

**AKTIVITI ANTIMIKROB EKSTRAK HERBA
Andrographis paniculata, *Centella asiatica* DAN
Orthosiphon stamineus SERTA POTENSINYA
SEBAGAI ANTIMIKROB SEMULA JADI DALAM
DAGING LEMBU KISAR**

KOH CHEN CHUNG

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2008

**AKTIVITI ANTIMIKROB EKSTRAK HERBA *Andrographis paniculata*,
Centella asiatica DAN *Orthosiphon stamineus* SERTA POTENSINYA
SEBAGAI ANTIMIKROB SEMULA JADI DALAM DAGING LEMBU KISAR**

Oleh

KOH CHEN CHUNG

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

JANUARI 2008

Untuk keluarga yang dikasihi.
Doa kalian mengiringi setiap kejayaanku.

PENGHARGAAN

Sepanjang masa menjalankan penyelidikan sarjana dan menulis disertasi ini, saya sememangnya bernasib baik kerana mendapat bantuan dan kerjasama daripada pelbagai pihak yang begitu sudi dan ikhlas sekali.

Penghargaan yang tidak terhingga saya tujukan buat penyelia saya, Dr Rosma Ahmad di atas keprihatinan dan kesabarannya menyelia saya sehingga berjaya menyelesaikan kajian ini. Kemurahan hati beliau membolehkan saya bekerja tanpa tekanan.

Saya terhutang budi kepada Prof Zhari Ismail dan En Mohd Razak Hamdan dari Pusat Pengajian Sains Farmasi, Universiti Sains Malaysia kerana mengizinkan saya menggunakan kromatografi cecair prestasi tinggi kepunyaan gerannya serta memberikan bantuan teknikal dan penjelasan yang bermanfaat.

Sekalung penghargaan kepada Pn Wan Nadiah Wan Abdullah, pensyarah yang senantiasa bersedia menyumbangkan idea dan nasihat apabila diperlukan. Jutaan terima kasih buat bekas pensyarah Dr Cheah Poh Bee serta pembantu-pembantu makmal En Zainoddin, En Joseph, Pn Amutha, En Ghoni dan En Azmaizan atas bantuan yang diberikan.

Saya menghargai bantuan kewangan yang dihulurkan kepada saya melalui Skim Pengajian Siswazah (Pengajaran) oleh Institut Pengajian Siswazah, Universiti Sains Malaysia.

Tidak lupa juga rakan-rakan seperjuangan saya di Makmal 206 & 210 Mikrobiologi Makanan: Kean Tiek, Kuok Ing, Rodiah, Faradila, Afiza, Shen Siung, Mun Wai dan Arnieyantie serta pelajar-pelajar ijazah lanjutan yang lain,

setinggi-tinggi penghargaan kerana sanggup berjuang bersama saya, suka dan duka.

Untuk sahabat-handai: Li Sin, Lamek, Amin & Izad, Miin *Chinepunai* & Yoga *Soripunai*, Rajes *Sorinai* & Karthi *Verinai*, Pasha & Shahryar, Zhang Qian & Wei Qun, Diao Na, Ali Reza, Saeid, Heng Kong & Lim Sothea, Chee Leong & Lai Yong, Najib & Mohsen. Terima kasih kerana sedia melayani karenah saya yang pelik-pelik belaka dengan hati yang terbuka.

Akhir sekali, kepada keluarga saya yang jauh di mata tetapi senantiasa dekat di sanubari. Terima kasih kerana menyokong dan memahami keadaan saya sepanjang melanjutkan pelajaran dan terus memberikan kekuatan kepada saya untuk menempuh segala cabaran.

Hutang emas boleh dibayar, hutang budi dibawa mati.

Koh Chen Chung

Ogos 2007

Pusat Pengajian Teknologi Industri,

Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.

SUSUNAN KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGHARGAAN	iii
SUSUNAN KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI GAMBARFOTO	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
SENARAI LAMBANG	xvi
ABSTRAK	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xix
BAB 1 – PENGENALAN	
1.1 Latar Belakang Penyelidikan	1
1.2 Objektif Penyelidikan	5
BAB 2 – ULASAN PERSURATAN	
2.1 <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees	6
2.1.1 Pendahuluan	6
2.1.2 Perihal Tumbuhan	6
2.1.3 Juzuk-Juzuk Kimia	8
2.1.4 Kegunaan Dalam Perubatan Tradisional	8
2.1.5 Kajian Aktiviti Antimikrob Terdahulu	9
2.1.6 Penutup	10

2.2	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban.	11
2.2.1	Pendahuluan	11
2.2.2	Perihal Tumbuhan	11
2.2.3	Juzuk-Juzuk Kimia	13
2.2.4	Kegunaan Dalam Perubatan Tradisional	14
2.2.5	Kajian Aktiviti Antimikrob Terdahulu	15
2.2.6	Penutup	16
2.3	<i>Orthosiphon stamineus</i> (Benth.)	16
2.3.1	Pendahuluan	16
2.3.2	Perihal Tumbuhan	17
2.3.3	Juzuk-Juzuk Kimia	17
2.3.4	Kegunaan Dalam Perubatan Tradisional	19
2.3.5	Kajian Aktiviti Antimikrob Terdahulu	20
2.3.6	Penutup	20
2.4	Sebatian Antimikrob Semula Jadi Daripada Tumbuhan	21
2.4.1	Pendahuluan	21
2.4.2	Fitoaleksin	22
2.4.3	Asid Organik	25
2.4.4	Minyak Pati	26
2.4.5	Sebatian Fenol, Pigmen Dan Sebatian-Sebatian Berkaitan	32
2.4.6	Ragam Tindakan	38
2.4.7	Penutup	45
2.5	Strategi Penemuan Sebatian Bioaktif Daripada Sumber Tumbuhan	45
2.5.1	Pendahuluan	45
2.5.2	Pengumpulan Dan Penyimpanan Sampel Tumbuhan	46

2.5.3	Teknik-Teknik Pengekstrakan	47
2.5.4	Teknik-Teknik Pemisahan	52
2.5.5	Teknik-Teknik Pengenalpastian Dan Pengkuantitian	56
2.5.6	Penyaringan Bioekstrak	60
2.5.7	Penutup	62

BAB 3 – BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Rekabentuk Ujikaji Keseluruhan	63
3.2	Media Dan Bahan-Bahan Kimia	63
3.3	Sumber Herba	65
3.4	Kultur-Kultur Bakteria	65
3.5	Penyediaan Ekstrak Akueus Kasar Herba	67
3.6	Penentuan Kandungan Lembapan Herba Segar	70
3.7	Kajian Aktiviti Antimikrob Dengan Kaedah Resapan Cakera	70
3.8	Penentuan Kepekatan Rencatan Minimum	71
3.9	Penentuan Asid Rosmarinik Dalam Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dengan Kromatografi Cecair Prestasi Tinggi	72
3.9.1	Penyediaan Sampel	72
3.9.2	Pengenalpastian Dan Pengkuantitian	73
3.10	Kajian Aktiviti Antimikrob Asid Rosmarinik Tulen Dengan Kaedah Resapan Cakera	74
3.11	Analisis Ultraungu	74
3.12	Penentuan Jumlah Fenol Dalam Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i>	75

3.13	Kesan Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Ke Atas Profil Pertumbuhan <i>S. aureus</i>	75
3.14	Aktiviti Antimikrob Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dalam Sistem Makanan	76
3.15	Aktiviti Antioksidan Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dalam Sistem Makanan	79
3.16	Analisis Statistik	82

BAB 4 – KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

4.1	Penentuan Kandungan Lembapan Herba Segar	83
4.2	Kajian Aktiviti Antimikrob Dengan Kaedah Resapan Cakera	85
4.3	Penentuan Kepekatan Rencatan Minimum	100
4.4	Penentuan Asid Rosmarinik Dalam Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dengan Kromatografi Cecair Prestasi Tinggi	104
4.5	Kajian Aktiviti Antimikrob Asid Rosmarinik Tulen Dengan Kaedah Resapan Cakera	109
4.6	Analisis Ultraungu	112
4.7	Penentuan Jumlah Fenol Dalam Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i>	116
4.8	Kesan Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Ke Atas Profil Pertumbuhan <i>S. aureus</i>	117
4.9	Aktiviti Antimikrob Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dalam Sistem Makanan	120

4.10	Aktiviti Antioksidan Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dalam Sistem Makanan	135
------	---	-----

BAB 5 – KESIMPULAN

5.1	Kata Penutup	141
5.2	Prospek Masa Depan	143
5.3	Saranan Untuk Kajian Lanjutan	144

BIBLIOGRAFI	148
--------------------	------------

SENARAI PENERBITAN DAN SEMINAR	181
---------------------------------------	------------

SENARAI JADUAL

Jadual	Tajuk	Muka Surat
2.1	Antara Minyak-minyak Pati Yang Lazim Digunakan Untuk Pengawetan Makanan Dan Juzuk-juzuk Aktif Utamanya.	28
2.2	Pelarut Organik Yang Sesuai Untuk Pengekstrakan Beberapa Jenis Sebatian Fitokimia (Harborne, 1973).	49
3.1	Komposisi Fasa Bergerak Untuk Penentuan Asid Rosmarinik Dalam Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Dengan HPLC.	73
4.1	Kepekatan Rencatan Minimum (MIC) Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> Terhadap <i>S. aureus</i> Dan <i>V. parahaemolyticus</i> .	100

SENARAI RAJAH

Rajah	Tajuk	Muka Surat
2.1	Beberapa Fitoaleksin Tumbuhan Peringkat Tinggi (Tan, 1990).	23
3.1	Carta Aliran Penyelidikan.	64
3.2	Skema Penyediaan Ekstrak Akueus Kasar Daripada Herba.	69
4.1	Aktiviti Antimikrob Pelbagai Ekstrak Terhadap <i>Bacillus cereus</i> .	86
4.2	Aktiviti Antimikrob Pelbagai Ekstrak Terhadap <i>Listeria monocytogenes</i> .	86
4.3	Aktiviti Antimikrob Pelbagai Ekstrak Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .	87
4.4	Aktiviti Antimikrob Pelbagai Ekstrak Terhadap <i>Escherichia coli</i> .	87
4.5	Aktiviti Antimikrob Pelbagai Ekstrak Terhadap <i>Salmonella typhimurium</i> .	88
4.6	Aktiviti Antimikrob Pelbagai Ekstrak Terhadap <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	88
4.7	Selaput Sel Bakteria Gram Positif Dan Gram Negatif (Salton & Kim, 1996).	95
4.8	Strategi Pertahanan Bakteria Gram Positif Dan Gram Negatif Untuk Mematahkan Kemasukan Agen Antimikrob.	101
4.9	Tindihan Atas (<i>Overlay</i>) Kromatogram Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> .	105
4.10	Tindihan Atas (<i>Overlay</i>) Kromatogram Piawai Asid Rosmarinik.	106
4.11	Kurva Piawai Asid Rosmarinik.	107
4.12	Aktiviti Antimikrob Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> , Asid Rosmarinik Dan Kloramfenikol Terhadap <i>S. aureus</i> .	110

4.13	Aktiviti Antimikrob Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> , Asid Rosmarinik Dan Kloramfenikol Terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> .	110
4.14	Struktur Molekul Asid Rosmarinik.	113
4.15	Spektrum Penyerapan Ultraungu Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> .	114
4.16	Spektrum Penyerapan Ultraungu Piawai Asid Rosmarinik.	115
4.17	Profil Pertumbuhan <i>S. aureus</i> Dalam Kaldu Nutrien (Kawalan) Dan Kaldu Nutrien Berekstrak.	118
4.18	Hitungan <i>S. aureus</i> Dalam Daging Lembu Kisar Yang Disimpan Pada 4 ± 1 °C.	121
4.19	Hitungan <i>S. aureus</i> Dalam Daging Lembu Kisar Yang Disimpan Pada 10 ± 1 °C.	122
4.20	Perubahan Dalam TBARS Daging Lembu Kisar Yang Diolah Dengan Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> .	136

SENARAI GAMBARFOTO

Gambarfoto	Tajuk	Muka Surat
2.1	<i>Andrographis paniculata.</i>	7
2.2	<i>Centella asiatica.</i>	12
2.3	<i>Orthosiphon stamineus.</i>	18
4.1	Zon Perencatan: a) Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> (Daun Kering) Ke Atas <i>S. aureus</i> . b) Kloramfenikol Ke Atas <i>S. aureus</i> .	89
4.2	Zon Perencatan: a) Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> (Daun Kering) Ke Atas <i>V. parahaemolyticus</i> . b) Kloramfenikol Ke Atas <i>V. parahaemolyticus</i> .	90
4.3	Zon Perencatan: a) Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> (Kanan) Dan Asid Rosmarinik (Kiri) Ke Atas <i>S. aureus</i> . b) Ekstrak Akueus Kasar <i>O. stamineus</i> (Kanan) Dan Asid Rosmarinik (Kiri) Ke Atas <i>V. parahaemolyticus</i> .	111

SENARAI SINGKATAN

Bab 1 – Pengenalan

MIC Kepekatan Rencatan Minimum

Bab 2 – Ulasan Persuratan

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ASE	Pengekstrakan Pelarut Terpecut
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
BHA	Butil Hidroksianisole
BHT	Butil Hidroksitoluena
b/i	Berat per Isipadu
BLG	Bendalir Lampau Genting
BOD ₅	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (selepas 5 hari pengeraman)
CE	Elektroforesis Kapilari
DAD	Pengesanan Tatasusun Diod
GLC	Kromatografi Cecair Gas
HPLC	Kromatografi Cecair Prestasi Tinggi
HSCCC	Kromatografi Arus-Berlawanan Halaju-Tinggi
IR	Inframerah
MAE	Pengekstrakan Mikrogelombang Berbantu
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Rintang Metisilin
MS	Spektroskopi Jisim
NMR	Resonans Magnet Nuklear
p-	<i>Para-</i>
PC	Kromatografi Kertas
PLE	Pengekstrakan Cecair Tertekan
RNA	Asid Ribonukleik
SDS-Page	Natrium Dodesil Sulfat-Elektroforesis Gel Poliakrilamida
SFC	Kromatografi Bendalir Lampau Genting
SFE	Pengekstrakan Bendalir Lampau Genting
SE	Pengekstrakan Stim
SPE	Pengekstrakan Fasa Pepejal
TLC	Kromatografi Lapisan Nipis
UV	Ultraungu
UV-Vis	Ultraungu-Ternampakkan

Bab 3 – Bahan Dan Kaedah

ANOVA	Analisis Varians
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
b/b	Berat per Berat
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
EDTA	Asid Etilenadiaminatetraasetik
i/i	Isipadu per Isipadu

NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PTFE	Politetrafluoroetilena
rpm	Revolusi per Minit
TBA	Asid 2-Tiobarbiturik
TBARS	Sebatian Reaktif Asid 2-Tiobarbiturik

Bab 4 – Keputusan Dan Perbincangan

Da	Dalton
DNA	Asid Deoksiribonukleik
i/b	Isipadu per Berat
TBHQ	<i>Tert</i> -Butil Hidrokuinon

SENARAI LAMBANG

Bab 2 – Ulasan Persuratan

°C	Darjah Celsius
M	Molar
nm	Nanometer
pO ₂	Keupayaan Pengoksidaan-Penurunan
R _f	Kemobilan Relatif Dengan Hadapan Pelarut
RR _t	Masa Tambatan Relatif
µg	Mikrogram
µm	Mikrometer

Bab 3 – Bahan Dan Kaedah

N	Kenormalan
µL	Mikroliter
≥	Bersamaan Dengan Atau Lebih Daripada

Bab 4 – Keputusan Dan Perbincangan

±	Sisihan Piawai
LD ₅₀	Dos Maut 50
n	Bilangan Sampel
pK _a	Pemalar Penceraian Asid
R ²	<i>Coefficient of Determination</i>
µmol	Mikromol
<	Kurang Daripada
≤	Bersamaan Dengan Atau Kurang Daripada
>	Lebih Daripada

**Antimicrobial Activity of *Andrographis paniculata*, *Centella asiatica* and
Orthosiphon stamineus Herbal Extracts and Their Potential as
Natural Antimicrobial in Minced Beef**

ABSTRACT

Andrographis paniculata, *Centella asiatica* and *Orthosiphon stamineus* are three well-known herbs used in traditional Malaysian medicine for treatment of a wide range of diseases. In this research, crude aqueous extracts prepared from fresh and dried leaves of the herbs were assessed for antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria using disc diffusion assay. Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) as well as Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus*) were selected as test microorganisms. Chloramphenicol (10 µg/disc) was employed as positive control. Generally, the crude aqueous extracts (10 mg extract/disc) exhibited various degrees of inhibitory effects against all the test microorganisms. *S. aureus* and *V. parahaemolyticus* were the most susceptible microorganisms to the *O. stamineus* crude aqueous extract. The minimum inhibitory concentration determined by broth dilution assay was 100 mg/mL for both microorganisms. *O. stamineus* crude aqueous extract was selected for further investigation. Total phenolics assay and HPLC analysis of the *O. stamineus* extract showed that it was rich in phenolic compounds (68.80 ± 0.42 mg caffeic acid/mL extract) of which rosmarinic acid was predominant (26.1 ± 3.89 mg/mL extract). Subsequent disc diffusion assay using pure rosmarinic acid demonstrated that it possessed antibacterial effect at concentration found in the extract against *S.*

aureus and *V. parahaemolyticus*. The presence of rosmarinic acid appeared to contribute significantly to the antibacterial activity observed for the *O. stamineus* extract. Growth profile study conducted at 37 ± 1 °C for 48 hours revealed the ability of *O. stamineus* extract at 200 mg/mL to reduce the population of *S. aureus* in nutrient broth for more than 5 log cycle. The inhibitory effect of the extract was further evaluated in minced beef experimentally inoculated with *S. aureus*. Results demonstrated that *O. stamineus* extract at the concentration of 200 mg/g was effective against *S. aureus* population in minced beef stored at 10 ± 1 °C. Population was 2.40 log lower than the control after 6 days of storage at 10 ± 1 °C ($P \leq 0.05$). Parallel to the antimicrobial activity, the antioxidant activity of *O. stamineus* extract was determined in minced beef stored at 4 ± 1 °C for 7 days. Lipid oxidation during refrigerated storage was followed by monitoring malonaldehyde formation using the thiobarbituric acid reactive substances method. *O. stamineus* extract at 10 % (v/w) was successful in minimising lipid oxidation in minced beef. The observed antioxidative property was presumably attributed to rosmarinic acid, the major phenolic compound present in the extract as detected by HPLC. This study suggested that the application of *O. stamineus* extract possessing both antimicrobial and antioxidant activities to prolong shelf life is a promising prospect and further investigation is justified.

Aktiviti Antimikrob Ekstrak Herba *Andrographis paniculata*, *Centella asiatica* Dan *Orthosiphon stamineus* Serta Potensinya Sebagai Antimikrob Semula Jadi Dalam Daging Lembu Kisar

ABSTRAK

Andrographis paniculata, *Centella asiatica* dan *Orthosiphon stamineus* merupakan tumbuhan herba yang sering digunakan dalam perubatan tradisional Malaysia bagi mengubati pelbagai penyakit. Dalam penyelidikan ini, ekstrak akueus kasar yang disediakan daripada daun-daun segar dan kering ketiga-tiga herba telah dikaji aktiviti antimikrobnya terhadap bakteria patogen bawaan makanan menggunakan kaedah resapan cakera. Bakteria Gram positif iaitu *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* dan *Staphylococcus aureus* serta bakteria Gram negatif yakni *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* dan *Vibrio parahaemolyticus* telah dipilih sebagai mikroorganisma ujian. Kloramfenikol (10 µg/cakera) bertindak sebagai kawalan positif. Secara amnya, ekstrak akueus kasar (10 mg ekstrak/cakera) menunjukkan kesan perencatan yang berlainan terhadap setiap spesis mikroorganisma ujian. *S. aureus* dan *V. parahaemolyticus* merupakan mikroorganisma ujian yang paling rentan terhadap ekstrak akueus kasar *O. stamineus*. Kepekatan rencatan minimum yang ditentukan melalui kaedah pencairan kaldu adalah 100 mg/mL untuk kedua-dua bakteria tersebut. Ekstrak akueus kasar *O. stamineus* telah dipilih untuk kajian lanjutan. Penentuan jumlah fenol dan analisis HPLC menunjukkan bahawa ekstrak akueus kasar *O. stamineus* adalah kaya dengan sebatian fenolik (68.80 ± 0.42 mg asid kafeik/mL ekstrak) yang mana asid rosmarinik adalah pradominan (26.1 ± 3.89 mg/mL ekstrak). Ujikaji resapan cakera dengan

asid rosmarinik tulen seterusnya membuktikan bahawa ia mempunyai kesan perencatan terhadap *S. aureus* dan *V. parahaemolyticus* pada kepekatan yang dijumpai dalam ekstrak akueus kasar. Kehadiran asid rosmarinik mungkin menyumbangkan kepada aktiviti antimikrob yang diperhatikan pada ekstrak akueus kasar *O. stamineus*. Kajian profil pertumbuhan yang dijalankan pada 37 ± 1 °C selama 48 jam memperlihatkan keupayaan ekstrak pada kepekatan 200 mg/mL mengurangkan populasi *S. aureus* dalam kaldu nutrien berekstrak sebanyak 5 log. Dalam kajian penggunaan pula, ekstrak akueus kasar *O. stamineus* yang ditambahkan sebanyak 200 mg/g didapati berupaya merencatkan pertumbuhan *S. aureus* dalam daging lembu kisar yang disimpan pada 10 ± 1 °C. Populasi *S. aureus* adalah 2.40 log lebih rendah daripada kawalan selepas 6 hari penyimpanan ($P \leq 0.05$). Selari dengan aktiviti antimikrob, suatu kajian aktiviti antioksidan ekstrak dalam daging lembu kisar telah dijalankan pada 4 ± 1 °C selama 7 hari. Pengoksidaan lipid semasa penyimpanan dingin diawasi dengan kaedah sebatian reaktif asid tiobarbiturik. Ekstrak akueus *O. stamineus* yang ditambahkan sebanyak 10 % (i/b) berjaya mengurangkan pengoksidaan lipid dalam daging lembu kisar. Aktiviti antioksidan yang diperhatikan diandaikan berpunca daripada asid rosmarinik yakni sebatian fenolik utama yang hadir dalam ekstrak seperti yang dikesan oleh HPLC. Sesungguhnya, keputusan-keputusan positif yang diperolehi dari kajian ini telah membuktikan potensi ekstrak akueus kasar *O. stamineus* untuk dikaji selanjutnya sebagai antimikrob makanan semula jadi.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Latar Belakang Penyelidikan

Industri pemprosesan makanan pada masa kini menghadapi pelbagai cabaran dalam menghasilkan produk makanan bermutu tinggi, menjamin keselamatan produk makanan yang terhasil dan mengekalkan kestabilan produk sepanjang hayat penyimpanan. Permintaan para pengguna yang semakin mementingkan kesihatan terhadap produk makanan yang berkualiti tinggi, semula jadi, berkhasiat, terproses secara minima, bebas daripada ramuan kimia sintetik, dengan hayat penyimpanan yang lanjut serta perundangan makanan yang menghadkan penggunaan agen pengawet yang dibenarkan dalam pelbagai jenis makanan menambahkan lagi cabaran ini.

Cabaran ini telah membuka peluang kepada para saintis untuk menerokai agen pengawet alternatif yang semula jadi. Penggunaan agen pengawet kimia secara berlebihan yang sesetengahnya disyaki kerana ketoksikannya telah menekan industri makanan sama ada untuk menyingkirkan sepenuhnya agen pengawet kimia daripada produk makanan atau pun mencari alternatif yang semula jadi bagi memanjangkan hayat penyimpanan produk makanan (Nychas, 1995). Selain daripada itu, kajian mendapati bahawa wujudnya kerintanan sesetengah mikroorganisma terhadap sesetengah agen pengawet yang digunakan sekarang (Piper *et al.*, 1998).

Kajian-kajian lepas telah menunjukkan bahawa terdapat banyak herba, rempah dan ekstrak tumbuh-tumbuhan semula jadi yang mempunyai aktiviti antimikrob. Aktiviti antimikrob ini telah dikesan pada herba Turki *Satureja*

hortensis (Sagdic & Ozcan, 2003; Sahin *et al.*, 2003), *Solidago virgaurea* (Thiem & Goslinska, 2003), herba Finland (Rauha *et al.*, 2000), ginseng dan bawang putih (Wong & Kitts, 2002) serta tumbuhan perubatan Ethiopia (Desta, 1993). Kajian-kajian tersebut menggunakan ekstrak akueus dan bukan akueus herba. Kajian oleh Samy *et al.* (1998) telah mengenalpasti 16 spesis tumbuhan perubatan India yang menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap 4 spesis bakteria Gram negatif.

Menurut Deans dan Ritchie (1987), kebanyakan rempah dan herba serta ekstraknya yang mempunyai aktiviti antimikrob, adalah kebanyakannya disebabkan oleh pecahan minyak pati. Maka, minyak pati buah-buahan sitrus menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap bakteria bawaan makanan (Dabbah *et al.*, 1970) dan kulat (Akgul & Kivanc, 1989). Demikian juga dengan minyak pati tumbuh-tumbuhan lain seperti oregano, taim (Paster *et al.*, 1990; Salmeron *et al.*, 1990), *sage*, *rosemary*, cengkih, ketumbar dan lain-lain sebagainya (Stecchini *et al.*, 1993; Aureli *et al.*, 1992; Farag *et al.*, 1989). Kesan antibakteria dan antimikotik bawang putih dan bawang besar juga telah didokumentasikan dengan lengkap (Conner & Beuchat, 1984a, b; Saleem & Al-Delaimy, 1982; Sharma *et al.*, 1979; Mantis *et al.*, 1978).

Malaysia sangat bertuah kerana memiliki sumber alam yang kaya terutamanya sumber tumbuhan ubatan. Daripada kira-kira 13 000 spesis tumbuhan berbunga yang terdapat di Malaysia, sebanyak 10 % telah dicatatkan sebagai tumbuhan ubatan. Anggaran tersebut diasaskan daripada kamus yang ditulis oleh I. H. Burkill yang berjudul "*A Dictionary of Economic Products of the Malay Peninsula*" yang diterbitkan pada tahun 1935. Dalam beberapa dekad yang lalu, kemajuan dalam kajian-kajian sains telah memberikan kefahaman

yang lebih jelas mengenai sumber asli negara yang masih belum diterokai sepenuhnya. Sumber-sumber semula jadi ini mempunyai potensi besar kepada industri farmaseutik, pasaran minyak bauan dan herba alternatif.

Di Malaysia, produk herba telah diterima sebagai salah satu komponen untuk perawatan dalam sistem penjagaan kesihatan terutamanya dalam terapeutik, perubatan, masakan, sumber aroma dan kegunaan estetika di dalam masyarakat. Industri herba tempatan pada masa kini dianggarkan bernilai kira-kira RM2 billion setahun, tetapi kebanyakan bahan mentah untuk produk ini diimport. Di samping itu, industri herba tempatan tergolong dalam industri kecil dan sederhana dengan keperluan kemahiran teknikal dan pengurusan yang rendah.

Pada masa ini juga hanya sebilangan kecil sahaja dari sumber tumbuhan kita yang digunakan. Masih banyak lagi spesis-spesis tempatan yang belum diterokai dan tumbuhan tersebut semakin sukar diperolehi. Minat dan kepopularan produk herba di Malaysia memerlukan lebih banyak sumber rujukan yang boleh digunakan oleh masyarakat kita. Malah kepopularan ini menyebabkan bertambahnya taman-taman botani dan ubatan yang memerlukan buku rujukan supaya maklumat yang tepat dapat dipaparkan. Ia juga sudah pasti akan dapat membantu para penyelidik dan industri herba tempatan.

Kebanyakan kajian yang dilaporkan dalam jurnal-jurnal antarabangsa membabitkan herba-herba kawasan bermusim, manakala kajian aktiviti antimikrob herba-herba di kawasan khatulistiwa terutamanya yang tumbuh secara semula jadi di hutan Malaysia kurang diberikan tumpuan. Tumbuh-tumbuhan herba ini telah pun dikenali dan digunakan oleh masyarakat

tempatan secara turun-temurun untuk mengubati penyakit dan meningkatkan kesihatan. Sehingga ke hari ini, kegunaan herba-herba itu adalah terhadap kepada tujuan tradisionalnya sahaja. Banyak lagi potensi herba-herba itu yang belum lagi dieksploitasikan. Dengan alasan ini, kajian terhadap aktiviti antimikrob ekstrak herba Malaysia wajar diberikan sokongan dan dijalankan dengan pesat dalam institusi pengajian tinggi dan institusi penyelidikan di Malaysia.

Kajian ini akan dapat menemui agen pengawet alternatif yang semula jadi dan lebih selamat digunakan dalam industri pemprosesan makanan. Maklumat-maklumat mengenai aktiviti antimikrob ekstrak herba Malaysia (seperti jenis ekstrak yang berkesan, paras kepekatan keberkesanan, jenis mikroorganisma yang berkesan dan yang rintan) boleh didokumentasikan untuk komunikasi dengan para saintis dunia dan untuk rujukan kajian yang bakal dijalankan. Menurut Mitcher (1975), tumbuh-tumbuhan merupakan sumber yang kurang dieksploitasi dalam usaha pencarian agen antimikrob alternatif di mana struktur dan ragam tindakannya mungkin sangat berbeza daripada agen antimikrob yang ditemui daripada sumber-sumber yang lebih dikenali. Jadi, herba-herba Malaysia mempunyai potensi besar untuk dikaji dalam pencarian agen antimikrob alternatif yang mungkin adalah lebih baik daripada agen antimikrob sintetik yang sedang digunakan meluas sekarang.

Di samping itu, kajian ini dapat mempromosikan herba-herba Malaysia ini kepada para saintis dunia yang tidak mengetahuinya. Para saintis yang berminat akan meneruskan usaha untuk mengkaji herba-herba itu dengan lebih mendalam lagi. Syarikat-syarikat pengeluar ingredien makanan, ubat-ubatan, nutraseutikal dan lain-lain sebagainya akan mengeluarkan geran kepada

institusi pengajian tinggi bagi tujuan menjalankan penyelidikan komersial. Semua ini pasti akan meningkatkan lagi nilai ekonomi herba-herba tempatan itu yang selama ini kurang mendapat sambutan dan perhatian daripada industri makanan dan industri-industri yang berkaitan.

1.2 Objektif Penyelidikan

1. Untuk mengkaji aktiviti antimikrob *in vitro* tiga ekstrak tumbuhan herba Malaysia iaitu Hempedu Bumi (*Andrographis paniculata*), Pegaga (*Centella asiatica*) dan Misai Kucing (*Orthosiphon stamineus*) terhadap mikroorganisma patogen yang mempunyai kepentingan signifikan dalam industri makanan iaitu *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio parahaemolyticus*.
2. Untuk menentukan kepekatan rencatan minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) ekstrak-ekstrak herba terhadap mikroorganisma yang paling rentan.
3. Untuk mengkaji penggunaan ekstrak herba dengan aktiviti perencatan yang paling poten sebagai agen antimikrob dalam meningkatkan keselamatan makanan.

BAB 2

ULASAN PERSURATAN

2.1 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees

2.1.1 Pendahuluan

Herba tahunan ini berasal dari Asia Tenggara, Negara China dan India. Walaupun tumbuhan ini telah digunakan dalam perubatan tradisional sejak berkurun-kurun lagi, potensi sebenarnya baru sahaja ditemui dan telah menarik minat pasaran herba dan farmaseutik. Ia dianggap sebagai satu herba baru yang mempunyai potensi besar dan sedang diuji untuk rawatan bagi pelbagai penyakit termasuklah AIDS dan simptom-simptom yang berkaitan dengan penyakit auto-keimunan.

2.1.2 Perihal Tumbuhan

Nama tempatan: Hempedu Bumi, Pokok Akar Cerita, Setunjang Bumi. Hempedu Bumi merupakan tumbuhan tegak, tumbuh sehingga mencapai ketinggian 30-90 cm. Batang bersegi empat, bercabang banyak. Daunnya ringkas, 8 × 2-4 cm, warna hijau, glabrus, berbentuk lanseolat, hujung akuminat, pangkal atenuat, peruratan jenis pinat. Saiz daun berkurang apabila tumbuhan mencapai kematangan. Daunnya tidak mempunyai petiol. Korola kecil dan berwarna putih. Buahnya berbentuk kapsul tegak, 2-4 cm panjang, kedua-dua hujung sub-akut, berwarna perang kekuning-kuningan (Kamarudin *et al.*, 2002a). Gambarfoto 2.1 menunjukkan bahagian bunga dan daun Hempedu Bumi.



Gambarfoto 2.1 *Andrographis paniculata*.

Tumbuhan ini lazimnya ditemui tumbuh liar di padang rumput dan kawasan terbiar. Tumbuhan ini sangat tahan lasak dan berupaya menyesuaikan diri kepada pelbagai keadaan tanah. Disebabkan kapasiti pembiakannya yang sangat efisien, tumbuhan ini dianggap rumpai di kebanyakan negara.

2.1.3 Juzuk-juzuk Kimia

Kebanyakan juzuk-juzuk kimia yang terkandung dalam *A. paniculata* adalah terdiri daripada diterpenoid dan flavonoid.

Diterpenoid Andrografolida (Cava *et al.*, 1965), neoandrografolida (Chan *et al.*, 1971), andrografisida, andropanosida dan andrograpanin (Chen & Liang, 1987; Fujita *et al.*, 1984; Hu *et al.*, 1982; Hu & Zhao, 1981).

Flavonoid Andrografidina, 5-hidroksi-7,8,2',3'-tetrametoksiflavanon dan 7,8-dimetoksi-5-hidroksiflavanon (Kuroyanagi *et al.*, 1987).

2.1.4 Kegunaan Dalam Perubatan Tradisional

Menurut Burkill (1935), tumbuhan ini boleh mengubati demam, darah tinggi, gigitan ular, sakit perut, mual, hilang selera makan, luka dan ulser gusi. Goh (1986) melaporkan daun yang ditumbuk dan kemudian ditampalkan pada bahagian tangan dan kaki untuk mengubati penyakit kulit. Rohani (1991) pula melaporkan, tumbuhan ini boleh mengubati penyakit kencing manis dan juga boleh merendahkan tekanan darah tinggi dengan merebus keseluruhan tumbuhan dan kemudian air rebusan diminum. Beliau juga melaporkan bahawa keseluruhan tumbuhan yang disalai dan kemudian direbus dan diminum boleh

mengubati penyakit angin dalam perut ('uluran' – panggilan tempatan di Kelantan).

Masyarakat India menggunakan tumbuhan ini untuk mengubati patukan ular dengan menggiling daunnya kemudian dimakan sebanyak satu sudu teh kecil. Pesakit perlu berpantang dengan tidak memakan garam sepanjang hari tersebut. Masyarakat Kadazan menggunakan daun yang telah direbus untuk diminum bagi merendahkan tekanan darah tinggi, malaria dan untuk menggugurkan kandungan (Fasihuddin & Hasmah, 1991b). Keseluruhan tumbuhan ditumbuk dan ditampalkan pada bekas gigitan serangga berbisa seperti lipan sebagai penawar bisa.

2.1.5 Kajian Aktiviti Antimikrob Terdahulu

Singha *et al.* (2003) melaporkan aktiviti antibakteria dan antikulat oleh ekstrak akues, andrografolida dan protein arabinogalaktan daripada *Andrographis paniculata* terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans*.

Suatu kajian awal telah dilakukan oleh Eva Sophia *et al.* (2004) untuk mengkaji ciri-ciri antibakteria 15 jenis herba Malaysia termasuklah *A. paniculata*. Hasil kajian mereka menunjukkan bahawa ekstrak etanol *A. paniculata* dan 3 lagi herba yang lain mempunyai aktiviti antibakteria terhadap kesemua 5 strain isolat klinik *Staphylococcus aureus* rintang metisilin (MRSA) dalam kajian tersebut. Selain daripada itu, Yusof *et al.* (2004) juga telah mengkaji aktiviti antimikrob ekstrak *A. paniculata* terhadap 26 strain *S. aureus* peka metisilin serta 49 strain yang rintang metisilin dan melaporkan bahawa *S. aureus*, kedua-dua peka metisilin dan rintang metisilin, adalah rentan terhadap ekstrak *A.*

paniculata. Mereka mencadangkan bahawa *A. paniculata* boleh dijadikan antiseptik untuk kegunaan luar pada lesi kulit berjangkit.

Limsong *et al.* (2004) menyelidik kesan perencatan pelbagai ekstrak kasar herba termasuk *A. paniculata* ke atas kelekatan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dan TPF-1 secara *in vitro*.

Xu dan rakan-rakannya (2006) mengkaji aktiviti antimikrob suatu ekstrak akues dan 2 ekstrak etanol *A. paniculata* serta prinsip aktifnya andrografolida terhadap 9 spesis bakteria iaitu *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Legionella pneumophila* dan *Bordetella pertussis*, menggunakan kaedah resapan cakera. Keputusan menunjukkan bahawa 2 ekstrak etanol hanya merencatkan *L. pneumophila* dan *Bordetella pertussis*. Tiada sebarang aktiviti antibakteria yang diperhatikan pada andrografolida terhadap bakteria mana-mana pun. Memandangkan andrografolida hadir dalam ketiga-tiga ekstrak yang digunakan seperti yang ditunjukkan oleh kromatografi lapisan nipis, mereka menyimpulkan bahawa aktiviti antimikrob yang diperhatikan itu adalah disebabkan oleh prinsip aktif lain yang hadir dalam ketiga-tiga ekstrak tersebut.

Dalam kajian yang lain, Leelarasamee *et al.* (1990) turut melaporkan ketiadaan aktiviti antibakteria *A. paniculata*.

2.1.6 Penutup

Pada masa kini, tumbuhan herba ini dianggap sebagai herba yang paling berpotensi untuk dikomersialkan di Malaysia. Ini adalah kerana ia senang ditanam dan kemujarabannya yang terbukti melalui penyelidikan. Terdapat beberapa produk dalam pasaran global seperti Amni Visnaga Extract (ekstrak *A.*

paniculata), Androtech (*A. paniculata* dengan *Echinaceae*, Vitamin C dan Zink, untuk peningkatan kesihatan dan fungsi keimunan) dan NBS-AV (campuran 12 herba termasuk *A. paniculata*). Manakala produk seperti Hempedu Bumi Plus boleh didapati di pasaran tempatan.

2.2 *Centella asiatica* (L.) Urban.

2.2.1 Pendahuluan

Tumbuhan ini telah digunakan sejak zaman kuno lagi terutamanya dalam sistem perubatan Ayurvedik di India dan perubatan orang kebanyakan di China dan Madagascar. Di Malaysia, walaupun pegaga turut digunakan dalam perubatan tradisional, kepopularannya adalah sebagai ulam di kalangan masyarakat Melayu.

2.2.2 Perihal Tumbuhan

Sinonim: *Hydrocotyle asiatica* (L.) Urban. Nama tempatan: Pegaga, Tapak Kaki Kuda, *Asiatic Pennywort*, Gotu Kola. Ia merupakan herba kecil, tahunan, merayap dan menjalar panjang. Daunnya reniform krenat, glabrus. Petiolnya panjang (5 cm). Bunga berwarna merah atau merah jambu, padat di aksil daun dengan brakt yang banyak, umbel dengan pedunkel yang pendek (Kamarudin *et al.*, 2002b). Gambarfoto 2.2 menunjukkan bahagian daun pegaga.

Pegaga tumbuh liar pada keadaan yang pelbagai. Sesetengah subspesis gemari tempat teduh dan lembap seperti di tepi paya dan kolam, manakala yang lain pula tumbuh dengan baik di bawah cahaya matahari. Ada juga yang berupaya tumbuh pada keadaan yang kasar seperti dinding batu.



Gambarfoto 2.2 *Centella asiatica*.

Pada masa kini, terdapat tiga subspecies pegaga yaitu pegaga salad, pegaga kerinting atau nyonya dan pegaga biasa atau pegaga ubi. Subspecies yang dicadangkan untuk tujuan komersial adalah pegaga ubi.

2.2.3 Juzuk-juzuk Kimia

Berikut disenaraikan juzuk-juzuk kimia beraneka kelas yang telah ditemui pada *C. asiatica*.

Asid amino Alanina, serina (komponen utama), aminobutirat, aspartat, glutamat, histidina, lisina dan treonina (George & Gnanarethnam, 1975).

Flavonoid Kuersetin, kaempferol dan pelbagai glikosida (Voigt *et al.*, 1981; Hiller *et al.*, 1979; Rzadkowska-Bodalska, 1974).

Terpenoid Triterpena, asiatikosida ($C_{48}H_{78}O_{19}$), sentellosida, madekassosida ($C_{48}H_{78}O_{20}$), brahmosida dan brahminosida (glikosida saponin). Asid asiatisentoik, asid sentellik, asid sentoik dan asid madekassik (Hiller *et al.*, 1981, 1971).

Minyak meruap Pelbagai terpenoid termasuklah *β -caryophyllene*, *trans- β -farnesene* dan *germacrene D* (seskuiterpena) sebagai komponen utama, α -pinene dan β -pinene (Barnes *et al.*, 2002).

Juzuk-juzuk lain Hidrokotilin (sejenis alkaloid), valerina (suatu prinsip pahit), asid lemak (seperti asid linoleik, asid linolenik, lignocene, asid oleik, asid palmitik, asid stearik), fitosterol (contohnya kampesterol, sitosterol, stigmasterol) (Asakawa *et al.*, 1982), resin dan tannin.

Bahagian bawah tanah tumbuhan herba ini dilaporkan mengandungi kuantiti kecil sekurang-kurangnya 14 jenis poliasetilena berbeza (Bohlmann & Zdero, 1975; Schulte *et al.*, 1973).

2.2.4 Kegunaan Dalam Perubatan Tradisional

Herba asli di Semenanjung Malaysia ini sangat sedap dibuat ulam dengan memakan daun mudanya (Burkill, 1935). Ia mempunyai banyak khasiat, antaranya ialah dapat menguatkan daya ingatan dan menyembuhkan luka. Keseluruhan bahagian tumbuhan ini mempunyai khasiat yang tinggi dan sering digunakan sejak zaman berzaman di Kepulauan Melayu untuk mengubati pelbagai penyakit.

Mengikut Azmah (1989), pegaga digunakan untuk menghilangkan rasa pening dengan cara menumbuk secubit “garam jantan” bersama pegaga hingga lumat dan airnya (tiga sudu besar) diminum setiap pagi, sekali sehari. Ia juga digunakan untuk merawat darah tinggi di mana batang bersama akarnya ditumbuk kemudian diperah airnya ke dalam secawan air lalu dicampur garam untuk dijadikan minuman di waktu pagi. Untuk tujuan yang sama, masyarakat India menggunakan air rebusan dari keseluruhan tumbuhan yang dikukus ini bersama jintan manis dan bawang putih (Subramaniam, 1988).

Mengikut Sabariah (1987), di Kelantan secekek daun pegaga ditumbuk lumat dan ditampalkan di dahi untuk mengubati penyakit malaria. Air perahan yang disediakan daripada daun pegaga yang telah ditumbuk juga diminum untuk mengubati sakit mata.

Masyarakat Sabah meminum air rebusan keseluruhan tumbuhan ini yang telah dijemur selama sehari untuk mengurangkan demam panas atau membuang panas badan (Maria, 1990; Amandus, 1989). Daun pegaga yang telah dihancurkan diletakkan pada gigi yang sakit untuk mengurangkan kesakitan. Air rebusan pegaga yang dicampurkan dengan halia, jadam, sedikit

garam dan samsu putih turut diminum untuk merawat sakit tembolok atau kencing yang tidak lawas.

Masyarakat India di Selangor menggunakan pegaga untuk menambahkan daya ingatan dengan meminum jus daunnya pada waktu pagi semasa perut kosong dan ditambah dengan segelas susu selepas 2 jam. Ia diamalkan selama 40 hari (Subramaniam, 1988). Dalam masyarakat Cina di Malaysia pula, keseluruhan tumbuhan ini dicampurkan dengan sedikit halia, dimasak sebagai sup dan diminum untuk mengubati gangguan perut (Goh, 1986).

2.2.5 Kajian Aktiviti Antimikrob Terdahulu

Dengan menggunakan 8 strain *S. aureus* rintang metisilin (MRSA) yang dipencilkan daripada pelbagai tapak jangkitan, Mazurah *et al.* (2004) mengkaji aktiviti perencatan ekstrak-ekstrak metanol yang diperolehi daripada *Centella* spp. dan *Hydrocotyle* spp. Kesemua ekstrak yang dikaji menunjukkan aktiviti anti-MRSA yang agak rendah. Kumpulan penyelidik itu menganggap aktiviti perencatan adalah disebabkan oleh triterpenoid yang merupakan prinsip aktif tumbuhan itu.

Ekstrak heksana dan etil asetat pegaga menunjukkan aktiviti perencatan yang signifikan terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *Pseudomonas cichorii* sementara ekstrak n-butanol pula didapati tidak aktif. Stigmasterol dan asid dotriacont-8-en-1-oik yang dipencilkan daripada ekstrak heksana dilaporkan merencat *B. subtilis*, *E. coli* dan *P. aeruginosa* (Srivastava *et al.*, 1997).

Meskipun begitu, keputusan yang bercanggahan dilaporkan oleh para penyelidik lain. Jus segar pegaga dilaporkan tidak mempunyai sebarang aktiviti antibakteria (Lin *et al.*, 1972) walaupun asiaticosida pernah dilaporkan aktif terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus leprae* dan *Entamoeba histolytica* dan oksiasiatikosida dilaporkan aktif terhadap tuberkel basilus (Oliver-Bever, 1986; Lin *et al.*, 1972). Jus segar pegaga turut dinyatakan tidak menunjukkan sebarang aktiviti antitumor atau antivirus tetapi memiliki tindakan sitotoksik yang sederhana pada sel tumor asites manusia (Lin *et al.*, 1972).

2.2.6 Penutup

C. asiatica telah dikaji dengan begitu meluas sekali dan aktiviti farmakologinya seolah-olahnya adalah berkaitan dengan jujuk triterpenoidnya. Data-data ujian klinikal dan haiwan yang dikumpulkan menyokong penggunaan herba ini sebagai agen dermatologi dan menjaminkan penyelidikan yang selanjutnya.

2.3 *Orthosiphon stamineus* (Benth.)

2.3.1 Pendahuluan

Tumbuhan herba ini mulai menarik minat para penyelidik seawal permulaan kurun ke-20 apabila herba ini diperkenalkan di Eropah dan justeru itu menjadi teh herba yang popular. Di Malaysia, ia digunakan dalam merawat penyakit yang berkaitan dengan pundi kencing dan ginjal. Bunganya yang unik menjadikan ia sering ditanam untuk perhiasan.

2.3.2 Perihal Tumbuhan

Sinonim: *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq., *Orthosiphon grandiflorus* Bold., *Orthosiphon spicatus* (Thunb.) Bak., *Ocimum aristatum* Bl. Nama tempatan: Misai Kucing, Ruku Hutan, Kumis Kucing, Remujung, Teh Jawa. Herba tirus mencapai ketinggian 1 m atau lebih. Batang 4-sudut, berwarna merah dan bercabang-cabang. Daunnya glabrus, lanseolat, hujung akuminat, pangkal kuneat, sisi serat, 5-10 cm panjang, 1.5-4.5 cm lebar. Petiolnya agak pendek (0.5-1.0 cm). Bunga berbentuk kampanulat, berwarna putih atau ungu pucat. Terdapat 4 stamen panjang (5 cm) yang menjulur keluar dari korola, membuatkan bunga menyerupai Misai Kucing (Kamarudin *et al.*, 2002a). Gambarfoto 2.3 menunjukkan bahagian bunga dan daun Misai Kucing.

Tumbuhan ini boleh dijumpai di seluruh benua Asia, Asia Tenggara dan Australia tropika. Ia tumbuh dengan baik di habitat teduh dan tidak terlalu kering seperti di sepanjang jalan, hutan dan tanah terbiar. Ia turut ditanam sebagai tumbuhan perhiasan.

2.3.3 Juzuk-juzuk Kimia

Benzokromene Orthokromene A, metilripariokromene A dan asetovanillokromene (Shibuya *et al.*, 1999a).

Diterpena Diterpena jenis isopimarane [orthosifonones A dan B (Shibuya *et al.*, 1999a), orthosifol A dan B (Masuda *et al.*, 1992), orthosifol F, G, H dan I (Stampoulis *et al.*, 1999)], diterpena jenis pimarane (neorthosifol A dan B) (Shibuya *et al.*, 1999b) dan staminol A (Stampoulis *et al.*, 1999).



Gambarfoto 2.3 *Orthosiphon stamineus*.

Minyak pati (0.02-0.7 %) Pelbagai sebatian termasuklah β -elemene, β -caryophyllene, α -humulene, β -caryophyllene oxide, can-2-one dan asid palmitik (Schut & Zwaving, 1986).

Flavonoid Sinensetin, tetrametilskutellarein dan tetrametoksilflavon yang lain, eupatorin, salvigenin, kirsimaritin, pilloin, ramnazin, trimetilapigenin dan tetrametilluteolin (Lyckander & Malterud, 1992; Malterud *et al.*, 1989; Wollenweber & Mann, 1985; Schneider & Tan, 1973; Bombardelli *et al.*, 1972). Flavonoid lipofili wujud dalam kepekatan kira-kira 0.2-0.3% (Malterud *et al.*, 1989); flavonoid glikosida turut hadir.

Lain-lain Asid kafeik dan terbitan (seperti asid rosmarinik), inositol, fitosterol (contohnya β -sitosterol) (Lyckander & Malterud, 1992; Sumaryono *et al.*, 1991) dan garam kalium.

2.3.4 Kegunaan Dalam Perubatan Tradisional

Misai Kucing ini digunakan untuk merawat penyakit batu karang dan melawaskan pembuangan air kencing dengan merebus keseluruhan pokok dan diminum. Bahagian daun dan akar juga boleh dijadikan bahan rebusan bagi mengubati penyakit kencing manis. Untuk rawatan darah tinggi dan melawaskan pembuangan air kecil, daun tumbuhan ini perlu direndam terlebih dahulu di dalam air panas dan dibiarkan hingga suam sebelum diminum (Kamarudin *et al.*, 2002a).

2.3.5 Kajian Aktiviti Antimikrob Terdahulu

Ekstrak akues *Orthosiphon aristatus* dilaporkan menunjukkan aktiviti antibakteria terhadap 2 serotip *Streptococcus mutans* (kepekatan perencat minimum 7.8 – 23.4)(Chen *et al.*, 1989).

Walau bagaimanapun, kajian *in vitro* lain melaporkan aktiviti antibakteria yang kekurangan bagi flavonoid (sinensetin, tetrametilskutellarein dan suatu tetrametoksiflavon pada kepekatan 10 dan 100 µg/mL) yang dipencilkan daripada daun *O. aristatus* terhadap *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* dan *Enterococcus* (Schut & Zwaving, 1993). Di samping itu, ekstrak *O. stamineus* didapati merencatkan percambahan spora pada 6 daripada 9 spesies kulat yang dikaji: *Saccharomyces pastorianus*, *Candida albicans*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum* dan *Trichophyton mentagrophytes* (Guerin & Reveillere, 1989).

2.3.6 Penutup

Seperti *A. paniculata* dan *C. asiatica*, *O. stamineus* juga dikategorikan sebagai herba yang paling berpotensi untuk dikomersialkan di Malaysia. Ini adalah kerana ia mudah ditanam dan kemujarabannya dalam merawat penyakit berkaitan sistem urinari dan ginjal yang terbukti melalui penyelidikan. Misai Kucing Plus merupakan salah satu produk yang boleh didapati dalam pasaran tempatan kini.

2.4 Sebatian Antimikrob Semula Jadi Daripada Tumbuhan

2.4.1 Pendahuluan

Secara amnya, komposisi suatu tumbuhan boleh dibahagikan kepada 2 kategori sebatian kimia, iaitu produk daripada metabolisme primer seperti karbohidrat, protein, lemak dan produk daripada metabolisme sekunder seperti sebatian fenol, asid fenolik, kuinon, flavonoid, tannin, kumarin, terpenoid dan alkaloid. Kebanyakan metabolit sekunder ini menyumbang kepada mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap kerosakan yang dilakukan oleh hidupan lain dan persekitaran supaya dapat termandiri di bumi ini. Daripada mekanisme pertahanan perumah ini wujudlah pelbagai fitokimia yang berfungsi sebagai agen antimikrob.

Sebatian antimikrob yang terdapat dalam tumbuhan sihat adalah alkaloid, diena, flavonol, flavon, glikosida, lakton, asid organik, sebatian fenol dan sebatian ala-protein (López-Malo *et al.*, 2000). Manakala sebatian yang terhasil akibat jangkitan atau kecederaan termasuklah isotiosianat, sebatian fenol, fitoaleksin dan sulfoksida (López-Malo *et al.*, 2000). Komponen semula jadi ini yang menunjukkan pelbagai tahap aktiviti antimikrob lazimnya dijumpai pada batang, daun, kulit, bunga dan buah tumbuhan.

Kebanyakan sebatian antimikrob yang berpunca daripada tumbuhan mempunyai spektrum aktiviti yang luas terhadap bakteria, kulat dan mikobakteria. Oleh yang demikian, terdapat cadangan untuk menggunakannya sebagai pengawet semula jadi dalam makanan (Farag *et al.*, 1989; Galli *et al.*, 1985; Conner & Beuchat, 1984a, b; Ramadan *et al.*, 1972).

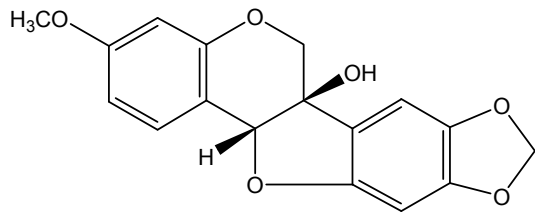
Liputan persuratan ini meninjau beberapa sebatian antimikrob semula jadi yang berasaskan tumbuhan yang paling berpotensi untuk digunakan sebagai antimikrob makanan.

2.4.2 Fitoaleksin

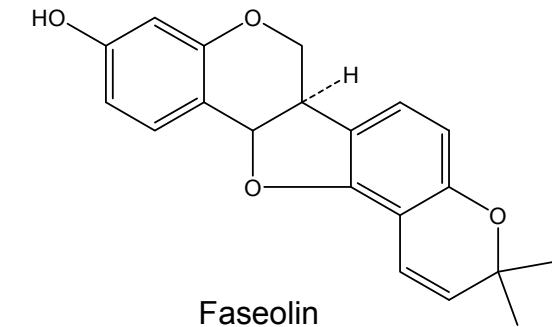
Menurut Mansfield (1986) dan Dixon *et al.* (1983), fitoaleksin boleh ditakrifkan sebagai sebatian antimikrob berberat molekul rendah, mempunyai spektrum tindakan luas, yang disintesisikan oleh perumah. Ia dihasilkan daripada pelopor jarak jauh sebagai tindak balas terhadap jangkitan mikrob ataupun perolahan tisu-tisu tumbuhan dengan suatu siri pengelisit biotik atau bukan biotik. Molekul-molekul yang mengisyaratkan tumbuhan bagi memulakan proses sintesis fitoaleksin dikenali sebagai pengelisit.

Fitoaleksin biasanya tidak dikesan atau wujud pada aras yang sangat rendah dalam tumbuhan sihat tetapi dapat dikumpulkan pada aras yang tinggi pada tapak jangkitan mikroorganisma (Tan, 1990).

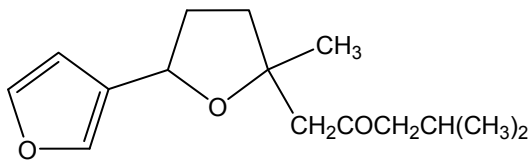
Beberapa sebatian telah disifatkan dan dicirikan sebagai fitoaleksin (Rajah 2.1). Kebanyakan fitoaleksin merupakan sebatian fenolik, misalnya pisatin dan faseolin, tetapi terdapat juga beberapa fitoaleksin yang bukan sebatian fenolik. Faseolin adalah antara fitoaleksin yang pertama dicirikan oleh Cruickshank & Perrin (1963). Antara fenolik tumbuhan, isoflavonoid, dengan struktur rangka asas C₆-C₃-C₆ (Harbone, 1980), adalah kelas kimia fitoaleksin yang predominan. Fitoaleksin bukan sebatian fenolik dapat diterbitkan daripada terpenoid seperti ipomeamaron dan risitin, atau diterbitkan daripada asid lemak seperti safinol dan weiron.



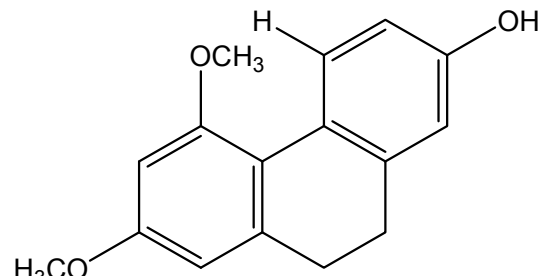
Pisatin
(*Pisum sativum*, Leguminosae)



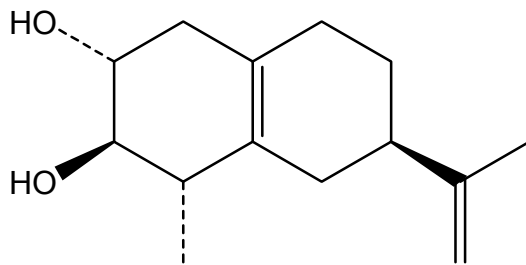
Faseolin
(*Phaseolus vulgaris*, Leguminosae)



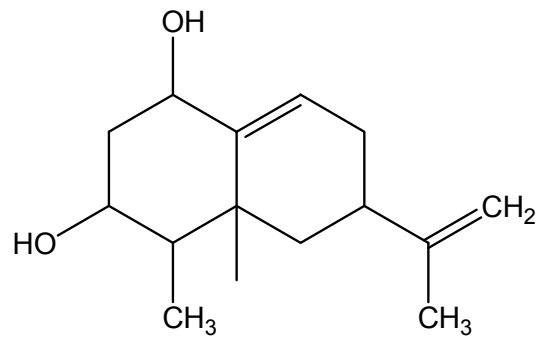
Pomeamaron
(*Ipomea batatis*, Convolvulaceae)



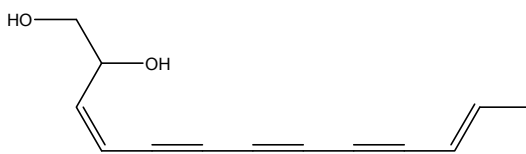
Orkinol
(*Orchis militaris*, Orchidaceae)



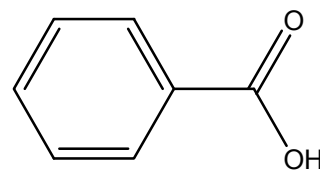
Risitin
(*Solanum tuberosum*, Solanaceae)



Kapsidiol
(*Capsicum frutescens*, Solanaceae)



Safinol
(*Carthamus tinctoria*, Compositae)



Asid Benzoik
(*Malus pumila*, Rosaceae)

Rajah 2.1 Beberapa Fitoaleksin Tumbuhan Peringkat Tinggi (Tan, 1990).

Rintangan tumbuh-tumbuhan terhadap pengkolonian bakteri, nematoda dan kulat kemungkinan besar adalah disebabkan oleh pengumpulan fitoaleksin (Mansfield, 1986). Spektrum antimikrob fitoaleksin yang utama adalah terhadap kulat. Tetapi aktiviti antimikrob terhadap beberapa spesies bakteri telah dilaporkan. Bakteria Gram positif didapati adalah lebih peka berbanding bakteria Gram negatif (Nychas, 1995).

Gnanaminickam dan rakan-rakan telah mengkaji sifat-sifat antibakteria pelbagai fitoaleksin dan menunjukkan bahawa fitoaleksin mempamerkan aktiviti selektif terhadap bakteria Gram positif (Gnanaminickam & Mansfield, 1981; Gnanaminickam & Smith, 1980). Kievitone adalah agen antibakteria yang paling kuat, pada kepekatan 2 µg/cakera kievitone berupaya merencatkan pertumbuhan *B. subtilis* dan *Micrococcus luteus* manakala 5 µg/cakera pula berupaya merencatkan *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus haemolyticus* dan *S. aureus*. Walaupun demikian, pada kepekatan setinggi 50 µg/cakera, kesemua fitoaleksin yang dikaji itu tidak menunjukkan sebarang aktiviti terhadap spesies Gram negatif.

Ketoksikan sesuatu fitoaleksin terhadap kulat adalah berkaitan dengan strukturnya. Isoflavonon adalah lebih toksik kepada kulat berbanding dengan isoflavon (Tan, 1990). Faseolin mempunyai kesan fungistatik terhadap *Monilina fructicola* (mikroorganisma bukan patogen pada kacang) pada kepekatan serendah 3 µg/mL dan kepekatan sebanyak 50 µg/mL diperlukan untuk menghasilkan kesan fungistatik yang sama terhadap *Colletotrichum lindenathinum* yang mengakibatkan antraknos pada kacang (Dickinson & Lucas, 1982).