbuhan yang diperolehi daripada Bab 2 adalah tidak sama, oleh itu susah hendak diseragamkan kuantiti ekstrak per cakera. Namum dalam kajian ini, nisbah diameter perencatan : kuantiti ekstrak per cakera (mg) digunakan untuk memilih tumbuhan bagi kajian lanjut. Nisbah yang tertinggi dipilih. Berdasarkan isu ini, maka *D. trifoliata* dipilih untuk kajian selanjutnya walaupun secara mutlak, ada ekstrak tumbuhan lain yang diameter perencatannya yang lebih besar, tetapi memerlukan kuantiti ekstrak per cakera yang banyak. Oleh yang demikian, nisbahnya adalah rendah. Diameter zon perencatan oleh ekstrak KLO batang *D. trifoliata* ialah sekitar 42 mm. Keputusan ini mungkin difaktorkan oleh kehadiran juzuk-juzuk atau komponen sebatian yang terkandung di dalam sampel batang di mana ia berupaya memberikan kesan bakteriosid. Mengikut Chaves *et al.*, (1999), *H. pylori* dikatakan rintang jika diameter zon perencatannya adalah kurang daripada 16 mm, perantaraan jika diameter itu di antara 16 mm hingga 21 mm dan sensitif jika diameter perencatan lebih daripada 21 mm. Oleh itu, ada kewajarannya dalam memilih *D. trifoliata* sebagai sampel untuk kajian selanjutnya.

Dengan memilih tumbuhan *D. trifoliata* kita dapat menghasilkan satu lagi bahan yang bersifat anti-*H. pylori* daripada tumbuhan tradisional yang digunakan oleh masyarakat tempatan dalam merawat penyakit. Tumbuhan ini tumbuh dengan banyak dan meliar dikawasan paya bakau. Ianya digunakan oleh orang asli di negeri Terengganu dalam merawat penyakit batu karang dan sakit perut. Cara penggunaannya adalah dengan merebus batang tumbuhan ini di dalam air sehingga mendidih dan terhasil separuh daripada isipadu asal. Setelah sejuk atau suam-suam kuku barulah airnya diminum untuk rawatan tadi. Walaubagaimanapun dalam kajian ini, pengekstrakan untuk mendapatkan bahan-bahan atau sebatian-sebatian yang wujud di dalamnya dijalankan dengan menggunakan pelarut.

Pada peringkat awal kajian, ekstrak kasar daripada *D. trifoliata* didapati memberikan diameter perencatan yang sangat besar terhadap *H. pylori* walaupun kuantiti ekstrak per cakera adalah rendah. Masalah juga timbul apabila ekstrak kasar tersebut juga merencat pertumbuhan bakteria patogen lain yang diuji. Ini membuktikan yang ia tidak mempunyai sifat memilih dalam tindakan terhadap *H. pylori*. Malah, ia juga begitu toksik dengan nilai LC_{50} sebegitu rendah iaitu pada 1.1 $\mu\text{g/ml}$.

Ekstrak kasar yang diperolehi dengan menggunakan sesuatu pelarut organik itu mengandungi pelbagai bahan. Oleh itu pengujian kehadiran kandungan kimia perlu dilakukan. Keputusan yang diperolehi menunjukkan bahawa terdapat banyak sebatian di dalam ekstrak kasar berkenaan. Dengan tumpuan yang diberikan kepada alkaloid, satu kaedah pengasingan perlu dilakukan pada ekstrak kasar daripada KLO. Ini kerana bahan tersebut hadir dalam ekstrak kasar berkenaan. Tambahan pula, ekstrak ini menghasilkan diameter perencatan dan nisbah (diameter perencatan : kuantiti ekstrak per cakera) yang besar terhadap *H. pylori*.

Kaedah kromatografi lapisan nipis digunakan pada peringkat awal bagi mencari pelarut dan gabungan yang terbaik bagi memfraksinasi ekstrak kasar berkenaan. Daripada kajian ini gabungan pelarut yang terbaik iaitu toluena, etil asetat dan dietilamina dengan nisbah 7:2:1 dipilih. Sebanyak lima fraksi dihasilkan daripada kegiatan ini.

Dengan mengetahui akan gabungan pelarut dan nisbahnya maka kromatografi terus digunakan untuk mengutip fraksi - fraksi berkenaan. Dengan lima fraksi yang diperolehi daripada ekstrak KLO *D. trifoliata* ini, tiga daripadanya dipercahayai mengandungi alkaloid, iaitu fraksi dua (F2), tiga (F3) dan lima (F5) berdasarkan kepada warna berpendarflour apabila dikenakan cahaya ultralembayung. Manakala fraksi satu (F1) adalah klorofil dan fraksi empat (F4) tidak menunjukkan ciri-ciri alkaloid.

Sekali lagi ujian pembauran cakera dilakukan dan hanya tiga fraksi iaitu F1, F2 dan F3 yang memberikan diameter perencatan yang besar, iaitu setanding atau agak sama dengan yang diberikan oleh ekstrak KLO. Dua lagi fraksi diketepikan oleh kerana menghasilkan diameter perencatan yang lebih kecil daripada yang diberikan oleh ekstrak KLO.

Ujian ketoksikan dan ujian kepekaan bakteria patogen terhadap fraksi F2 menunjukkan yang fraksi F2 tidak memberi kesan kepada bakteria patogen yang lain (yakni spesifik terhadap *H. pylori*) dan F2 juga memberikan nilai LC_{50} yang tinggi (966 $\mu\text{g/ml}$). Keadaan ini mencadangkan yang ketoksikannya adalah rendah dan menghampiri nilai LC_{50} yang dibenarkan oleh Institut Kanser Kebangsaan (NCIUSA) (Cragg *et.al.*, 1994).

Ujian MIC dijalankan bagi melihat tindakan F2 secara lebih persis berdasarkan kepada kepekatan yang berbeza. Ujian ini amat praktikal dilakukan bagi

menganalpasti kepekatan minimum fraksi F2 yang diperlukan untuk merencat sehingga 50% atau 90% daripada pencilan kultur kajian. Dalam kajian ini, sebanyak 45 pencilan klinikal *H. pylori* telah diuji bersama *H. pylori* strain 47 sebagai kawalan.. Daripada ujian ini, F2 mampu merencat sehingga 50% ($MIC_{50} = 2 - 4 \mu\text{g/ml}$) dan sehingga 90%, daripada pencilan kultur ujian ($MIC_{90} = 8 - 16 \mu\text{g/ml}$). Dari sini kita dapat disimpulkan bahawa pada kepekatan yang rendah, fraksi F2 mampu merencat kebanyakan daripada pencilan klinikal.

Dalam kajian mengenai kesan fraksi F2 terhadap pertumbuhan dan perubahan morfologi *H. pylori* di dalam kultur sekelompok, dua aspek yang perlu dititik beratkan ialah perubahan bilangan unit pembentukan koloni per unit masa dan juga perubahan morfologi sel *H. pylori*.

Dalam kajian hitungan hidup, fraksi F2 pada kepekatan melebihi daripada $2 \mu\text{g/ml}$ dan $4 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan kesan yang begitu ketara apabila pertumbuhan *H. pylori* direncat. Sebaliknya pada kepekatan fraksi F2 sebanyak $1 \mu\text{g/ml}$ perencatan pertumbuhan berlaku dengan perlahan-lahan sehingga ke 72 jam pengeraman. Penambahan ekstrak akan sekaligus mengubah morfologi *H. pylori* iaitu akibat daripada pengaruh keadaan medium yang tidak sesuai untuk pertumbuhannya (Nakamura *et al.*, 2000).

Peningkatan bentuk kokoid jelas dalam kajian hitungan langsung pada kesemua tahap kepekatan ujian fraksi F2. Tindakan ekstrak pada kepekatan yang berbeza mampu mempengaruhi kadar perubahan daripada bentuk spiral kepada kokoid (De Loney *et al.*, 1999). Walaubagaimanapun bilangan bentuk spiral masih wujud dengan populasi 10^8 sel/ml.

Memandangkan, struktur perubahan yang berlaku kepada *H. pylori* kajian perlu diteruskan dengan melihat morfologi bakteria ini di bawah mikroskop electron

pensakanan (SEM). Berdasarkan mikrograf SEM, jelas dibuktikan bahawa bentuk kokoid memang banyak terdapat pada kaldu yang diberikan fraksi F2. Walaubagaimanapun bentuk spiral masih dapat dilihat pada keadaan ini dan bentuk spiral yang dilihat pada keadaan ini menjelaskan kepada kita bahawa bentuk spiral yang didapati itu tidak boleh dikulturkan atau sudah mati. Ini mencadangkan yang *H. pylori* mati terus tanpa mengubah bentuk stukturanya akibat tindakan fraksi F2 ini.

Fraksi F2 dipercayai mempunyai sebatian yang dapat merencat sel *H. pylori* secara *in vitro*. Oleh itu ketulenan sebatian yang terlibat serta sebatianannya yang sebenar haruslah dikaji dengan lebih mendalam lagi. Dengan penggunaan alat GC-MS dan LC-MS dapat diketahui akan berat molekul sebatian yang terlibat. Walaubagaimanapun penggunaan peralatan ini adalah terhad kerana GC-MS hanya dapat mengesan sebatian yang boleh meruap manakala LC-MS pula hanya boleh menentukan sebatian dalam bentuk cecair. Walaubagaimanapun berat molekul sahaja tidak dapat menentukan sebatian sebenar bahan yang terbabit. Penulenan sebatian dan penentuan strukturnya dengan menggunakan Nukleor Magnetic Resonance (NMR) adalah perlu. Dengan merujuk kepada Pengkalan Data Institut Piawai dan Teknologi Kebangsaan, USA (NIST), ianya membantu kajian ini dalam menentukan sebatian yang terlibat, berdasarkan berat molekul yang diperolehi.

Dalam kajian ini, alat GC-MS dapat mengesan dua sebatian utama yang wujud dalam F2 ini iaitu 1,10 – fenonthrolina, 2,9 – dimetil dan N,N,-dietil acetamida. Manakala alat LC-MS mengesan banyak jenis sebatian melalui dua komponen yang dipisahkan akibat daripada penggunaan metanol untuk melarut fraksi F2 dalam proses GS-MS. Sebatian yang utama daripada lima sebatian yang dikesan dalam komponen A adalah Difenoksin iaitu berdasarkan pada beberapa ciri yang boleh digunakan dalam menentukan sebatian bahan yang terlibat. Manakala komponen B pula

mempunyai enam sebatian yang bercampur (mempunyai banyak puncak dalam spektrum LC-MS).

Bagi memastikan yang komponen A dan komponen B masih bersifat anti-*H. pylori*, ujian pembauran sekali lagi dijalankan. Keputusan yang diperolehi daripada kajian ini menunjukkan bahawa kedua-dua komponen berkenaan masih mempunyai ciri-ciri antibakteria berkenaan, malah komponen B menghasilkan diameter perencatan yang lebih baik daripada komponen A dan F2. Akan tetapi tahap ketulenannya komponen B tidak sebaik komponen A di mana sebatian yang dikenalpasti secara tentatif sebagai Difenoksin daripada komponen A mempunyai puncak yang paling tinggi dan tajam.

Akhir sekali, kajian ini menunjukkan yang fraksi F2 ekstrak KLO batang *D. trifolita* mengandungi sebatian yang begitu aktif terhadap *H. pylori* secara *in vitro*. Kajian selanjutnya boleh dijalankan dengan mengenalpasti sebatian yang terlibat dengan kaedah yang lebih baik misalnya menggunakan kaedah HPLC untuk mendapatkan sebatian yang lebih tulen dan NMR untuk menentukan jumlah unsur-unsur bahan dalam sebatian tersebut. Jika kita ingin menggunakan fraksi F2 secara terus, ujian kontaminasi logam berat seperti arsenik, merkuri dan plumbum perlu dilakukan dan diikuti dengan ujian tak klinikal seperti ketoksikan dos tunggal, ketoksikan dos ulang, genotoksisiti, karsinogenisiti, penggunaan kultur tisu dan lain-lain lagi yang perlu. Penggunaan haiwan makmal sebagai model bagi ujian *in vivo* untuk ujian preklinikal perlu dilakukan sebelum memasuki fasa pertama ujian klinikal yang terdiri daripada empat fasa. Dengan melepasi fasa ke empat ujian klinikal barulah fraksi ini boleh diktiraf untuk digunakan dalam rawatan jangkitan *H. pylori* pada manusia.

RUJUKAN

- Abbas, S.Z., Abbas, A.B., Crawshaw, A., Shaw, S., English, J., McGovern, D., Vivian, G. and Dalton, H.R. (2003). Diagnosis and eradication of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulceration in the community. *J. Pak. Med. Assoc.* **53**, 90-4.
- Abd. Rahman, M.D. (1998). *Pengenalan Dan Penggunaan Herba Ubatan*. Multi Triple Vision Sdn. Bhd.; 47.
- Adachi, K., Fujishiro, H., Mihara, T., Komazawa, Y. and Kinoshita, Y. (2003). Influence of lansoprazole, famotidine, roxatidine and rebamipide administration on the urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol Hepatol* **18**, 168-71.
- Adachi, K., Ishihara, S., Hashimoto, T., Hirakawa, K., Ishimura, N., Niigaki, M., Kaji, T., Kawamura, A., Sato, H., Fujishiro, H., Hattori, S., Watanabe, M. and Kinoshita, Y. (2001). Efficacy of ecabet sodium for *Helicobacter pylori* eradication triple therapy in comparison with a lansoprazole-based regimen. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1187-91.
- Adamek, R.J., Wegener, M., Birkholz, S., Opferkuch, W., Ruhl, G.H. and Ricken, D. (1992). Modified combined omeprazole/amoxicillin therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a pilot study. *Leber Magen Darm* **22**, 222-4.
- Akcan, Y., Ersan, S., Alper, M., Bicik, Z. and Aytug, N. (2000). The transmission of *Helicobacter pylori* via exposure to common sources outweighs the person-to-person contact among spouses in developing countries. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 317-9.
- al Somal, N., Coley, K.E., Molan, P.C. and Hancock, B.M. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J. R. Soc. Med.* **87**, 9-12.
- Alarcon, T., Domingo, D. and Lopez-Brea, M. (1999). Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12**, 19-26.

- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M. and Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 43-52.
- Azlan, A.A.A., Uyub, A.M. and Shaida, F.S. (2002). *In-vitro* evaluation of *Derris trifoliata* against metronidazole-resistance *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Proceedings of the 25th Microbiology Symposium: Towards Commercialization of Microbiological Research. Renaissance Kota Bharu Hotel 8th-11th September 2002. Organised by Malaysian Society for Microbiology and Universiti Malaya. Edited by Pazilah Ibrahim, Baharuddin, Ab Karim Alias, Wan Nadiah Wan Abdullah & Tengku Sifzizul.*
- Ball, A.P., Gray, J.A. and Murdoch, M.C. (1992). Antibacterial Drugs Today. *International Medical Publishers*; 20-25.
- Battinelli, L., Tita, B., Evandri, M.G. and Mazzanti, G. (2001). Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Farmaco.* **56**, 345-8.
- Bayerdorffer, E., Lonovics, J., Dite, P., Dietsch, U., Domjan, L., Kisfalvi, I., Megraud, F., Pap, A., Sipponen, P., Burman, C.F. and Zeijlon, L. (1999). Efficacy of two different dosage regimens of omeprazole, amoxicillin and metronidazole for the cure of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**, 1639-45.
- Bazzoli, F., Zagari, M., Pozzato, P., Fossi, S., Ricciardiello, G.L., Nicolini, G., De Luca, L., Berretti, D., Maltoni, S., Martuzzi, C. and Roda, E. (1998). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: non-invasive diagnostic tests. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* **30 Suppl 3**, S313-4.
- Behrens, R., Lang, T., Keller, K.M., Bindl, L., Becker, M., Rodeck, B., Kuster, P., Wundisch, G.F. and Stolte, M. (1999) Dual versus triple therapy of *Helicobacter pylori* infection: results of a multicentre trial. *Arch. Dis. Child.* **81**, 68-70.
- Bergogne-Berezin, E. (2000). "Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea." *Int. J. Antimicrob. Agents.* **16**(4): 521-6.

- Bina, J.E., Alm, R.A., Uria-Nickelsen, M., Thomas, S.R., Trust, T.J. and Hancock, R.E. (2000). *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44**, 248-54.
- Blaser, M.J. (1992). Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology.* **102**, 720-7.
- Blaser, M.J. (1999). Where does *Helicobacter pylori* come from and why is it going away? *Jama.* **282**, 2260-2.
- Blaser, M.J. and Kirschner, D. (1999). Dynamics of *Helicobacter pylori* colonization in relation to the host response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 8359-64.
- Blaser, M.J., Chyou, P.H. and Nomura, A. (1995). Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer. Res.* **55**, 562-5.
- Bode, G., Mauch, F. and Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* **111**, 483-90.
- Caceres, A., Lopez, B., Juarez, X., del Aguila, J. and Garcia, S. (1993) Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J. Ethnopharmacol.* **40**, 207-13.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P. and Garcia-Gravalos, M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* **23**; 2(1): 17.
- Cassel-Beraud, A.M., Le Jan, J., Mouden, J.C., Andriantsoa, M. and Andriantsiferana, R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity in vitro of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Arch. Inst. Pasteur. Madagascar.* **59**, 9-23. (English abstract)
- Cellini, L., Di Campli, E., Masulli, M., Di Bartolomeo, S. and Allocati, N. (1996). Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 273-7.

- Chan, F.K., Sung, J. J., Chung, S.C., To, K.F., Yung, M.Y., Leung, V.K., Lee, Y.T., Chan, C.S., Li, E.K. and Woo, J. (1997). Randomised trial of eradication of *Helicobacter pylori* before non-steroidal anti-inflammatory drug therapy to prevent peptic ulcers. *Lancet*. **350**, 975-9.
- Chaves, S., Gadanho, M., Tenreiro, R. and Cabrita, J. (1999). Assessment of metronidazole susceptibility in *Helicobacter pylori*: statistical validation and error rate analysis of breakpoints determined by the disk diffusion test. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1628-31.
- Chen, T.S., Chang, F.Y. and Lee, S.D. (1997). Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection: comparison and correlation between enzyme-linked immunosorbent assay and rapid serological test results. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 184-6.
- Chen, T.S., Chang, F.Y. and Lee, S.D. (2002). No difference of accuracy between capillary and venous blood in rapid whole blood test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.* **47**, 2519-22.
- Chong, J., Marshall, B.J., Barkin, J.S., McCallum, R.W., Reiner, D.K., Hoffman, S.R. and O'Phelan, C. (1994). Occupational exposure to *Helicobacter pylori* for the endoscopy professional: a sera epidemiological study. *Am. J. Gastroenterol.* **89**, 1987-92.
- Cole, S.P., Cirillo, D. Kagnoff, M.F., Guiney, D.G., Eckmann, L.(1997). Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. *Infect Immune*; **65**: 843-846.
- Coudron, P.E. and Stratton, C.W. (1998). In-vitro evaluation of nitrofurantoin as an alternative agent for metronidazole in combination antimicrobial therapy against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 657-60.
- Cragg, G.M., Boyd, M.R., Cardellina, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M. and McCloud, T.G. (1994). Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. *Ciba. Found. Symp.* **185**, 178-90; discussion 190-6.
- Daniel, L.G., Micheal, E.L., Joseph, A.Z., Mark, W.D., Scott, N.H., Scoot, A.P. and Gail, S.E. (2002). Analysis of docetaxel pharmacokinetics in humans with the

- inclusion of later sampling time-points afforded by the use of a sensitive tandem LCMS assay. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* **52**: 159-166.
- Davids, W., Gamielien, J., Liberles, D.A. and Hide, W. (2002). Positive selection scanning reveals decoupling of enzymatic activities of carbamoyl phosphate synthetase in *Helicobacter pylori*. *J. Mol. Evol.* **54**, 458-64.
- de Boer, W.A. and Tytgat, G.N. (2000). Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Brit. Med. J.* **320**, 31-4.
- De Loney, C.R. and Schiller, N.L. (1999). Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**, 2702-9.
- De Loney, C.R. and Schiller, N.L. (2000). Characterization of an In vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44**, 3368-73.
- Dore, M.P., Osato, M.S., Realdi, G., Mura, I., Graham, D.Y. and Sepulveda, A.R. (1999). Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 47-54.
- Dorrell, N., Crabtree, J.E. and Wren, B.W. (1998). Host-bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Trends. Microbiol.* **6**, 379-82.
- Eisig, J.N., Andr, S.B., Silva, F.M., Hashimoto, C., Moraes-Filho, J.P. and Laudanna, A.A. (2004). The impact of *Helicobacter pylori* resistance on the efficacy of a short course pantoprazole based triple therapy. *Arq. Gastroenterol.* **40**, 55-60.
- Eun, C.S., Han, D.S., Park, J.Y., Jeon, Y.C., Hahm, J.S., Kim, K.S. and Kang, J.O. (2003). Changing pattern of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korean patients with peptic ulcer diseases. *J. Gastroenterol.* **38**, 436-41.
- Fabry, W., Okemo, P. and Ansorg, R. (1996a). Activity of east African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy.* **42**, 315-7.

- Fabry, W., Okemo, P., Mwatha, W. E., Chhabra, S.C. and Ansorg, R. (1996b). Susceptibility of *Helicobacter pylori* and *Candida* spp. to the east African plant *Terminalia spinosa*. *Arzneimittelforschung*. **46**, 539-40.
- Fasihuddin, A., Hasmah, R. (1993). *Kimia Hasil Semulajadi dan tumbuhan Ubatan*. Dewan Bahasa dan Pustaka; 139-203.
- Fennerty, M.B. (1994). *Helicobacter pylori*. *Arch. Intern. Med.* **154**, 721-7.
- Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S. and Nomura, T. (2002). Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life. Sci.* **71**, 1449-63.
- Fung, W.P. (1975). Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J. Clin. Pathol.* **28** : 639-646.
- Gadhi, C.A., Benharref, A., Jana, M. and Lozniewski, A. (2001). Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts. *J. Ethnopharmacol.* **75**, 203-5.
- Gatta, L, Perna, F, Figura, N, Ricci, C, Holton, J, D'Anna, L, Miglioli, M, Vaira, D. (2003). Antimicrobial activity of esomeprazole versus omeprazole against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51(2)**: 439-42.
- Gene, E., Calvet, X., Azagra, R. and Gisbert, J.P. (2003). Triple vs quadruple therapy for treating *Helicobacter pylori* infection: an updated meta-analysis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18**, 543-4.
- Germano, M.P., Sanogo, R., Guglielmo, M., De Pasquale, R., Crisafi, G. and Bisignano, G. (1998). Effects of *Pteleopsis suberosa* extracts on experimental gastric ulcers and *Helicobacter pylori* growth. *J. Ethnopharmacol.* **59**, 167-72.
- Glupczynski, Y., Bourdeaux, L., Verhas, M., DePrez, C., DeVos, D. and Devreker, T. (1992). Use of a urea breath test versus invasive methods to determine the prevalence of *Helicobacter pylori* in Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 322-7.
- Glupczynski, Y., Burette, A. (1990). Drug therapy for *Helicobacter pylori* infection: problems and pitfalls. *Am. J. Gastroenterol.* **85**, 1545-51.

- Goddard, A.F. (1998). Getting to the route of *Helicobacter pylori* treatment. *J Antimicrob. Chemother.* **42**, 1-3.
- Goggin, P.M., Collins, D.A., Jazrawi, R.P., Jackson, P.A., Corbishley, C.M., Bourke, B.E. and Northfield, T.C. (1993). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and its effect on symptoms and non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastrointestinal damage in patients with rheumatoid arthritis. *Gut.* **34**, 1677-80.
- Goh, K.L. (1997). Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a multi-racial dyspeptic Malaysian population undergoing endoscopy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, S29-35.
- Goh, K.L. (2002). Update on the management of *Helicobacter pylori* infection, including drug-resistant organisms. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 482-7
- Goh, K.L. & Parasakthi, N. (2001). The racial cohort phenomenon: seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a multiracial South-East Asian country. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 177-83.
- Goodwin, C.S., Amstrong, J.A., Chilvers, T. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov. and *Helicobacter pylori* Comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:397-405
- Graham, D.Y. (1998). Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology.* **115**, 1272-7.
- Graham, D.Y., Go, M.F. and Evans, D.J., (1992). Review article: urease, gastric ammonium/ammonia, and *Helicobacter pylori* - the past, the present, and recommendations for future research. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **6**, 659-69.
- Graham, D.Y., Klein, P.D., Evans, D.G., Evans, D.J., Jr., Alpert, L.C., Opekun, A., Jerdack, G.R. and Morgan, D.R. (1991). Simple noninvasive method to test efficacy of drugs in the eradication of *Helicobacter pylori* infection: the example of combined bismuth subsalicylate and nitrofurantoin. *Am. J. Gastroenterol.* **86**, 1158-62.

- Graham, D.Y., Osato, M.S., Hoffman, J., Opekun, A.R., Anderson, S.Y., Kwon, D.H. and El-Zimaity, H.M. (2000). Metronidazole containing quadruple therapy for infection with metronidazole resistant *Helicobacter pylori*: a prospective study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**, 745-50.
- Graham, D.Y., Rakel, R.E., Fendrick, A.M., Go, M.F., Marshall, B.J., Peura, D.A. and Scherger, J.E. (1999). Practical advice on eradicating *Helicobacter pylori* infection. *Postgrad. Med.* **105**, 137-40, 145-8.
- Hamasaki, N., Higuchi, K., Hamaguchi, M., Tominaga, K., Takashima, T., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Kadota, S., Ishii, E., Kobayashi, K. and Arakawa, T. (2002). In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 547-52.
- Hamasaki, N., Ishii, E., Tominaga, K., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Kadota, S., Kuroki, T. and Yano, I. (2000). Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from a Chinese herbal medicine, Gosyuyu (Wu-Chu-Yu), against *Helicobacter pylori* in vitro. *Microbiol. Immunol.* **44**, 9-15.
- Han, S.R., Bhakdi, S., Maeurer, M.J., Schneider, T. and Gehring, S. (1999). Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2740-1.
- Harries, A.D., Stewart, M., Deegan, K.M., Mughogho, G.K., Wirima, J.J., Hommel, M., Hart, C.A. (1992). *Helicobacter pylori* in Malawi, central Africa. *J. Infect.* **24**: 269-276
- Harris, P.R., Mobley, H.L., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. and Smith, P.D. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology.* **111**, 419-25.
- Hazell, S.L. (1999). Will *Helicobacter pylori* be the next organism for which we will have exhausted our treatment options? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 83-6.

- Hazell, S.L. and Lee, A. (1986). *Campylobacter pyloridis* and gastritis : association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect.* **153**, 658-663.
- Heilmann, K.L. and Borchard, F. (1991). Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut.* **32**, 137-40.
- Delgado, H.P., Feria, R.M., Castro, R.R., Olivares, M.F.J., Rodriguez, G.B., Bautista, P.F.J. and Gutierrez, H.J.M. (2002). Ranitidine bismuth citrate in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **94**, 19-24.
- Hirschl, A.M. and Rotter, M.L. (1996). Amoxicillin for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol.* **31 Suppl 9**, 44-7.
- Ho, S.A., Hoyle, J.A., Lewis, F.A., Secker, A.D., Cross, D., Mapstone, N.P., Dixon, M.F., Wyatt, J.I., Tompkins, D.S. and Taylor, G.R. (1991). Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2543-9.
- Howard, A.B (1983) *Herbal extracts*. The Blue Goose Press, USA.
- Howden, C.W. and Hunt, R.H. (1998). Treating *Helicobacter pylori*. *Arch. Intern. Med.* **158**, 2396-8.
- Hua, J., Ng, H.C., Yeoh, K.G., Ho, K.Y. and Ho, B. (1998). Characterization of clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Singapore. *Microbios.* **94**, 71-81.
- Hyde, D.K., Lee, J., Buckley, M., Breslin, N., Keane, C.T. and Ca, O.M. (1999) Evaluation of antral biopsies used in the rapid urease test for *Helicobacter pylori* culture. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 73-5.
- Ichikawa, Y., Mitsuhashi, M., Ishikawa, T., Wyle, F., Chang, K., Fujiwara, Y., Arakawa, T., Shimada, H. & Tarnawski, A. (1996). Laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **91**, 117-28.

- Ingolfsson, K., Hjalmarsdottir, M.A., Sigurdsson, A., Gudjonsdottir, G.A., Brynjolfsdottir, A. and Steingrimsson, O. (1997). In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolicheterinic acid from the lichen *Cetraria islandica*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**, 215-7.
- Itoh, T., Tamegane, T., Ohmae, Y. and Nakayama, S. (1998). Malignant lymphoma occurring in a patient with neurofibromatosis type 1 (von Recklinghausen disease). *Rinsho. Ketsueki.* **39**, 698-702. (English abstract)
- Jones, N.L., Shabib, S. and Sherman, P.M. (1997). Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 223-7.
- Jones, D.M., Eldridge, J., Fox, A.J., Sethi, P. and Whorwell, P.J. (1986). Antibody to gastric *Campylobacter* like organism (*C.pyloridis*)- Clinical correlations and distribution in the normal population. *J. Med. Microbiol.* **22**,57-62.
- Kadota, S., Basnet, P., Ishii, E., Tamura, T. and Namba, T. (1997). Antibacterial activity of trichorabdal A from *Rabdosia trichocarpa* against *Helicobacter pylori*. *Zentralbl Bakteriologie* **286**, 63-7.
- Kalach, N., Bergeret, M., Benhamou, P.H., Dupont, C. and Raymond, J. (2001). High levels of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains in children. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 394-7.
- Kaldov, J., Tee, W., McCarthy, P., Watson, J. & Dwyer, B.(1985). Immune response to *C. pyloridis* in patients with peptic ulceration. *Lancet.* **1**,921
- Kamarudin Mat Salleh, M. Nazri Saleh and A. Latiff (2002). *Tumbuhan Ubatan Malaysia*. Bangi: Pusat Pengurusan Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia. 371.
- Kaya, I. S., Dilmen, U. & Diker, S. (1990). Helicobacter pylori, peptic ulcer, and cimetidine. *Mayo Clin Proc* **65**, 1274-5.
- Keto, Y., Ebata, M. and Okabe, S. (2001). Pharmacological study on the pathological changes of the gastric mucosa in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Nippon. Yakurigaku. Zasshi.* **118**, 259-68. (English abstract)

- Kim, N., Lim, S. H., Lee, K.H., Koo, M.S., Kim, J.M., Hwang, J.H., Kim, J.W., Lee, D.H., Jung, H.C. and Song, I.S. (2003). Retreatment of *Helicobacter pylori* infection with triple therapy after initial treatment failure. *Korean. J. Gastroenterol.* **42**, 195-203. (English abstract)
- Kim, S.Y., Choi, Y.H., Huh, H., Kim, J., Kim, Y.C. and Lee, H.S. (1997). New antihepatotoxic cerebroside from *Lycium chinense* fruits. *J. Nat. Prod.* **60**, 274-6.
- Kokki, M., Maki, M., Vaalajahti, P., Karvonen, A.L., Kosunen, T.U., Juutinen, K. and Haira, V.M. (1990). Screening of *H. pylori* antibodies using a latex agglutination test. *Pylori News* (Penerbitan ini dicetak bersama-sama dengan kit komersial Pyloriset).
- Krishnamurthy, P., Parlow, M., Zitzer, J.B., Vakil, N.B., Mobley, H.L., Levy, M., Phadnis, S.H. and Dunn, B.E. (1998). *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect. Immun.* **66**, 5060-6.
- Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van Strip, J.A. and Vandenbroucke-Grauls, C.M. (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* **65**, 3672-9.
- Kutchan, T. (1995). Alkaloid biosynthesis. *The. Plant. Cell.* **7**: 1059-1070.
- Labenz, J., Leverkus, F. and Borsch, G. (1994). Omeprazole plus amoxicillin for cure of *Helicobacter pylori* infection. Factors influencing the treatment success. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**, 1070-5.
- Lai, K.C., Lau, C.S., Ip, W.Y., Wong, B.C., Hui, W.M., Hu, W.H., Wong, R.W. & Lam, S.K. (2003). Effect of treatment of *Helicobacter pylori* on the prevention of gastroduodenal ulcers in patients receiving long-term NSAIDs: a double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **17**, 799-805.
- Laupattarakasem, P., Houghton, P.J., Hoult, J.R. and Itharat, A. (2003). An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J. Ethnopharmacol.* **85**, 207-15.

- Lee, A. (1994). The microbiology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **201**, 2-6.
- Lehours, P. (2003). *Helicobacter pylori* and the others. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **27**, 367-73.
- Li, Q.X., Tang, H.A., Li, Y.Z., Wang, M., Wang, L.F. and Xia, C.G. (2000). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of novel Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) complexes with vitamin K3-thiosemicarbazone. *J. Inorg. Biochem.* **78**, 167-74.
- Parra, L.A., Yhebra, S.R., Sardinias, G.I. and Buela, I.L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* **8**, 395-400.
- Lopez-Brea, M., Martinez, M.J., Domingo, D. and Alarcon, T. (2001). A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 295-7.
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I. & Takahashi, T. (1999). In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**, 1788-91.
- Madan, E., Kemp, J., Westblom, T.U., Chaffin, J. and Foster, A.M. (1990). Histologic characteristics of *Campylobacter pylori* (*Helicobacter pylori*) mediated gastritis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **20**, 329-36.
- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A. and Chadwick, L.R. (2003). In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytother. Res.* **17**, 217-21.
- Majmudar, P., Shah, S.M., Dhunjibhoy, K.R. and Desai, H.G. (1990). Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian. J. Gastroenterol.* **9**, 271-2.

- Mapstone, N.P., Lynch, D.A., Lewis, F.A., Axon, A.T., Tompkins, D.S., Dixon, M.F. and Quirke, P. (1993). Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol.* **46**, 540-3.
- Marshall, B., Howat, A.J. and Wright, P.A. (1999). Oral fluid antibody detection in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Med. Microbiol.* **48**, 1043-6.
- Marshall, J.K., Armstrong, D. and O'Brien, B.J. (2000). Test and treat strategies for *Helicobacter pylori* in uninvestigated dyspepsia: a Canadian economic analysis. *Can. J. Gastroenterol.* **14**, 379-88.
- Marshall, B. & Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulcer ulceration. *Lancet.* **I**, 1311-1314.
- Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2003). Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 715-9.
- Matsukawa, Y., Aoki, M., Nishinarita, S., Sawada, S., Horie, T., Kato, K., Kawamura, Y., Kawamura, F., Arakawa, Y., Kurosaka, H., Morita, K., Ohtsuka, E., Oribe, M., Nakano, M. & Kitami, Y. (2003). Prevalence of *Helicobacter pylori* in NSAID users with gastric ulcer. *Rheumatology. (Oxford)* **42**, 947-50.
- McNulty, C.A. and Wyatt, J.I. (1999). ACP. Best practice no 154. February 1999. *Helicobacter pylori. J. Clin. Pathol.* **52**, 338-44.
- McNulty, C.A., Nair, P., Watson, B.E., Uff, J.S. and Valori, R.M. (1999). A comparison of six commercial kits for *Helicobacter pylori* detection. *Commun. Dis. Public. Health.* **2**, 59-63.
- Megraud, F. (2001). Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug. Resist. Update.* **4**, 178-86.
- Megraud, F., Occhialini, A. and Doermann, H.P. (1997). Resistance of *Helicobacter pylori* to macrolides and nitroimidazole compounds. The current situation. *J. Physiol. Pharmacol.* **48 Suppl 4**, 25-38.

- Misra, V., Misra, S.P., Dwivedi, M. and Singh, P.A. (1997). Point prevalence of peptic ulcer and gastric histology in healthy Indians with *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* **92**, 1487-91.
- Miyamoto, M., Haruma, K., Yoshihara, M., Hiyama, T., Sumioka, M., Nishisaka, T., Tanaka, S. and Chayama, K. (2003). Nodular gastritis in adults is caused by *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.* **48**, 968-75.
- Mizoguchi, H.; Fujioka, T.; Nasu, M. (1999). Evidence for viability of coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol.* **34**, 32-6.
- Moller, H., Heseltine, E. and Vainio, H. (1995). Working group report on schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *Int. J. Cancer.* **60**, 587-9.
- Morel, C., Stermitz, F.R., Tegos, G. and Lewis, K. (2003). Isoflavones as potentiators of antibacterial activity. *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 5677-9.
- Morrison, R.T. and Boyd, A.W. (1992). *Organic Chemistry*, Prentice Hall PTR, UK.
- Nakamura, A., Park, A., Nagata, K., Sato, E.F., Kashiba, M., Tamura, T. and Inoue, M. (2000). Oxidative cellular damage associated with transformation of *Helicobacter pylori* from a bacillary to a coccoid form. *Free. Radic. Biol. Med.* **28**, 1611-8.
- Ndip, R.N., MacKay, W.G., Farthing, M.J. & Weaver, L.T. (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **36**, 616-22.
- Neithercut, W.D., Milne, A., Chittajallu, R.S., el Nujumi, A.M. and McColl, K.E. (1991). Detection of *Helicobacter pylori* infection of the gastric mucosa by measurement of gastric aspirate ammonium and urea concentrations. *Gut.* **32**, 973-6.
- Neithercut, W.D., Rowe, P.A., el Nujumi, A.M., Dahill, S. and McColl, K.E. (1993). Effect of *Helicobacter pylori* infection on intragastric urea and ammonium concentrations in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Pathol.* **46**, 544-7.

- O'Gara, E.A., Hill, D.J. and Maslin, D.J. (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2269-73.
- Ohsaki, A, Takashima, J, Chiba, N, Kawamura, M. (1999). Microanalysis of a selective potent anti-*Helicobacter pylori* compound in a Brazilian medicinal plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9** , 1109-12.
- Ojala, T., Vuorela, P., Kiviranta, J., Vuorela, H. and Hiltunen, R. (1999). A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta. Med.* **65**, 715-8.
- Osato, M.S., Reddy, R. and Graham, D.Y. (1999). Metronidazole and clarithromycin resistance amongst *Helicobacter pylori* isolates from a large metropolitan hospital in the United States. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12**, 341-7.
- Palombo, E.A. and Semple, S.J. (2001). Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *Jour. Ethnopharmacol.* **77**: 151–157
- Parasakthi, N. and Goh, K.L. (1992) Metronidazole resistance among *Helicobacter pylori* strains in Malaysia. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 808.
- Park, C.Y., Cho, Y.K., Kodama, T., El-Zimaity, H.M., Osato, M.S., Graham, D.Y. and Yamaoka, Y. (2002). New serological assay for detection of putative *Helicobacter pylori* virulence factors. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4753-6.
- Parsonnet, J., Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Hargrett-Bean, N. & Tauxe, R. V. (1992). Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology.* **102**, 41-6.
- Perez-Perez, G.I., Taylor, D.N., Bodhidatta, L., Wongsrichanalai, J., Baze, W.B., Dunn, B.E., Echeverria, P.D. and Blaser, M.J. (1990). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. *J. Infect. Dis.* **161**, 1237-41.
- Peterson, W.L., Barnett, C.C., Evans, D.J., Feldman, M., Carmody, T., Richardson, C., Walsh, J. and Graham, D.Y. (1993) Acid secretion and serum gastrin in normal

- subjects and patients with duodenal ulcer: the role of *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* **88**, 2038-43.
- Peterson, L.R., Gerding, D.N., Olson, M.M., Teasley, D.G., Gebhard, R.L., Schwartz, M.L. and Lee, J.T. (1986). Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis in adults. A prospective case-controlled epidemiologic study. *Arch. Intern. Med.* **146(1)**, 95-100.
- Plein, K., Madisch, A., Stolte, M. and Hotz, J. (2001). Short-term changes in *Helicobacter pylori* gastritis and bulbitis during and after 2 weeks of treatment with omeprazole and amoxicillin in duodenal ulcer patients. *Z. Gastroenterol.* **39**, 503-10.
- Pounder, R.E. and Williams, M.P. (1997). The treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **11 Suppl 1**, 35-41.
- Proctor, R.W. and De, F.P. (2003). Display-control arrangement correspondence and logical recoding in the Hedge and Marsh reversal of the Simon effect. *Acta. Psychol. (Amst)* **112**, 259-78.
- Rocha, G.A., Oliveira, A.M., Queiroz, D.M., Mendes, E.N., Moura, S.B., Oliveira, C.A. and Ferrari, T.C. (1998). Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by Cobas Core ELISA in adults from Minas Gerais, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 1263-8.
- Rollan, A., Giancaspero, R., Arrese, M., Figueroa, C., Vollrath, V., Schultz, M., Duarte, I. and Vial, P. (1997). Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection after antibiotic treatment. *Am. J. Gastroenterol.* **92**, 1268-74.
- Sanduleanu, S., Jonkers, D., De Bruine, A., Hameeteman, W. and Stockbrugger, R.W. (2001). Double gastric infection with *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* bacteria during acid-suppressive therapy: increase of pro-inflammatory cytokines and development of atrophic gastritis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1163-75.

Sasidharan, S. (2002). *Kajian kemandirian dan pertumbuhan Helicobacter pylori, dan epidemiologi jangkitannya dikalangan masyarakat berbilang kaum di Utara Semenanjung Malaysia*. Tesis Sarjana Sains, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.

Sasser, M.(1992). *Helicobacter pylori* and ulcers: A paradigm Revised. *J. of Chronic. Diseases.* **20**

Schuster, M.J. (2002). *Helicobacter pylori*. Update 2002. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* **91**, 2093-9. (English abstract)

Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, C., Kessel, M. and Colwell, R.R. (1993). Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1231-5.

Sidebotham, R.L. and Baron. J.H. (1990). Hypothesis: *Helicobacter pylori*, urease, mucus, and gastric ulcer. *Lancet.* **335**, 193-5.

Sipponen, P. and Seppala, K. (1992). Gastric carcinoma: failed adaptation to *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **193**, 33-8.

Sivam, G.P. (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J. Nutr.* **131**, 1106S-8S.

Sivam, G.P., Lampe, J.W., Ulness, B., Swanzy, S.R. and Potter, J.D. (1997). *Helicobacter pylori* - in vitro susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. *Nutr Cancer* **27**, 118-21.

Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H. (2003). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* **88**: 175-9.

Sun, C.Q., O'Connor, C.J. and Robertson, A.M. (2003). Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **36**, 9-17.

Tabak, M., Armon, R., Potasman, I. and Neeman, I. (1996). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 667-72.

- Takashima, J., Chiba, N., Yoneda, K. and Ohsaki, A. (2002). Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plant and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents. *J. Nat. Prod.* **65**, 611-3.
- Teo, E.K., Fock, K.M., Ng, T.M., Khor, C.J. and Tan, A.L. (2000). Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in an urban Asian population. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 494-7.
- Thomas, J.E., Gibson, G.R., Darboe, M.K., Dale, A. and Weaver, L.T. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet.* **340**, 1194-5.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D. and Venter, J.C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **388**, 539-47.
- Tominaga, K., Higuchi, K., Hamasaki, N., Hamaguchi, M., Takashima, T., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Kadota, S., Ishii, E., Kobayashi, K. and Arakawa, T. (2002). In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 547-52.
- Treiber, G., Ammon, S., Schneider, E. and Klotz, U. (1998). Amoxicillin /metronidazole /omeprazole /clarithromycin: a new, short quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter.* **3**, 54-8.
- Tytgat, G.N., Noach, L.A. and Rauws, E. A. (1993). *Helicobacter pylori* infection and duodenal ulcer disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **22**, 127-39.
- Uyub, A.M. & Ahmad Azlan, A.A. (2001). Anti-*Helicobacter pylori* activity of some local plants. *Proceedings of the 13th National Biotechnology Seminar: Towards Commercialization of Malaysian Biotechnology. Page 10-11. The Bayview Beach Resort ,Penang, Malaysia. Jointly organised by National Biotechnology Directorate Ministry of Science, Technology & the Environment, Ministry of Health, Biopharmacy Biotechnology Cooperative Center USM, Medical*

- Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M.V., Beyer, J., Flamm, R.K., Tanaka S. K., Graham D. Y. and Go M. F. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**, 477-80.
- Vines, S.W. and Williams-Burgess, C. (1994). Effects of a community health nursing parent-baby (ad)venture program on depression and other selected maternal-child health outcomes. *Public. Health. Nurs.* **11**, 188-94.
- Wagner, H. & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis- a thin layer chromatography atlas*, 2nd edn. New York : Springer. 3-24 .
- Wang, G., Wilson, T.J., Jiang, Q. and Taylor, D.E. (2001). Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**, 727-33.
- Wayne, Pa. (2001). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standards M2-A7.
- Westblom, T.U. & Bhatt, B.D. (1999). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **241**, 215-35.
- Willen, R., Carlen, B., Wang, X., Papadogiannakis, N., Odselius, R. and Wadstrom, T. (2000). Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid form. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability. *Ups. J. Med. Sci.* **105**, 31-40.
- Xia, H.H., Wong, B.C., Wong, K.W., Wong, S.Y., Wong, W.M., Lai, K.C., Hu, W.H., Chan, C.K. & Lam, S.K. (2001). Clinical and endoscopic characteristics of non-*Helicobacter pylori*, non-NSAID duodenal ulcers: a long-term prospective study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1875-82.

- Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y. and Shimamura, T. (2003). A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Curr. Microbiol.* **47**, 244-9.
- Yang, G.B., Hu, F.L. and Lu, Y.Y. (2003). The relation between *Helicobacter pylori* infection and p53 mutation, MG-7 antigen and AgNORs expression in the development of gastric mucosa lesions. *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* **83**, 1331-5. (English abstract)
- Yang, X., Summerhurst, D.K., Koval, S.F., Ficker, C., Smith, M.L. & Bernards, M.A. (2001). Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. *Phytother. Res.* **15**, 676-80.
- Yesilada, E., Gurbuz, I. and Shibata, H. (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Ethnopharmacol.* **66**, 289-93.
- Zhang, H.M., Wakisaka, N., Maeda, O. and Yamamoto, T. (1997). Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer.* **80**, 1897-903.
- Zubillaga, M., Oliveri, P., Calcagno, M.L., Goldman, C., Caro, R., Mitta, A., Degrossi, O. and Boccio, J. (1997). MIN 14C UBT: a combination of gastric basal transit and 14C-urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori* infection in human beings. *Nucl. Med. Biol.* **24**, 565-9.
- Zullo, A., Vaira, D., Vakil, N., Hassan, C., Gatta, L., Ricci, C., De Francesco, V., Menegatti, M., Tampieri, A., Perna, F., Rinaldi, V., Perri, F., Papadia, C., Fornari, F., Pilati, S., Mete, L.S., Merla, A., Poti, R., Marinone, G., Savioli, A., Campo, S. M., Faleo, D., Ierardi, E., Miglioli, M. and Morini, S. (2003). High eradication rates of *Helicobacter pylori* with a new sequential treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **17**, 719-26.

PENERBITAN DARIPADA TESIS INI

- Azlan A.A.A., and Uyub A.M. (2003). Anti-*Helicobacter pylori* (HP) activity and cytotoxicity of alkaloids extracted from a local plant *Derris trifoliata*. *Proceedings of the 8th National Conference on Medical Sciences Page 127-128. Health Campus, Universiti Sains Malaysia, Kota Bharu, Kelantan. Organised by School of Medical Sciences, USM. Edited by Nazarah Mohd Yusoff, R.G. Sirisinghe, Mohd. Noor Gohar Rahmah, Mohd Ziyadi Ghazali, Abd Aziz Al-Safi Ismail, Rosline Hassan, Mohamad Ros Sidek.*
- Azlan A.A.A., Uyub, A.M. & Shaida S.F. (2002). *In-vitro* evaluation of *Derris trifoliata* against metronidazole-resistance *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Proceedings of the 25th Microbiology Symposium: Towards Commercialization of Microbiological Research. Renaissance Kota Bharu Hotel 8th-11th September 2002. Organised by Malaysian Society for Microbiology and Universiti Malaya. Edited by Pazilah Ibrahim, Baharuddin, Ab Karim Alias, Wan Nadiah Wan Abdullah & Tengku Sifzizul.*
- Uyub, A.M. & Ahmad Azlan, A.A. (2001). Anti-*Helicobacter pylori* activity of some local plants. *Proceedings of the 13th National Biotechnology Seminar: Towards Commercialization of Malaysian Biotechnology. Page 10-11. The Bayview Beach Resort, Penang, Malaysia. Jointly organised by National Biotechnology Directorate Ministry of Science, Technology & the Environment, Ministry of Health, Biopharmacy Biotechnology Cooperative Center USM, Medical Biotechnology Cooperative Center Universiti Malaysia Sarawak and Institute of Medical Research, Malaysia.*