

Penilaian aktiviti antimikrob dan antioksidan daun adas manis

(Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of dill leaves)

Mohd Effendi Mohamed Nor

Pengenalan

Anethum graveolens atau *dill* yang juga dikenali sebagai adas manis di Malaysia dan Indonesia merupakan spesies herba daripada famili Apiaceae atau Umbeliferae. Adas manis berasal dari negara Mediterranean dan Asia Barat, tetapi juga ditanam di Eropah, Amerika Syarikat, India dan Taiwan. Ia merupakan herba semusim yang mempunyai daun-daun halus sepanjang 2 – 3 cm serta berwarna hijau muda yang kelihatan seperti bulu dengan ketinggian 2 – 3 kaki (Gambar 1 dan 2). Di negara timur tengah seperti Iran dan Turki, herba ini digunakan sebagai bahan tambah dalam makanan disebabkan aromanya, dibuat teh dan minuman beralkohol serta dijadikan aromaterapi. Kajian membuktikan pengambilan daun adas manis mampu merendahkan risiko kanser dan mengurangkan tahap kolesterol. Daun dan biji adas manis mengandungi minyak pati yang kaya dengan pelbagai sebatian fenolik seperti carvone, furanocoumarine, limonene, xanthone, triterpene dan flavonoid. Minyak pati daripada adas manis mengandungi 35 sebatian fenolik dan 25 sebatian di dalam ekstrak. Sebatian yang paling banyak ialah carvone (55.2%) diikuti dill apirole (43.2%), asid linoleik (23.1%), limonene (16.6%) dan trans-anethole (11.0%). Sebatian-sebatian fenolik ini menyumbang kepada ciri-ciri antimikrob dan antioksidan adas manis serta penentuan pelarut terbaik dalam pengekstrakan daun adas manis yang dikaji.



Gambar 1. Pokok adas manis



Gambar 2. Daun adas manis

Pengekstrakan daun adas manis

Tiga pelarut telah digunakan untuk mengekstrak daun adas manis iaitu etanol, metanol dan air. Daun adas manis dibasuh bersih dan dikeringkan di dalam ketuhar pada suhu 50 °C semalaman. Daun yang telah kering kemudian dikisar sehingga halus dan ditimbang sebelum direndam di dalam larutan etanol (99.9%) dengan nisbah 1:6 (sampel : etanol) selama tiga hari. Ekstrak kemudian ditapis menerusi kertas Whatman No. 1 menggunakan corong Buchner dalam keadaan vakum untuk mempercepatkan penurasan. Hasil turasan yang dikumpul dipindahkan ke dalam kelalang bulat dan pelarut alkohol kemudian disingkirkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 55 °C. Ekstrak daun yang telah disejat, ditimbang dan disimpan pada suhu 4 °C untuk digunakan dalam analisis seterusnya. Pengekstrakan menggunakan metanol juga melalui proses yang sama kecuali pelarut etanol digantikan dengan metanol (99.7%).

Bagi pengekstrakan air pula, sampel daun adas manis direndam dalam air suling dengan nisbah 1:3 (sampel : air) dan dikisar sehingga hancur sebelum dibiarkan semalaman. Ekstrak ditapis melalui kertas Whatman No. 1 menggunakan kelalang Buchner dalam keadaan vakum. Hasil turasan yang dikumpul, disejatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 100 °C. Ekstrak yang pekat ditimbang dan disimpan pada suhu 4 °C. Pengekstrakan menggunakan air memberi hasil ekstrak yang paling banyak iaitu sebanyak 4.17%, diikuti ekstrak metanol (2.53%) dan ekstrak etanol (2.47%). Ketiga-tiga ekstrak yang dihasilkan mempunyai warna hijau gelap dengan aroma yang tajam. Setiap ekstrak dilarutkan di dalam air suling steril untuk menghasilkan larutan ekstrak dengan kepekatan 200, 400, 600, 800 dan 1,000 ppm sebelum analisis dijalankan.

Menentukan sifat antimikrob ekstrak adas manis

Ujian resapan cakera kertas

Ciri-ciri antimikrob ketiga-tiga ekstrak daun adas manis ditentukan menggunakan dua kaedah iaitu ujian resapan cakera

Sebanyak 20 µl mikroorganisma kajian (berkepekatan 10⁷ log CFU/ml) diinokulasi di atas agar pertumbuhan (Potato Dextrose Agar untuk fungi, Muller Hinton Agar untuk bakteria)

↓
20 °C larutan ekstrak dipindahkan pada cakera kertas steril dan diletakkan di atas agar pertumbuhan

↓
Semua agar dieram di dalam inkubator 24 – 48 jam (suhu 35 °C untuk bakteria, 25 °C untuk fungi)

↓
Pembentukan zon perencatan pertumbuhan diperiksa dan diukur

kertas (*disc diffusion test*) dan ujian perencatan langsung (*direct inhibition test*). Ujian resapan cakera juga dikenali sebagai ujian zon perencatan. Mikrob kajian yang digunakan terdiri daripada bakteria makanan iaitu *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella thypi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus leshmanni* dan fungi iaitu *Aspergillus niger* dan *Saccaromyces cerevisiae*. Kaedah bagi ujian resapan cakera diringkaskan seperti dalam Carta alir 1.

Carta alir 1. Langkah kerja ujian resapan cakera

Hasil analisis menunjukkan ekstrak air membantu pertumbuhan *B. cereus* dan *S. aureus*, manakala ekstrak metanol dan etanol efektif terhadap *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* dan *S. cerevisiae* (Jadual 1). Ketiga-tiga ekstrak didapati tidak efektif terhadap mikrob kajian yang lain iaitu *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *L. leishmanni* dan fungi *A. niger*. Diameter zon perencatan meningkat dengan peningkatan kepekatan ekstrak. Kajian lain juga melaporkan ekstrak adas manis menunjukkan ciri antimikrob yang lebih baik berbanding dengan ampicilin, bakterisid komersial dan efektif terhadap *B. cereus*, *S. aureus* dan *B. subtilis*, tetapi kurang efektif terhadap *P. aeruginosa* dan *S. typhi*. Carvone iaitu komponen kimia utama dalam ekstrak adas manis dilaporkan mempunyai keupayaan merencat pertumbuhan bakteria dan beberapa jenis fungi.

Ujian perencatan langsung

Kaedah bagi ujian perencatan langsung diringkaskan seperti dalam Carta alir 2. Medium pertumbuhan yang tidak ditambah dengan ekstrak bertindak sebagai sampel kawalan. Ekstrak etanol dan metanol berjaya merencat *E. coli*, *B. cereus* dan *S. aureus*, manakala ekstrak air hanya merencat *B. cereus* dan *S. aureus* (Jadual 2). Mengikut peratusan perencatan, ekstrak etanol menunjukkan ciri antimikrob yang paling baik berbanding dengan dua lagi ekstrak terutama pada kepekatan 1,000 ppm. Peratusan perencatan meningkat dengan peningkatan kepekatan ekstrak

Jadual 1. Aktiviti antimikrob ekstrak daun adas manis menggunakan ujian resapan cakera kertas

Bakteria	Kepekatan (ppm)	Zon perencatan (mm)		
		Ekstrak		
		Air	Metanol	Etanol
<i>Escherichia coli</i>	200	–	–	–
	400	–	–	–
	600	–	6	6
	800	–	6	6
	1,000	–	6	6
<i>Bacillus cereus</i>	200	–	–	–
	400	–	7	7
	600	7	7	7
	800	7	8	9
	1,000	7	8	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	–	–	–
	400	–	7	7
	600	7	7	7
	800	7	8	9
	1,000	7	8	9
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	200	–	–	–
	400	–	–	–
	600	–	–	–
	800	–	7	8
	1,000	–	7	8

dengan menggunakan teknik analisis yang sama, satu kajian lain juga telah melaporkan bahawa ekstrak adas manis menunjukkan kesan antimikrob yang efektif terhadap *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum* dan *Colletotrichum lindemuthianum*.

Menentukan sifat antioksidasi ekstrak adas manis

Tiga ujian dilakukan untuk menentukan sifat antioksidasi ekstrak daun adas manis iaitu ujian kuasa antioksidasi penurunan ferum

Medium pertumbuhan dituang ke dalam piring petri (*Potato Dextrose Agar* untuk fungi dan *Muller Hinton Agar* untuk bakteria)

1.0 ml setiap larutan ekstrak dititis ke dalam medium pertumbuhan dan agar dibiarkan mengeras

10 µl mikroorganisma kajian dititis di atas agar dan diseratakan menggunakan rod kaca L yang steril

Semua medium dieram di dalam inkubator (suhu 35 °C, 24 jam untuk bakteria, suhu 25 °C, 72 jam untuk fungi)

Bilangan koloni bakteria dan fungi yang hidup dikira dan peraturan perencatan pertumbuhan dikira berdasarkan perbandingan pertumbuhan pada medium kawalan

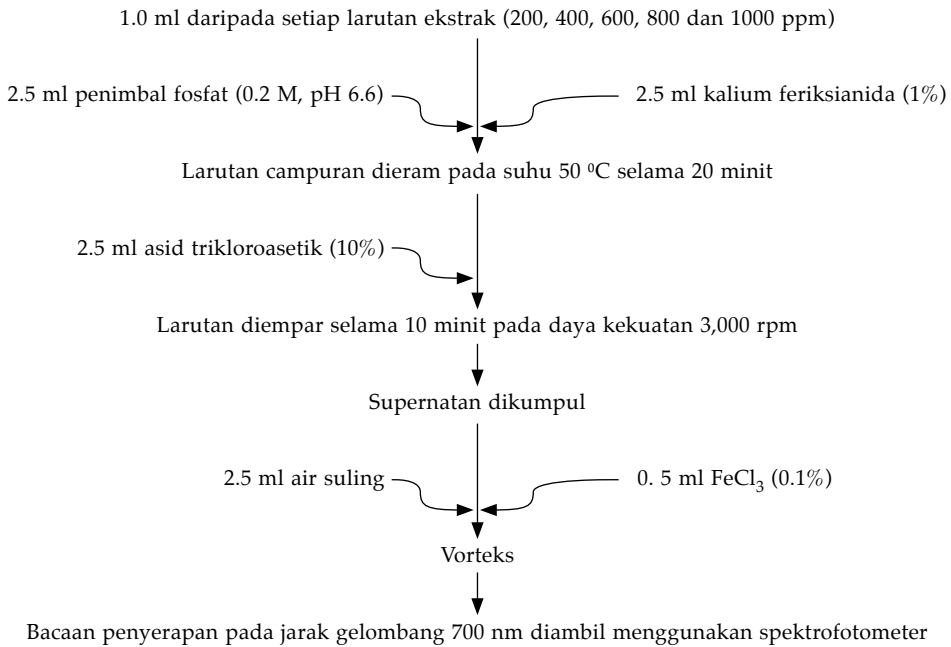
Carta alir 2. Langkah kerja ujian perencatan langsung

(III), ujian ferik thiosianat (FTC) dan ujian asid thiobarbiturik (TBA). Kaedah untuk ketiga-tiga ujian ini diringkaskan seperti dalam *Carta alir* 3, 4 dan 5.

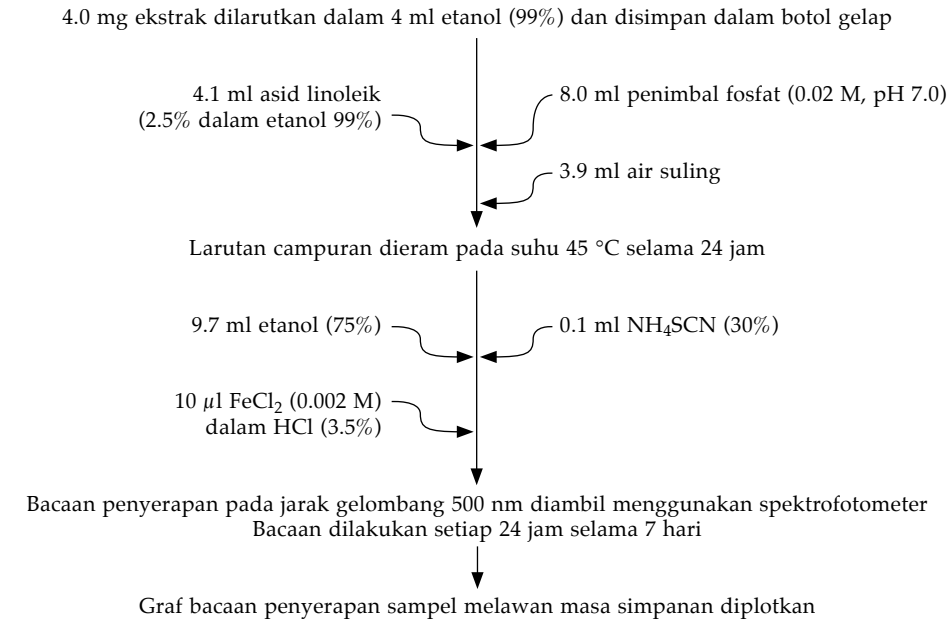
Butylated hydroxyl anisole (BHA) dan *Butylated hydroxyl toluene* (BHT) digunakan sebagai sampel perbandingan. Graf bacaan penyerapan sampel melawan kepekatan ekstrak diplotkan. Bacaan penyerapan yang tinggi menunjukkan kuasa penurunan ferum (III) yang tinggi. Kuasa penurunan ferum (III) didapati meningkat dengan peningkatan kepekatan ekstrak (*Rajah 1*). Ekstrak etanol mempamerkan kuasa penurunan ferum (III) yang paling baik pada setiap kepekatan ekstrak yang digunakan, diikuti

Jadual 2. Aktiviti antimikrob ekstrak daun adas manis menggunakan ujian perencatan langsung.

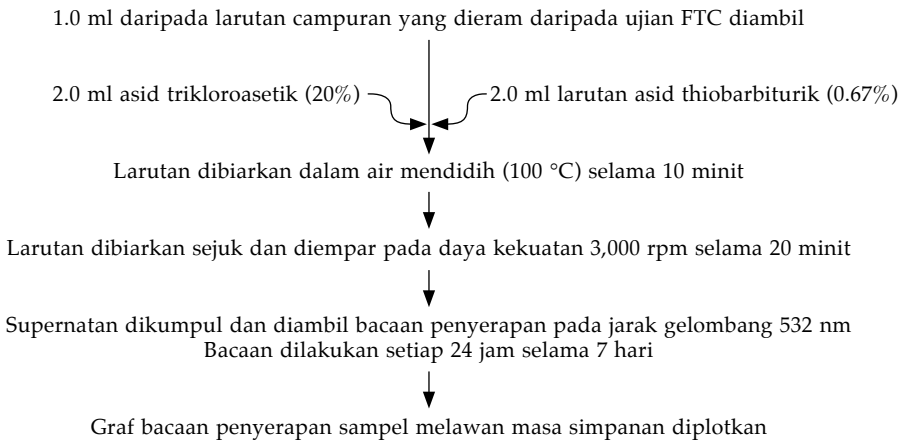
Bakteria	Kepekatan (ppm)	Peratus perencatan (%)		
		Ekstrak		
		Air	Metanol	Etanol
<i>Escherichia coli</i>	200	–	–	–
	400	–	–	–
	600	–	–	–
	800	–	21.04	21.20
	1,000	–	28.50	43.48
<i>Bacillus cereus</i>	200	–	–	–
	400	–	–	28.27
	600	24.73	22.07	53.18
	800	60.20	49.42	77.57
	1,000	77.46	77.77	88.23
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	–	–	–
	400	–	–	20.93
	600	22.16	25.71	36.83
	800	55.82	52.82	63.83
	1,000	71.14	83.70	91.81



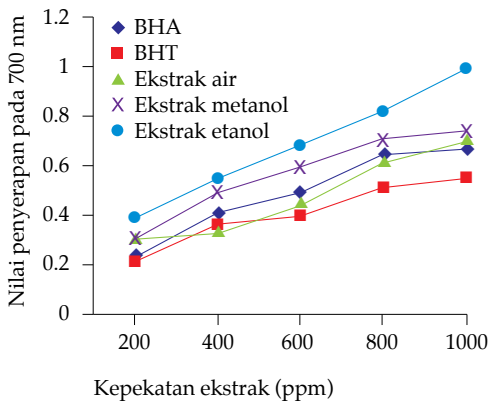
Carta alir 3. Langkah kerja ujian kuasa antioksidan penurunan ferum (III)



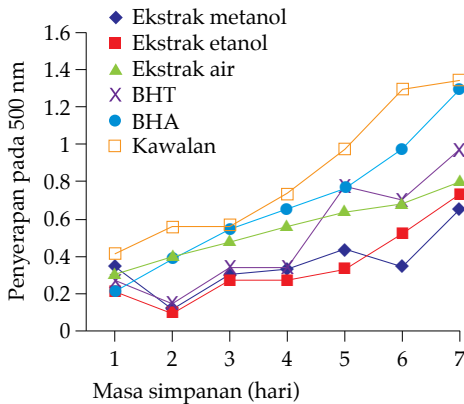
Carta alir 4. Langkah kerja ujian ferik thiosianat (FTC)



Carta alir 5. Langkah kerja ujian asid thiobarbiturik (TBA)



Rajah 1. Analisis kuasa antioksidasi penurunan ferum (III)



Rajah 2. Analisis pengoksidaan asid linoleik menggunakan kaedah ferik thiosianat (FTC)

ekstrak metanol berbanding dengan antioksidasi sintetik iaitu BHA dan BHT. Ekstrak air pula mempamerkan kuasa penurunan yang lebih rendah berbanding dengan BHA. Kajian antioksidasi menunjukkan ciri antioksidasi ekstrak adas manis yang lebih baik daripada antioksidasi sintetik BHA, BHT dan *Propil galat* (PG).

Ujian ferik thiosianat (FTC)

Ujian FTC adalah analisis menilai aras peroksida semasa peringkat awal peroksidaan. Nilai penyerapan yang rendah menandakan aras peroksida yang rendah seterusnya menunjukkan aktiviti antioksidasi yang tinggi. Rajah 2 menunjukkan nilai penyerapan tiga sampel ekstrak adas manis bersama antioksidasi sintetik semasa 7 hari simpanan. Ekstrak etanol dan metanol mempamerkan nilai penyerapan yang paling rendah sepanjang 7 hari simpanan berbanding dengan ekstrak air, BHA, BHT dan kawalan, menandakan aktiviti antioksidasi yang baik pada kedua-dua ekstrak. Sampel BHT pula mempamerkan aktiviti antioksidasi yang lebih baik berbanding dengan ekstrak

air pada 4 hari pertama simpanan. Dilaporkan dalam kajian-kajian terdahulu, ekstrak herba adas manis, ulam raja, daun

kesum, selom, pegaga dan daun kari berupaya menyekat oksidasi asid linoleik berbanding dengan antioksidan sintetik apabila dalam analisis yang sama.

Analisis TBA dilakukan untuk mengukur produk sekunder hasil proses oksidasi seperti aldehid dan keton. *Rajah 3* menunjukkan nilai penyerapan tiga ekstrak dan antioksidan sintetik sepanjang 7 hari simpanan. Nilai penyerapan yang rendah menandakan aras produk sekunder yang rendah. Didapati semua sampel (kecuali sampel kawalan) menunjukkan nilai penyerapan yang rendah (tiada perbezaan signifikan) sehingga hari ke-4 simpanan. Pada hari ke-5 hingga hari ke-7, nilai penyerapan ketiga-tiga ekstrak masih kekal rendah berbanding dengan BHA, BHT dan sampel kawalan, menandakan aras produk sekunder yang rendah dalam larutan ekstrak.

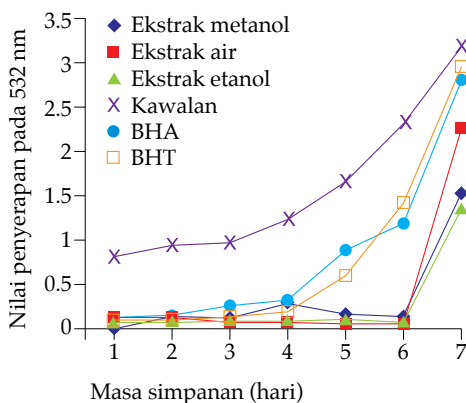
Terdapat beberapa faktor yang menentukan aktiviti antioksidan ekstrak herba, antaranya adalah struktur sebatian kimia, kepekatan ekstrak, suhu, cahaya, jenis substrat, keadaan fizikal sesuatu sistem dan kehadiran komponen mikro yang bertindak sebagai prooksidan atau *synergis*. Selain itu, pelarut yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak juga memainkan peranan. Komponen yang berpolariti tinggi akan larut dalam ekstrak akueus manakala komponen yang kurang berpolar akan larut dalam ekstrak organik. Maka, beberapa komponen aktif yang berbeza kepolaran mungkin hadir dengan amaun yang berbeza-beza dalam suatu ekstrak.

Kesimpulan

Aktiviti antimikrob dan antioksidan yang terdapat pada daun adas manis dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan semasa pengekstrakan. Ekstrak yang dihasilkan daripada pelarut yang berbeza menunjukkan aktiviti antimikrob dan antioksidan yang berbeza. Berdasarkan analisis yang telah dijalankan, ekstrak etanol dan metanol daun adas manis telah mempamerkan aktiviti antimikrob dan antioksidan yang lebih baik berbanding dengan ekstrak air.

Penghargaan

Penulis merakamkan ucapan terima kasih kepada pensyarah dan pembantu makmal serta rakan-rakan kuliah kerana membantu memberi komen dan cadangan dalam menjalankan kajian ringkas ini.



Rajah 3. Analisis pembentukan malonaldehid menggunakan kaedah asid thiobarbiturik (TBA)

Bibliografi

- Agrawal, K.K., Khanuja, S.P.S., Ahmed, A., Santhakumar, T.R., Gupta, V.K. dan Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Fragrance Journal* 17: 59 – 63
- Cao, G. dan Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44: 1309 – 1315
- Farag, R.S., Daw, Z.Y. dan Abo-Raya, S.H. (1989). Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxin in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 54: 74 – 76
- Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E. dan Kufrevioglu, I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 83: 371 – 382
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Matilla-Sandholm, T., Pol, I. dan Smid, E.J. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agric Food Chem.* 46: 3590 – 3595
- Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A.S. dan Babji, A.S. (2007). Antioxidative activities of water extracts of some Malaysia herbs. *ASEAN Food Journal* 14: 61 – 68
- Kamal-Eldin, A. dan Appelqvist, L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671 – 701
- Kikuzaki, H. dan Natakani, N. (1993). Antioxidant effect of some ginger constituents. *Journal of Food Sci.* 578: 1407 – 1410
- Koleva, I.I., Niederlander, H.A.G. dan Van Beek, T.A. (2001). Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC elutes. *Analytical Chem.* 73: 3373 – 3381
- Lanky, P. S., Schilder, H., Phillipson, J.D. dan Loew, D. (1993). Plants that lower cholesterol. *Acta Horticulturae* 332: 131 – 136
- Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I. dan Mitchel, G. (1996). Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Medica* 62: 275 – 277
- Oosterhaven, K., Leitao, A.C., Gorris, L.G.M. dan Smid, E.J. (1996). Comparative study on the action of carvone *in situ* on the potato storage fungi *Fusarium solani* and *Fusarium sulphurium*. *Journal of Appl Bacteriol* 80: 535 – 539
- Osawa, T. dan Namaki, M. (1983). A novel type antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric Biol Chem.* 45: 735 – 739
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of the products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307 – 315
- Ramdas, K., Suresh, G., Janardhanan, N. dan Masilamani, S. (1998). Antifungal activity of 1,3-disubstituted symmetrical and unsymmetrical Thioureas. *Pesticidal Sci.* 52: 145 – 151
- Shridhar, S.R., Rajagopal, R.V., Rajavel, R., Masilamani, S. dan Narasimhan, (2003). Antifungal activity of some essential oil. *J. Agric Food Chem.* 51: 7596 – 7599
- Singh, G., Maurya S., de Lampasona, M.P dan Catalan, C. (2005). Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: Part 52. *Journal of Food Sc.* 70: 208 – 215
- Smid, E.J., de Witte, Y. dan Gorris, L.G.M. (1995). Secondary plant metabolites as control agents of post harvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Postharvest Biotechnology* 6: 303 – 312
- Yang, Y., Huang, C.Y., Peng, S.S. dan Li, J. (1996). Carotenoid analysis of several dark-green leafy vegetables associated with a lower risk of cancers. *Biomedical and Environmental Sciences* 9: 386 – 392

Ringkasan

Kajian ini dijalankan untuk menentukan pelarut yang lebih baik dalam menghasilkan ekstrak daripada daun adas manis (*Anethum graveolens*) dan seterusnya membandingkan aktiviti antimikrob dan antioksidan ekstrak daun adas manis. Pelarut yang digunakan ialah etanol, metanol dan air. Pengekstrakan menggunakan alkohol didapati menghasilkan ekstrak daun adas manis dengan ciri-ciri antimikrob dan antioksidan yang lebih baik berbanding dengan ekstrak air.

Summary

This study was conducted to determine the best solvent for extraction of *adas manis* leaves (*Anethum graveolens*) and to compare antimicrobial and antioxidant activities of *adas manis* extracts. Solvents used in extraction were ethanol, methanol and water. Alcoholic extraction produced better *adas manis* extract with better antimicrobial and antioxidant activities compared to water extract.

Pengarang

Mohd Effendi Mohamed Nor
Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor
E-mel: effendi@mardi.gov.my