Sains Malaysiana 55(10)(2026): 1714-1724
http://doi.org/10.17576/jsm-2026-5510-10

Pendekatan Metabolomik berasaskan ^{1}H NMR bagi Analisis Profil Metabolit Daun *Dillenia suffruticosa*: Implikasi Kepolaran Pelarut terhadap Potensi Anti-*Vibrio*

(^{1}H NMR-Based Metabolomic Approach for Metabolite Profiling of *Dillenia suffruticosa* Leaves: Implications of Solvent Polarity on Anti-*Vibrio* Potential)

AZIZUL ISHA[1,*], NORAZNITA SHARIFUDDIN[2], MAZNI ABU ZARIN[3], YAYA RUKAYADI[1] & AHMAD FAIZAL ABDULL RAZIS[1]

[1]*Natural Medicines and Products Research Laboratory, Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia*
[2]*Aquatic Animal Health and Therapeutics Laboratory, Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia*
[3]*Laboratory of Vaccine and Biomolecules, Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia*

Diserahkan: 4 November 2025/Diterima: 28 September 2026

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: azizul_isha@upm.edu.my

ABSTRAK

Ancaman kerintangan antimikrob patogen *Vibrio* kian menjejaskan industri akuakultur dan keselamatan makanan dunia. Justeru, kajian ini menilai sifat antibakteria ekstrak daun *Dillenia suffruticosa* terhadap empat patogen *Vibrio* (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* dan *V. harveyi*) menggunakan pendekatan metabolomik ^{1}H NMR bagi merungkai korelasi antara komposisi metabolit dengan bioaktivitinya. Aktiviti antibakteria ekstrak berbeza kepolaran (etanol 70% (v/v), aseton, kloroform dan heksana) dinilai melalui resapan cakera, kepekatan perencatan minimum (MIC) dan kepekatan bakterisid minimum (MBC). Ekstrak kloroform menunjukkan perencatan terkuat dengan zon perencatan 20.52 ± 0.44 mm (*V. parahaemolyticus*) dan nilai MIC serendah 0.039 mg/mL (*V. vulnificus*). Ekstrak etanol 70% (v/v) dan aseton berkesan sederhana, manakala heksana paling lemah. Spektrum ^{1}H NMR mendedahkan pelbagai metabolom termasuk asid amino, asid organik, gula, triterpenoid, sterol dan sebatian fenol. Analisis multivariat (Analisis Komponen Utama (PCA) dan Kuasa Dua Terkecil Separa (PLS)) membezakan ekstrak berdasarkan jenis pelarut. Biplot PLS mendedahkan korelasi positif kaempferol, sarkosina dan asid organik terhadap perencatan *V. vulnificus*, *V. campbellii* dan *V. harveyi*. Walau bagaimanapun, korelasi negatif majoriti sebatian fenol terhadap *V. parahaemolyticus* membuktikan rintangan tinggi patogen tersebut terhadap ekstrak hidrofilik. Metabolit ini diketahui berupaya mengganggu pembentukan biofilem, pengesanan kuorum, pergerakan sel serta laluan virulens *Vibrio*, sekali gus menyokong asas mekanistik aktiviti tersebut. Kesimpulannya, korelasi profil metabolomik dan bioaktiviti memberi pemahaman menyeluruh tentang pengaruh kepolaran pelarut terhadap pemulihan metabolit. Kajian ini menyerlahkan keupayaan *D. suffruticosa* sebagai sumber agen antibakteria bagi menangani isu akuakultur dan keselamatan makanan.

Kata kunci: Aktiviti antibakteria; *Dillenia suffruticosa*; metabolit bioaktif; metabolomik ^{1}H NMR; *Vibrio* spp.

ABSTRACT

The threat of antimicrobial resistance among *Vibrio* pathogens is increasingly threatening the aquaculture industry and global food security. Therefore, this study evaluates the antibacterial properties of *Dillenia suffruticosa* leaf extracts against four *Vibrio* pathogens (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, and *V. harveyi*) utilizing a ^{1}H-NMR metabolomics approach to elucidate the correlation between metabolite composition and its bioactivity. The antibacterial activity of extracts with varying polarities (70% (v/v) ethanol, acetone, chloroform, and hexane) was evaluated through agar well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) assays. The chloroform extract exhibited the strongest inhibition, with an inhibition zone of 20.52 ± 0.44 mm (*V. parahaemolyticus*) and an MIC value as low as 0.039 mg/mL (*V. vulnificus*). The 70% (v/v) ethanol and acetone extracts were moderately effective, while the hexane extract was the weakest. The ^{1}H-NMR spectra showed a diverse metabolome, including amino acids, organic acids, sugars, triterpenoids, sterols, and phenolic compounds. Multivariate analysis (Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS)) differentiated the extracts based on the type

of solvent. The PLS biplot showed a positive correlation of kaempferol, sarcosine, and organic acids with the inhibition of *V. vulnificus*, *V. campbellii*, and *V. harveyi*. However, the negative correlation of the majority of phenolic compounds against *V. parahaemolyticus* proved the high resistance of this pathogen towards hydrophilic extracts. These metabolites are known to interfere with *Vibrio* biofilm formation, quorum sensing, cell motility, and virulence pathways, thus supporting the mechanistic basis for the observed activity. In conclusion, the correlation between metabolomic profiling and bioactivity provides a comprehensive understanding of the influence of solvent polarity on metabolite recovery. This study highlights the capability of *D. suffruticosa* as a source of antibacterial agents to address aquaculture and food safety issues.

Keywords: Antibacterial activity; bioactive metabolites; *Dillenia suffruticosa*; ^{1}H-NMR metabolomics; *Vibrio* spp.

PENGENALAN

Dillenia suffruticosa atau lebih dikenali sebagai simpoh air, ialah pokok renek malar hijau bersaiz besar yang berasal dari Asia Tenggara, khususnya Malaysia, Indonesia dan Singapura. Secara tradisi, daun serta bahagian lain tumbuhan ini telah digunakan dalam perubatan herba untuk merawat pelbagai penyakit termasuk luka, demam, keradangan dan bengkak. Rebusan serta tuam daun turut diamalkan dalam rawatan selepas bersalin dan bagi mengurangkan kesakitan, sekali gus menonjolkan kepentingannya dalam amalan perubatan tradisi (Abubakar et al. 2019; Goh et al. 2021; Shah et al. 2015).

Analisis fitokimia menunjukkan bahawa *D. suffruticosa* mengandungi pelbagai sebatian bioaktif, termasuk asid fenol, flavonoid, tanin, terpenoid dan steroid. Antara sebatian utama yang dikenal pasti ialah kuersetin, kaempferol, rutin, asid galik, asid kafeik, asid ferulik, asid betulinik dan lupeol. Metabolit ini telah dikaitkan dengan pelbagai aktiviti farmakologi seperti antioksidan, anti-radang, antikanser dan antimikrob. Sebatian flavonoid dan asid fenol dilaporkan mempunyai perkaitan yang kuat dengan aktiviti antibakteria, manakala triterpenoid seperti lupeol dan asid betulinik lebih sering dikaitkan dengan kesan anti-radang serta sitotoksik (Abubakar et al. 2019; Adamczak, Ożarowski & Karpiński 2019; Tan et al. 2022).

Kajian terdahulu menunjukkan bahawa spesies *Vibrio*—seperti *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* dan *V. harveyi*—merupakan patogen penting dalam akuakultur dan jangkitan bawaan makanan laut. Ia dikenal pasti sebagai agen penyebab utama penyakit vibriosis dalam ternakan ikan dan udang, yang mengakibatkan kerugian ekonomi serta menimbulkan isu keselamatan makanan. Walaupun ekstrak tumbuhan yang kaya dengan sebatian fenol telah dilaporkan mempunyai kesan perencatan terhadap bakteria tersebut, metabolit khusus yang bertanggungjawab terhadap aktiviti ini masih belum dikenal pasti (Miklasińska-Majdanik et al. 2018; Tomotake et al. 2006).

Sementara itu, penemuan terkini membuktikan bahawa *D. suffruticosa* mempunyai aktiviti antimikrob yang ketara, termasuklah keupayaan untuk menghalang pertumbuhan spesies *Vibrio* tersebut. Ekstrak daun berasaskan etanol dan metanol dilaporkan berupaya menghalang pertumbuhan bakteria Gram-positif seperti *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*, serta bakteria Gram-negatif seperti *Escherichia coli*. Analisis yang telah dilakukan turut menunjukkan bahawa kehadiran sebatian asid fenol dan flavonoid berpotensi menyumbang kepada aktiviti antibakteria tersebut (Martina, Cabalquinto & Lumogdang 2024; Yakop et al. 2020).

Kajian ini menggunakan pendekatan metabolomik berasaskan ^{1}H NMR bersama analisis data multivariat bagi memprofilkan metabolit daripada ekstrak daun *D. suffruticosa* yang disediakan menggunakan pelarut dengan kepolaran berbeza. Korelasi antara profil metabolit dan aktiviti antibakteria terhadap spesies *Vibrio* dianalisis menggunakan analisis komponen utama (PCA) dan kuasa dua terkecil separa (PLS) bagi mengenal pasti metabolit yang mempunyai perkaitan paling rapat dengan aktiviti anti-*Vibrio*. Keputusan kajian ini dijangka dapat memberikan pandangan baharu tentang potensi *D. suffruticosa* sebagai sumber antimikrob semula jadi.

KAEDAH KAJIAN

BAHAN

Pelarut gred analisis iaitu etanol, *n*-heksana, aseton dan kloroform digunakan untuk pengekstrakan. Metanol berdeuterium-d_4 (CD_3OD, 99.8%), penimbal kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4, pH 6.0), deuterium oksida (D_2O, 99.9%) dan garam natrium asid trimetilsililpropionat-d_4 (TSP) diperoleh daripada Merck (Darmstadt, Jerman). Air ternyahion diperoleh menggunakan sistem PURELAB Chorus 2 (ELGA Lab Water, USA). Strain *V. vulnificus* (ATCC 33147), *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V. campbellii* (ATCC BAA-1116) dan *V. harveyi* (ATCC 35084) diperoleh daripada American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Agar Mueller–Hinton (MHA) dan sup Mueller–Hinton (MHB) diperoleh daripada Difco (Sparks, USA), manakala dimetil sulfoksida (DMSO) diperoleh daripada Sigma-Aldrich.

PENGUMPULAN DAN PENYEDIAAN BAHAN TUMBUHAN

Daun *D. suffruticosa* diperoleh dari Institut Biosains, Universiti Putra Malaysia. Selepas dipetik, daun dibersihkan menggunakan air suling yang mengalir,

dikeringkan dengan tisu makmal dan disimpan di dalam bekas kedap udara pada suhu ultra-rendah (–80 °C) semalaman. Seterusnya, sampel dikering-bekukan selama 72 jam menggunakan alat pengering-beku (Labconco) sebelum dikisar menjadi serbuk halus dengan pengisar makmal (Waring, 32 BL80, USA). Serbuk yang terhasil disimpan pada suhu –80 °C sehingga digunakan.

PENYEDIAAN EKSTRAK

Bagi proses pengekstrakan, sebanyak 10 g sampel serbuk daun kering-beku telah diekstrak secara berasingan melalui kaedah sonikasi selama 20 minit pada suhu terkawal 25 °C, menggunakan 200 mL pelarut organik, iaitu etanol 70% (v/v), aseton, kloroform dan heksana. Proses pengekstrakan diulang tiga kali. Semua ekstrak kemudiannya digabungkan dan ditapis menggunakan kertas turas Whatman (125 mm). Pelarut dalam ekstrak tersebut kemudiannya disejatkan menggunakan penyejat berputar pada suhu 40 °C bagi memperoleh ekstrak mentah. Enam replikasi disediakan bagi setiap jenis pelarut.

PENYEDIAAN SAMPEL UNTUK UJIAN ANTIMIKROB

Larutan stok (100 mg/mL) disediakan dengan melarutkan 10 mg ekstrak mentah dalam 100 µL DMSO. Larutan stok kemudiannya dicairkan dengan 900 µL air suling untuk menghasilkan larutan ujian 1% (10 mg/mL).

UJIAN DIFUSI CAKERA

Aktiviti antibakteria ditentukan menggunakan kaedah difusi cakera (Rukayadi et al. 2009). Strain *Vibrio* dikultur pada MHA yang ditambah 1% NaCl. Suspensi sel dilaras kepada piawai McFarland 0.5 dan diinokulasi pada piring baharu menggunakan kapas steril. Cakera kertas turas (6 mm, Whatman) diresapkan dengan 10 µL larutan ekstrak (10 mg/mL) dan diletakkan di atas permukaan piring inokulasi. Selepas 24 jam pengeraman pada 37 °C, zon perencatan diukur dalam milimeter. Enam replikasi dijalankan bagi setiap ekstrak, manakala tetrasiklin (5 µg) digunakan sebagai kawalan positif.

PENENTUAN KEPEKATAN PERENCATAN MINIMUM (MIC) DAN KEPEKATAN BAKTERISIDAL MINIMUM (MBC)

Nilai MIC ekstrak daun *D. suffruticosa* terhadap *Vibrio* spp. ditentukan menggunakan kaedah mikropencairan kaldu. Pencairan bersiri dua kali ganda (10-0.0195 mg/mL) disediakan dalam air suling steril dan diuji dalam plat 96-perigi yang mengandungi kaldu Mueller–Hinton dengan 1% NaCl. Perigi diinokulasi dengan suspensi bakteria dengan tetrasiklin sebagai kawalan positif dan air steril sebagai kawalan negatif. Plat dieram pada 37 °C selama 24 jam dan nilai MIC ditentukan sebagai kepekatan terendah tanpa pertumbuhan yang kelihatan. Bagi MBC, sebanyak 10 µL daripada perigi MIC disubkultur pada agar Mueller–Hinton dan dieram dalam keadaan yang sama. MBC ditentukan sebagai kepekatan terendah tanpa pertumbuhan koloni bakteria. Semua ujian dijalankan secara triplikat.

SPEKTROSKOPI NMR DAN ANALISIS MULTIVARIAT

Analisis ^{1}H NMR dilakukan pada suhu 25 °C menggunakan spektrometer Varian INOVA 500 MHz. Untuk penyediaan sampel, 50 mg ekstrak dicampurkan dengan 0.75 mL campuran metanol-d_4:penimbal KH_2PO_4 (1:1, pH 6.0 dalam D_2O) yang mengandungi 0.1% TSP. Campuran digoncang selama 1 minit, disonikasi selama 20 minit dan diempar pada 10,000 rpm selama 10 minit. Supernatan (0.6 mL) dipindahkan ke tiub NMR untuk analisis. Spektrum diproses menggunakan perisian Chenomx, dibahagikan kepada julat 0.04 ppm (0.50-10.00 ppm) dan dinormalkan menggunakan penskalaan Pareto. Julat yang sepadan dengan air (4.70-4.90 ppm) dan metanol (3.23-3.36 ppm) dikecualikan. Analisis multivariat (PCA dan PLS) dijalankan menggunakan SIMCA-P (v13.0, Umetrics, Sweden). Matriks *X* terdiri daripada anjakan kimia NMR, manakala pemboleh ubah *Y* mewakili diameter zon perencatan daripada ujian difusi cakera. Pengesahan model dilakukan menggunakan ujian permutasi. Pengenalpastian metabolit dibuat dengan membandingkan isyarat NMR dengan data terdahulu, perisian Chenomx, Pangkalan Data Metabolom Manusia (www.hmdb.ca) dan disokong dengan data NMR 2D *J*-resolved.

HASIL DAN PERBINCANGAN

AKTIVITI ANTIBAKTERIA EKSTRAK DAUN *D. suffruticosa*

Aktiviti antibakteria ekstrak daun *D. suffruticosa* terhadap spesies *Vibrio* menunjukkan variasi yang ketara bergantung pada jenis pelarut yang digunakan. Keputusan ini sekali gus menegaskan kepentingan tahap kepolaran pelarut dalam proses pengekstrakan fitokimia. Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1, ekstrak kloroform menghasilkan zon perencatan paling besar, khususnya terhadap *V. parahaemolyticus* (20.52 ± 0.44 mm) dan *V. vulnificus* (20.52 ± 0.56 mm). Sebaliknya, ekstrak etanol 70% (v/v) dan aseton hanya menunjukkan tahap perencatan sederhana (8.42-19.91 mm). Hal ini dipengaruhi oleh sifat pelarut polar seperti etanol 70% (v/v) dan aseton yang cenderung mengekstrak sebatian hidrofilik seperti asid fenol dan flavonoid (Indrianingsih et al. 2024). Walaupun profil metabolit polar ini mempunyai sifat antibakteria, kesan perencatannya terhadap spesies *Vibrio* hanyalah pada tahap sederhana berbanding ekstrak kloroform. Secara khususnya, zon perencatan *V. parahaemolyticus* adalah yang paling lemah bagi ekstrak etanol 70% (v/v) iaitu hanya 8.42 ± 0.37 mm. Keadaan ini didorong oleh tahap toleransi (rintangan) semula jadi *V. parahaemolyticus* yang sangat tinggi berbanding spesies *Vibrio* lain, yang mana ia memerlukan

kepekatan rawatan yang jauh lebih tinggi untuk mencapai kesan bakterisid (He et al. 2016; Hu & Chen 2016; Yang et al. 2024). Sifat rintangan struktur sel *V. parahaemolyticus* ini dipercayai menyukarkan sebatian polar dalam ekstrak etanol 70% (v/v) untuk menembusinya secara cekap, menjadikan ia kurang cekap melawan patogen ini berbanding metabolit dalam ekstrak kloroform (Yang et al. 2024).

Manakala ekstrak heksana menunjukkan zon perencatan paling lemah (11.68-16.16 mm) secara keseluruhannya. Keputusan ini mencadangkan bahawa triterpenoid dan sterol yang dominan dalam ekstrak tidak polar kurang menyumbang kepada potensi antibakteria. Namun begitu, pola keberkesanan pengekstrakan pelarut polar dan separa polar dalam melawan patogen secara umumnya adalah sejajar dengan laporan terdahulu. Ia menunjukkan bahawa ekstrak etanol 70% (v/v) dan aseton lebih berkesan terhadap bakteria patogen disebabkan oleh kandungan asid fenol dan flavonoid yang lebih tinggi (Ahmed, Murtaza & Ahmed 2024; Lawrence, Tripathi & Jeyakumar 2009). Keputusan serupa turut direkodkan dalam kajian terhadap *Terminalia catappa* dan *Psidium guajava* yang menunjukkan bahawa fraksi etanol yang kaya dengan sebatian fenol lebih aktif terhadap *Vibrio* spp. berbanding fraksi heksana (Nadirah, Wee & Najiah 2013; Yamanaka et al. 2008).

NILAI MIC DAN MBC EKSTRAK *D. suffruticosa*

Data nilai MIC dan MBC yang ditunjukkan dalam Jadual 2 mengukuhkan dapatan sebelumnya. Ekstrak kloroform menunjukkan nilai MIC paling rendah (0.039 mg/mL) terhadap *V. vulnificus*, menandakan kesan perencatan pertumbuhan bakteria yang sangat kuat. Sebaliknya, ekstrak etanol 70% (v/v) dan aseton menunjukkan nilai MIC sederhana (0.156-0.625 mg/mL) secara keseluruhannya terhadap keempat-empat spesies *Vibrio* yang diuji (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* dan *V. harveyi*), manakala ekstrak heksana memerlukan kepekatan yang lebih tinggi (0.313-0.625 mg/mL) untuk menghasilkan kesan perencatan terhadap patogen tersebut.

Aktiviti bakterisid (MBC) turut memperkukuh keberkesanan ekstrak kloroform, dengan nilai serendah 0.313 mg/mL terhadap *V. vulnificus*. Bagi *V. campbellii,* ekstrak kloroform merekodkan nilai MBC pada 0.625 mg/mL, yang mana merupakan kepekatan bakterisid terendah yang turut dicapai oleh ekstrak etanol 70% (v/v) dan aseton, berbanding ekstrak heksana (1.250 mg/mL). Penemuan

JADUAL 1. Zon perencatan daun *D. suffruticosa* yang diekstrak menggunakan pelarut berbeza terhadap strain *Vibrio*

Strain *Vibrio*	Tetrasiklin (5 µg)	Diameter zon perencatan (mm)			
		Etanol 70% (v/v)	Aseton	Kloroform	Heksana
V. vulnificus (ATCC 33147)	22.00±0.00	19.91±0.49	18.59±0.78	20.52±0.56	16.16±0.51
V. parahaemolyticus (ATCC 17802)	17.00±0.00	8.42±0.37	15.00±0.61	20.52±0.44	11.68±0.37
V. campbellii (ATCC BAA-1116)	24.55±0.30	18.89±0.49	18.13±0.44	19.39±0.33	14.46±0.35
V. harveyi (ATCC 35084)	16.33±0.88	14.23±0.52	17.36±0.18	15.08±0.54	13.83±0.45

Diameter zon perencatan dalam mm (termasuk cakera). Nilai dinyatakan sebagai min ± sisihan piawai (SD)

JADUAL 2. Nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) dan kepekatan bakterisidal minimum (MBC) (mg/mL) bagi ekstrak daun *D. suffruticosa* dengan pelarut berbeza terhadap strain *Vibrio*

Spesies *Vibrio*		Etanol 70% (v/v)	Aseton	Kloroform	Heksana
V. vulnificus (ATCC 33147)	MIC	0.156	0.156	0.039	0.313
	MBC	0.313	0.313	0.313	0.625
V. parahaemolyticus (ATCC 17802)	MIC	0.625	0.625	0.313	0.625
	MBC	5.000	5.000	2.500	5.000
V. campbellii (ATCC BAA-1116)	MIC	0.313	0.313	0.156	0.625
	MBC	0.625	0.625	0.625	1.250
V. harveyi (ATCC 35084)	MIC	0.625	0.313	0.625	0.625
	MBC	2.500	1.250	2.500	2.500

ini selaras dengan kajian terdahulu yang melaporkan bahawa ekstrak tumbuhan yang kaya dengan sebatian fenol lazimnya menunjukkan nilai MIC antara 0.125-1.25 mg/mL terhadap *Vibrio* spp. (Elshamy et al. 2025; Taguri, Tanaka & Kouno 2004). Menariknya, *V. parahaemolyticus* menunjukkan tahap toleransi yang paling tinggi, memerlukan ≥2.5 mg/mL untuk mencapai kesan bakterisid, selaras dengan sifatnya sebagai patogen utama dalam industri akuakultur (He et al. 2016; Hu et al. 2016; Yang et al. 2024).

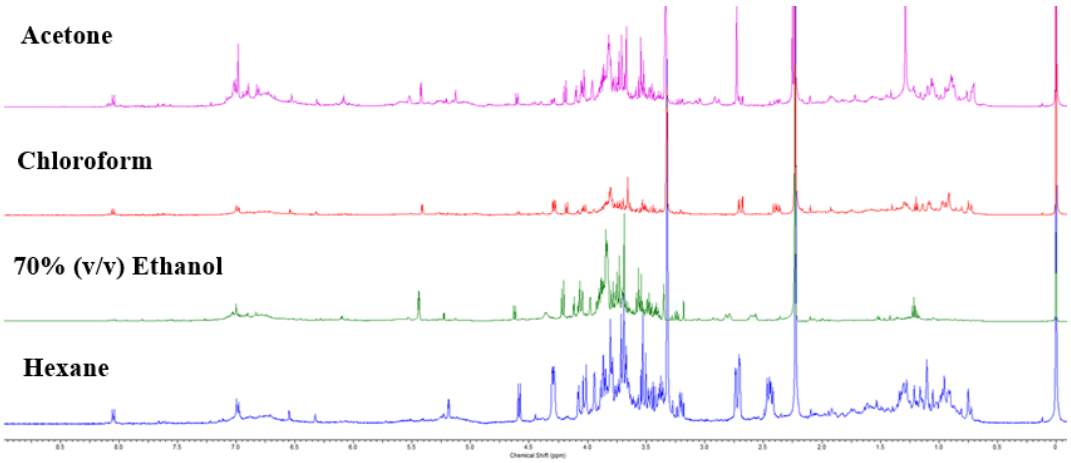
SPEKTRUM ^{1}H NMR EKSTRAK DAUN *D. suffruticosa* DAN PENGECAMAN METABOLIT

Metabolit daripada daun *Dillenia suffruticosa* telah diekstrak menggunakan pelarut dengan tahap kepolaran yang berbeza, iaitu etanol 70% (v/v), aseton, kloroform dan heksana, sebelum dianalisis menggunakan spektroskopi ^{1}H NMR. Seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1, spektrum tindih ^{1}H NMR memperlihatkan variasi komposisi metabolit yang ketara bergantung pada jenis pelarut yang digunakan. Keputusan ini menegaskan bahawa kepolaran pelarut memainkan peranan penting dalam menentukan profil fitokimia ekstrak.

Rajah S1 (tidak disertakan) menunjukkan spektrum terperinci bagi setiap ekstrak daun, yang membolehkan pengecaman asid amino, asid organik, gula, triterpenoid dan sebatian fenol. Hasil pengecaman metabolit tersebut diringkaskan dalam Jadual 3. Selain itu, uji kaji NMR dua dimensi jenis *J*-resolved (Rajah S2 - tidak disertakan) turut digunakan bagi membantu proses pengecaman metabolit. Data spektrum dibandingkan dengan data spektrum perisian Chenomx dan Pangkalan Data Metabolom Manusia bagi memastikan ketepatan pengecaman. Secara keseluruhannya, sebanyak 33 metabolit telah dikenal pasti, mewakili pelbagai kelas sebatian utama dalam ekstrak daun *D. suffruticosa* (Jadual 3).

Dalam kumpulan asid amino dan terbitannya, alanina menunjukkan isyarat pada δ 1.51 (d, J = 10.0 Hz) dan δ 3.78 (q, J = 5.0 Hz), yang lazim bagi proton metil dan metina, manakala triptofan muncul sebagai singlet pada δ 3.55, sejajar dengan struktur ringkasnya. Asid *N*-asetil-*L*-aspartik dikenal pasti pada δ 2.10 (s), manakala π-metilhistidina dikesan pada δ 6.95 (s), mengesahkan kehadiran terbitan asid amino aromatik. Asid organik turut dikenal pasti, termasuk asid laktik (δ 1.33 d, J = 5.0 Hz; δ 2.71 dd, J = 5.0, 5.0 Hz), asid malik (δ 2.91 dd, J = 5.0, 5.0 Hz; δ 4.31 dd, J = 5.0, 5.0 Hz), asid suksinik (δ 2.41 s) dan asid piruvik (δ 2.36 s). Asid organik bersaiz kecil ini sering dilaporkan dalam ekstrak tumbuhan dan menyumbang kepada kesan sinergi antimikrob melalui pengasidan medium serta gangguan terhadap metabolisme bakteria. Gula dikenal pasti melalui isyarat proton anomerik yang khas: sukrosa (δ 4.20 d, J = 5.0 Hz; δ 5.40 d, J = 5.0 Hz) dan glukosa (δ 4.06 dd, J = 4.0, 4.0 Hz; δ 5.21 d, J = 5.0 Hz). Triterpenoid pula menunjukkan isyarat medan atas yang jelas daripada kumpulan metil, termasuk lupeol (δ 0.77 s, δ 3.23 dd, J = 5.0, 5.0 Hz), asid betulinik (δ 0.85 s, δ 4.61 d) dan asid koetjapik (δ 0.99 s, δ 1.10 s, δ 1.16 s, δ 1.72 s).

Sebatian fenol merupakan komponen utama dalam ekstrak *D. suffruticosa*, sejajar dengan aktiviti antibakteria yang kuat. Kuersetin diperhatikan pada δ 7.67 (d, J = 1.5 Hz), manakala kaempferol menunjukkan beberapa isyarat duplet aromatik pada δ 6.32 (d, J = 5.0 Hz), δ 6.90 (d, J = 1.0 Hz) dan δ 8.06 (d, J = 10.0 Hz). Epikatekin dikesan pada δ 7.08 (d, J = 2.5 Hz), manakala viteksin dikenal pasti pada δ 4.70 (d, J = 10.0 Hz). Asid hidroksisinamik seperti asid kafeik (δ 6.30 d, J = 4.0 Hz; δ 6.80 dd, J = 2.5, 2.5 Hz; δ 7.03 dd, J = 5.0, 5.0 Hz) dan asid ferulik (δ 7.00 dd, J = 2.5, 2.5 Hz) turut dikesan. Sebatian fenol lain yang menonjol termasuk asid *p*-hidroksibenzoik (δ 6.82 d, J = 5.0 Hz), katekin (δ 6.01 d, J = 2.5 Hz; δ 6.08 d, J = 1.5 Hz), rutin (δ 6.50 d, J = 2.5 Hz; δ 7.63 dd, J = 2.0, 2.0 Hz) dan asid galik (δ 6.98 s).



RAJAH 1. Spektrum ^{1}H NMR bagi empat jenis ekstrak pelarut berbeza daun *D. suffruticosa*

JADUAL 3. Penentuan isyarat NMR bagi metabolit yang dikenal pasti dalam spektrum ^{1}H dan 2D NMR ekstrak daun *Dillenia suffruticosa* dengan kepelbagaian sepadan (s: singlet; d: doublet; dd: doublet ganda dua; t: triplet; m: multiplet) dan nilai pemalar gandingan skalar (*J* (Hz))

Kelas metabolit	No. Puncak	Metabolit	δ (ppm)	Kepelbagaian	*J* (Hz)
Amino asid & terbitan	1	Alanin	1.51, 3.78	d, q	10.0, 5.0
	2	Acetamida	1.93	s	–
	3	Asid *N*-asetil-*L*-aspartik	2.10	s	–
	4	Betaina	3.26	s	–
	5	Triptofan	3.55	s	–
	6	π-metilhistidina	6.95	s	–
	7	Sarkosina	2.73	s	–
Asid organik	8	Asid laktik	1.33, 2.71	d, dd	5.0, 5.0
	9	Asid 3-hidroksiisovalerik	1.29	s	–
	10	Asid 3-hidroksi-3-metilglutarik	1.37	s	–
	11	Asid 2-hidroksiisobutirik	1.41	s	–
	12	Asid malonik	3.12	s	–
	13	Asid malik	2.91, 4.31	dd, dd	5.0, 5.0, 5.0, 5.0
	14	Asid suksinik	2.41	s	–
	15	Asid piruvik	2.36	s	–
Gula	16	Sukrosa	4.20, 5.40	d, d	5.0, 5.0
	17	Glukosa	4.06, 5.21	dd, d	4.0, 4.0, 5.0
Triterpenoid	18	Lupeol	0.77, 3.23	s, dd	5.0, 5.0
	19	Asid betulinik	0.85, 4.61	s, d	–
	20	Asid koetjapik	0.99, 1.10, 1.16, 1.72	s, s, s, s	–
Asid fenol	21	Kuersetin	7.67	d	1.5
	22	Kaempferol	6.32, 6.90, 8.06	d, d, d	5.0, 1.0, 10.0
	23	Epikatekin	7.08	d	2.5
	24	Vitexin	4.70	d	10.0
	25	Asid kafeik	6.30, 6.80, 7.03	d, dd, dd	4.0, 2.5, 5.0
	26	Asid ferulik	7.00	dd	2.5, 2.5
	27	Asid *p*-hidroksibenzoik	6.82	d	5.0
	28	Katekin	6.01, 6.08	d, d	2.5, 1.5
	29	Rutin	6.50, 7.63	d, dd	2.5, 2.0
	30	Asid galik	6.98	s	–
Lain-lain	31	Kolina	3.18	s	–
	32	Asid kinurenik	6.68, 6.92	s, s	–
	33	Timol	1.22, 2.23	d, s	5.0

Selain itu, metabolit lain seperti kolina (δ 3.18 s), kinurenat (δ 6.68 s, δ 6.92 s), timol (δ 1.22 d, J = 5.0 Hz; δ 2.23 s) dan sarkosina (δ 2.73 s) turut dikenal pasti. Sebatian ini menyumbang kepada kepelbagaian metabolik ekstrak dan mungkin berperanan secara sokongan atau sinergistik dalam aktiviti antimikrob.

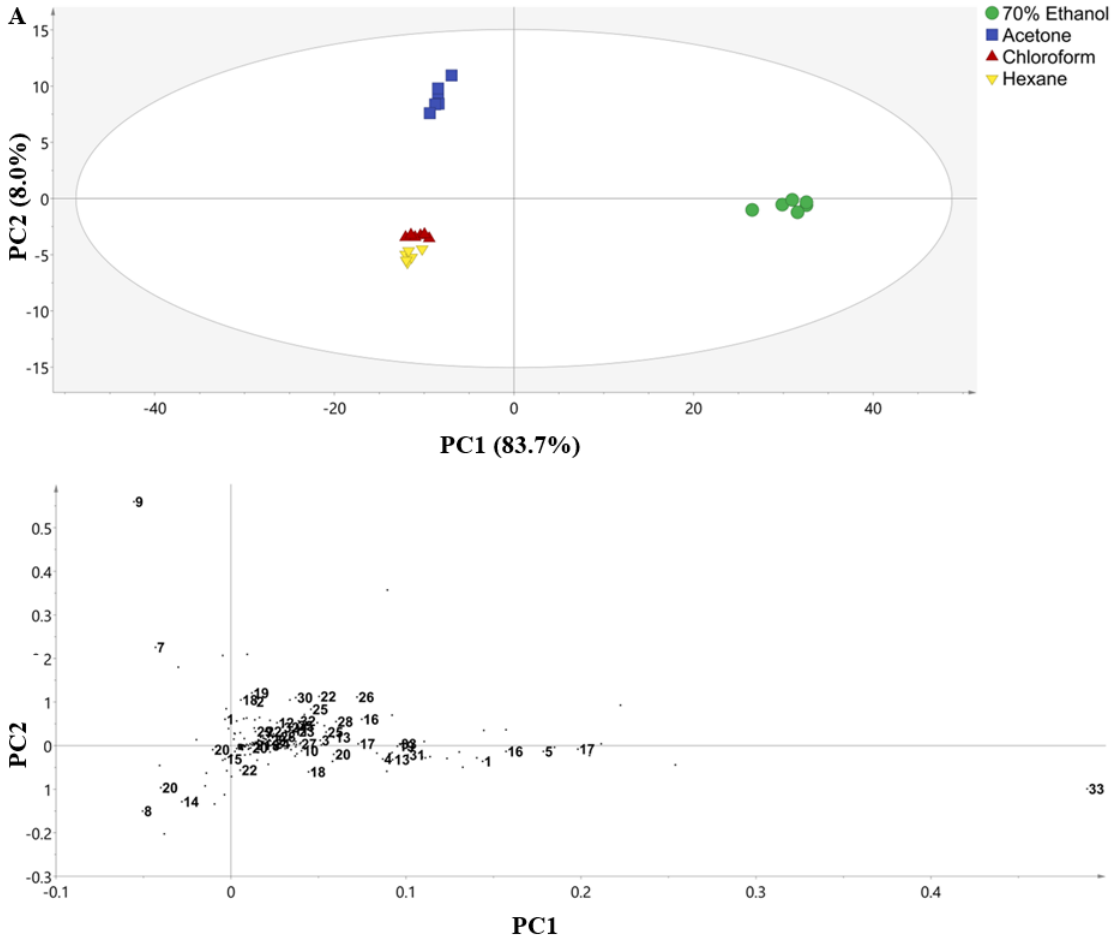
PEMISAHAN EKSTRAK *D. suffruticosa* BERDASARKAN MODEL PCA DARIPADA ANALISIS NMR

Hasil analisis PCA yang ditunjukkan dalam Rajah 2 memberikan gambaran visual yang jelas tentang kesan penggunaan pelarut berbeza—etanol 70% (v/v), aseton, kloroform dan heksana—terhadap cap jari fitokimia

ekstrak *D. suffruticosa*. Berdasarkan Rajah 2(A), dua komponen pertama menerangkan 91.7% daripada jumlah variasi dengan nilai PC1 dan PC2 masing-masing adalah 83.7% dan 8.0%, menunjukkan pemisahan yang ketara antara ekstrak etanol 70% (v/v) (di sebelah kanan plot) daripada kluster aseton (bahagian kiri atas plot), kloroform dan heksana (bahagian kiri bawah plot). Corak ini menunjukkan bahawa etanol 70% (v/v) mengekstrak kumpulan metabolit yang berbeza berbanding pelarut lain.

Plot pemuatan (Rajah 2(B)) memaparkan sebatian yang mempengaruhi corak pemisahan di sepanjang paksi PC1 dan PC2. Sebatian seperti sukrosa (16) dan glukosa (17), serta sebatian fenol yang kaya dengan flavonoid seperti kuersetin (21), kaempferol (22), epikatekin (23), viteksin (24), asid kafeik (25) dan rutin (29), dilihat tertumpu ke arah ekstrak etanol 70% (v/v) (di bahagian kanan plot). Hal ini menunjukkan bahawa pelarut etanol 70% (v/v) mempunyai kecenderungan yang tinggi untuk mengekstrak gula dan sebatian fenol. Sebaliknya, sebatian seperti alanina (1), sarkosina (7), asid laktik (8), asid 3-hidroksiisovalerik (9), asid suksinik (14), asid piruvik (15) dan asid koetjapik (20) didapati lebih berkait rapat dengan ekstrak aseton, kloroform dan heksana (di bahagian kiri plot). Corak taburan ini adalah selaras dengan prinsip asas kepolaran pelarut polar seperti etanol lebih berkesan dalam mengekstrak sebatian hidrofilik (contohnya gula dan fenol), manakala pelarut yang kurang polar lebih cenderung mengekstrak sebatian lipofilik dan asid organik. Pola pengekstrakan yang serupa turut direkodkan dalam kajian tumbuhan lain, sekali gus menegaskan kepentingan pemilihan pelarut dalam analisis fitokimia (Indrianingsih et al. 2024).

Rajah 3 memperkukuh keputusan ini dengan mengaitkan komposisi fitokimia dengan fungsi biologi, khususnya aktiviti anti-*Vibrio*. Biplot PLS menunjukkan

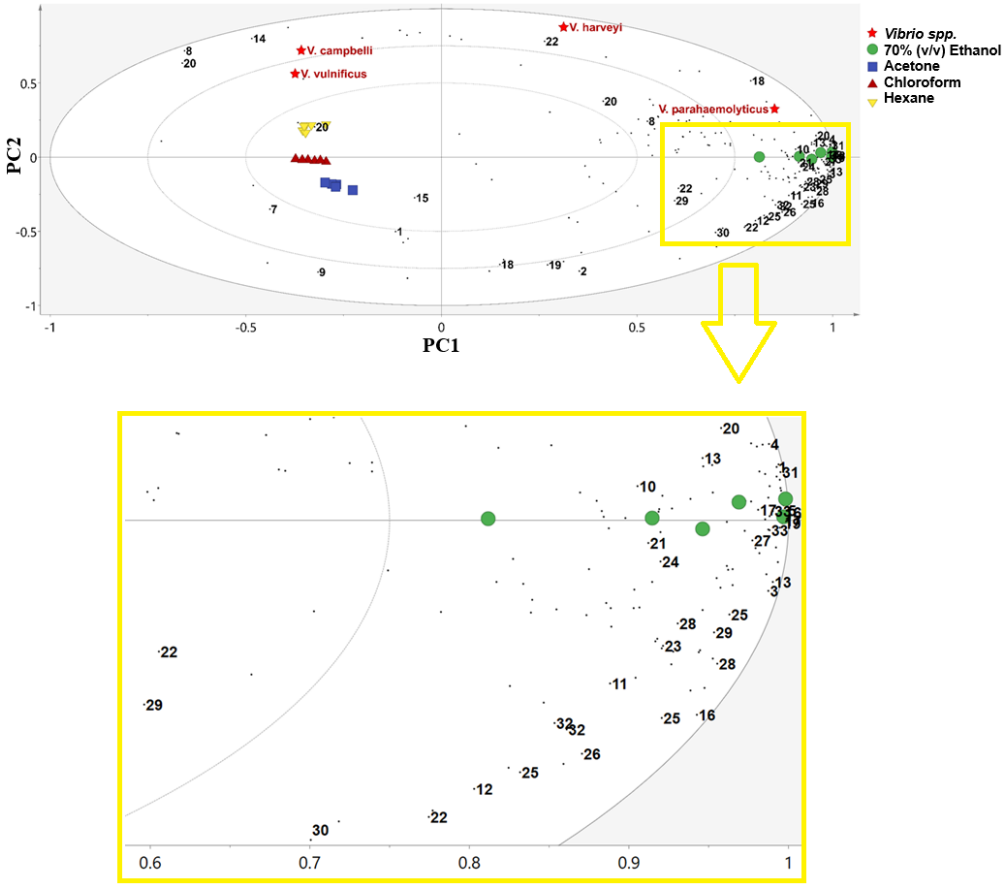


RAJAH 2. Plot skor (A) dan pemuatan (B) PCA bagi pelbagai ekstrak *D. suffruticosa*. Isyarat yang diperhatikan adalah seperti berikut – 1: Alanina, 2: Asetamida, 3: Asid *N*-Asetil-*L*-aspartik, 4: Betaina, 5: Triptofan, 6: π-Metilhistidina, 7: Sarkosina, 8: Asid Laktik, 9: Asid 3-Hidroksiisovalerik, 10: Asid 3-Hidroksi-3-metilglutarik, 11: Asid 2-Hidroksiisobutirik, 12: Asid Malonik, 13: Asid Malik, 14: Asid Suksinik, 15: Asid Piruvik, 16: Sukrosa, 17: Glukosa, 18: Lupeol, 19: Asid Betulinik, 20: Asid Koetjapik, 21: Kuersetin, 22: Kaempferol, 23: Epikatekin, 24: Vitexin, 25: Asid Kafeik, 26: Asid Ferulik, 27: Asid *p*-Hidroksibenzoik, 28: Katekin, 29: Rutin, 30: Asid Galik, 31: Kolina, 32: Asid Kinurenik, 33: Timol

bahawa kluster sebatian khusus yang terdiri daripada sarkosina (7), asid laktik (8), asid suksinik (14), asid piruvik (15), asid koetjapik (20) dan kaempferol (22) dilihat tertumpu berhampiran dengan vektor aktiviti terhadap *V. vulnificus*, *V. campbellii* dan *V. harveyi*. Hubungan rapat ini mencadangkan korelasi positif dengan gabungan metabolit ini berpotensi menyumbang kepada peningkatan aktiviti antibakteria terhadap ketiga-tiga patogen tersebut.

Sebaliknya, sebatian selebihnya (terutamanya kumpulan sebatian fenol yang lain seperti kuersetin (21), epikatekin (23), viteksin (24), asid kafeik (25), rutin (29) dan asid galik (30)) didapati menghala dan tertumpu ke arah paksi vektor aktiviti *V. parahaemolyticus*. Berdasarkan data pemerhatian dalam Jadual 1, taburan ini secara statistiknya memaparkan korelasi negatif memandangkan ekstrak etanol 70% (v/v) yang kaya dengan fenol mencatatkan zon perencatan paling lemah (8.42 mm) terhadap patogen ini. Corak taburan pada biplot ini dengan jelas mendedahkan bahawa keberkesanan perencatan patogen tersebut tidak bergantung kepada kumpulan sebatian fenol hidrofilik, tetapi sebaliknya dipengaruhi kuat oleh korelasi profil metabolit kurang polar yang berbeza.

Kuersetin telah dikenal pasti sebagai sebatian utama yang mempunyai aktiviti antimikrob dan antibiofilem yang ketara. Dalam *V. parahaemolyticus*, kuersetin pada kepekatan perencatan minimum (MIC) 220 µg/mL terbukti menghalang pembentukan biofilem, motiliti berenang dan merayap, serta menurunkan ekspresi gen virulens dan *quorum sensing* seperti *flaA*, *flgL*, *vp0952*, *vp0962*, *luxS*, *aphA*, *VopQ* dan *vp0450*. Kesan ini adalah bergantung kepada dos dan turut diperhatikan pada kepekatan sub-MIC (1/8 hingga 1/2 MIC), dengan pengurangan biofilem pada permukaan makanan sehingga kira-kira 3 log CFU/cm², disokong oleh pemerhatian



RAJAH 3. Biplot PLS yang menerangkan korelasi antara konstituen fitokimia pelbagai ekstrak *D. suffruticosa* dan aktiviti anti-*Vibrio*-nya terhadap spesies *Vibrio* terpilih. Isyarat yang diperhatikan adalah seperti berikut – 1: Alanina, 2: Asetamida, 3: Asid *N*-Asetil-*L*-aspartik, 4: Betaina, 5: Triptofan, 6: π-Metilhistidina, 7: Sarkosina, 8: Asid Laktik, 9: Asid 3-Hidroksiisovalerik, 10: Asid 3-Hidroksi-3-metilglutarik, 11: Asid 2-Hidroksiisobutirik, 12: Asid Malonik, 13: Asid Malik, 14: Asid Suksinik, 15: Asid Piruvik, 16: Sukrosa, 17: Glukosa, 18: Lupeol, 19: Asid Betulinik, 20: Asid Koetjapik, 21: Kuersetin, 22: Kaempferol, 23: Epikatekin, 24: Vitexin, 25: Asid Kafeik, 26: Asid Ferulik, 27: Asid *p*-Hidroksibenzoik, 28: Katekin, 29: Rutin, 30: Asid Galik, 31: Kolina, 32: Asid Kinurenik, 33: Timol

FE-SEM yang menunjukkan gangguan hubungan antara sel dan lisis sel (Roy et al. 2022a). Selain itu, kuersetin mengurangkan motiliti *V. parahaemolyticus* sehingga 89% (berenang) dan 78% (merayap) pada kepekatan sub-MIC (Roy et al. 2022b). Kuersetin juga dilaporkan mengganggu pembentukan biofilem dalam *Aeromonas hydrophila* melalui pengurangan aktiviti hemolisis dan protein virulens (Jayaraman et al. 2024), serta menekan sistem penderiaan kuorum dan virulens dalam *Vibrio cholerae* tanpa kesan bakterisid (Saha, Aggarwal & Singh 2023).

Kaempferol turut menunjukkan aktiviti antibiofilem yang ketara dengan menghalang fasa lekatan awal bakteria *Staphylococcus aureus*, mengurangkan pembentukan biofilem sebanyak 80% pada 64 µg/mL melalui perencatan enzim sortase A dan penurunan ekspresi gen perlekatan (Ming et al. 2017). Walaupun kajian ini dijalankan pada bakteria Gram-positif, mekanisme ini berpotensi relevan terhadap bakteria Gram-negatif seperti *Vibrio*. Asid kafeik, rutin, asid galik dan epikatekin juga memainkan peranan penting dalam aktiviti antibiofilem dengan mengganggu keupayaan bakteria melekat pada permukaan seperti keluli tahan karat dan sarung tangan, kemungkinan melalui perubahan cas permukaan dan sifat hidrofilik (Roy et al. 2022b).

Secara keseluruhannya, gabungan analisis kemometrik PCA dan PLS dengan bukti mekanistik daripada kepustakaan menyokong kesimpulan bahawa ekstrak etanol 70% (v/v) *D. suffruticosa* mengandungi profil bioaktif yang berupaya mensasarkan pelbagai aspek patogenisiti *Vibrio*, khususnya terhadap *V. vulnificus*, *V. campbellii* dan *V. harveyi*. Walaupun kepustakaan membuktikan keberkesanan mekanisme kuersetin terhadap *V. parahaemolyticus* pada kepekatan tertentu (≥220 µg/mL), rintangan tinggi yang diperhatikan dalam kajian ini mencadangkan bahawa kepekatan fenol yang wujud secara semula jadi di dalam ekstrak etanol mentah mungkin belum mencukupi untuk menewaskan toleransi patogen tersebut.

Pendekatan bersepadu ini menyerlahkan kepentingan pemprofilan metabolit berasaskan NMR, khususnya dalam mengenal pasti kuersetin dan kaempferol sebagai agen antibiofilem semula jadi yang berpotensi untuk aplikasi dalam keselamatan makanan dan akuakultur. Potensi sinergistik antara kuersetin dan kaempferol terhadap pelbagai patogen dan mekanisme virulens mengukuhkan kedudukan kedua-dua sebatian ini sebagai prinsip aktif utama di dalam ekstrak etanol 70% (v/v) *D. suffruticosa*. Pada masa yang sama, aktiviti perencatan dan bakterisid tertinggi yang ditunjukkan oleh ekstrak kloroform turut membuktikan bahawa kelas metabolit yang kurang polar memainkan peranan kritikal, terutamanya dalam menewaskan patogen toleransi tinggi seperti *V. parahaemolyticus*. Kesimpulannya, penggabungan analisis kemometrik dengan bukti mekanistik menyediakan asas kukuh untuk pembangunan strategi antibiofilem dan antimikrob baharu yang mampan, yang amat penting dalam menghadapi cabaran peningkatan rintangan antibiotik global.

UJIAN PERMUTASI

Ujian permutasi dijalankan menggunakan 100 permutasi rawak. Nilai R^2Y dan Q^2Y daripada analisis permutasi di penjuru kiri bawah adalah lebih rendah berbanding nilai permulaan yang berkaitan di penjuru kanan atas (Rajah S3(A)-3(D) – tidak disertakan). Ini menunjukkan bahawa model tersebut stabil dan tiada berlakunya *overfitting* (Eriksson et al. 2001).

KESIMPULAN

Kajian ini membuktikan bahawa daun *D. suffruticosa* berpotensi sebagai sumber metabolit anti-*Vibrio*, yang mana ekstrak kloroform dan etanol 70% (v/v) menunjukkan kelebihan bioaktiviti yang tersendiri. Melalui analisis metabolomik ^{1}H NMR, sebanyak 33 metabolit telah dikenal pasti. Analisis data multivariat (PLS) mengesahkan bahawa korelasi perencatan yang positif terhadap *V. vulnificus, V. campbellii* dan *V. harveyi* didorong oleh kluster sebatian khusus seperti kaempferol dan kumpulan asid organik. Sebaliknya, tahap rintangan tinggi *V. parahaemolyticus* ditonjolkan melalui korelasi negatifnya dengan majoriti sebatian fenol di dalam ekstrak polar. Keputusan ini menonjolkan potensi *D. suffruticosa* sebagai alternatif semula jadi dalam pengurusan patogen akuakultur, di samping menegaskan kepentingan kepolaran pelarut dalam mempengaruhi sasaran pengekstrakan sebatian bioaktif.

PENGHARGAAN

Kajian ini telah dibiayai oleh Universiti Putra Malaysia [Nombor Projek: GP-IPM/2022/9731700]. Semua data tambahan tersedia melalui permintaan daripada pengarang surat-menyurat.

RUJUKAN

Abubakar, S., Al-Mansoub, M.A., Murugaiyah, V. & Chan, K.L. 2019. The phytochemical and anti-inflammatory studies of *Dillenia suffruticosa* leaves. *Phytotherapy Research* 33(3): 660-675. https://doi.org/10.1002/ptr.6255

Adamczak, A., Ożarowski, M. & Karpiński, T.M. 2019. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *Journal of Clinical Medicine* 9(1): 109. https://doi.org/10.3390/jcm9010109

Ahmed, M.J., Murtaza, G. & Ahmed, F. 2024. Antimicrobial activity of phenolic and flavonoid enriched extracts of *Dolomiaea macrocephala* (Asteraceae): A medicinal plant from western Kashmir Himalayas. *Pakistan Journal of Botany* 56(6): https://doi.org/10.30848/PJB2024-6(2)

Elshamy, S., Kuhnert, N., El-Shazly, M., Ziemah, J. & Handoussa, H. 2025. Comparative metabolomic study of twelve *Acacia* species by UHPLC-q-TOF-ESI-MS coupled with chemometrics in correlation with antibacterial activity. *Fitoterapia* 181: 106378. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2025.106378

Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N. & Wold, S. 2001. *Multi- and Megavariate Data Analysis: Principles and Applications*. Umetrics Academy, Umeå.

Goh, M.P.Y., Ahmad, N., Yasin, H.M. & Jama, A.M. 2021. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity of the *Dillenia suffruticosa* leaves against the lung (A549) and cervical (CaSki) cancer cell lines. *Natural Product Journal* 12(4): 87-94. https://doi.org/10.2174/2210315510666210203150610

He, Y., Jin, L., Sun, F., Hu, Q. & Chen, L. 2016. Antibiotic and heavy-metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh shrimps in Shanghai fish markets, China. *Environmental Science and Pollution Research* 23(15): 15033-15040. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6614-4

Hu, Q. & Chen, L. 2016. Virulence and antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from crustaceans and shellfish in Shanghai, China. *Journal of Food Protection* 79(8): 1371-1377. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-031

Indrianingsih, A.W., Styaningrum, P., Suratno, Windarsih, A., Suryani, R., Noviana, E. & Itoh, K. 2024. The effect of extraction method on biological activity and phytochemical content of *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) leaves extract concurrent with its principal component analysis. *Process Biochemistry* 143: 135-147. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.04.034

Jayaraman, S., Rajendhran, N., Kannan, M.A. & Ramasamy, T. 2024. Quercetin disrupts biofilm formation and attenuates virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Archives of Microbiology* 206(7): 326. https://doi.org/10.1007/s00203-024-04034-z

Lawrence, R., Tripathi, P. & Jeyakumar, E. 2009. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from *Aloe vera*. *Brazilian Journal of Microbiology* 40(4): 906-915. https://doi.org/10.1590/S1517-838220090004000023

Martina, S.M., Cabalquinto, G.P. & Lumogdang, L. 2024. Taxonomic description and antibacterial activity of *Dillenia* sp. against *Escherichia coli*. *Biotropia* 31(3): 422-431. https://doi.org/10.11598/btb.2024.31.3.2320

Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R.D., Idzik, D. & Wąsik, T.J. 2018. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(10): 2321. https://doi.org/10.3390/ijerph15102321

Ming, D., Wang, D., Cao, F., Xiang, H., Mu, D., Cao, J., Li, B., Zhong, L., Dong, X., Zhong, X., Wang, L. & Wang, T. 2017. Kaempferol inhibits the primary attachment phase of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* 8: 2263. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02263

Nadirah, M., Wee, T. & Najiah, M. 2013. Differential responses of *Vibrio* sp. to young and mature leaf extracts of *Terminalia catappa* L. *International Food Research Journal* 20: 961-966.

Roy, P.K., Park, S.H., Song, M.G. & Park, S.Y. 2022a. Antimicrobial efficacy of quercetin against *Vibrio parahaemolyticus* biofilm on food surfaces and downregulation of virulence genes. *Polymers* 14(18): 3847. https://doi.org/10.3390/polym14183847

Roy, P.K., Song, M.G., Jeon, E.B., Kim, S.H. & Park, S.Y. 2022b. Antibiofilm efficacy of quercetin against *Vibrio parahaemolyticus* biofilm on food-contact surfaces in the food industry. *Microorganisms* 10(10): 1902. https://doi.org/10.3390/microorganisms10101902

Rukayadi, Y., Lee, K., Han, S., Yong, D. & Hwang, J.K. 2009. *In vitro* activities of Panduratin A against clinical *Staphylococcus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(10): 4529-4532. https://doi.org/10.1128/AAC.00624-09

Saha, S., Aggarwal, S. & Singh, D.V. 2023. Attenuation of quorum sensing system and virulence in *Vibrio cholerae* by phytomolecules. *Frontiers in Microbiology* 14: 1133569. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1133569

Shah, M.D., Gnanaraj, C., Khan, M.S. & Iqbal, M. 2015. *Dillenia suffruticosa* L. impedes carbon tetrachloride-induced hepatic damage by modulating oxidative stress and inflammatory markers in rats. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 34(2): 133-152. https://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2015013306

Taguri, T., Tanaka, T. & Kouno, I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27(12): 1965-1969. https://doi.org/10.1248/bpb.27.1965

Tan, Z., Deng, J., Ye, Q. & Zhang, Z. 2022. The antibacterial activity of natural-derived flavonoids. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 22(12): 1009-1019. https://doi.org/10.2174/1568026622666220221110506

Tomotake, H., Koga, T., Yamato, M., Kassu, A. & Ota, F. 2006. Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52(2): 157-160. https://doi.org/10.3177/jnsv.52.157

Yakop, F., Sheikh Abdul Hamid, M.H., Ahmad, N., Abdul Majid, M., Pillai, M.K. & Taha, H. 2020. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts and fractions of *Dillenia suffruticosa* leaves. *Malaysian Applied Biology* 49(1): 121-130. https://doi.org/10.55230/mabjournal.v49i1.1663

Yamanaka, F., Hatano, T., Ito, H., Taniguchi, S., Takahashi, E. & Okamoto, K. 2008. Antibacterial effects of guava tannins and related polyphenols on *Vibrio* and *Aeromonas* species. *Natural Product Communications* 3(5): 711-720. https://doi.org/10.1177/1934578X0800300509

Yang, L., Yu, P., Wang, J., Zhao, T., Zhao, Y., Pan, Y. & Chen, L. 2024. Genomic and transcriptomic analyses reveal multiple strategies for *Vibrio parahaemolyticus* to tolerate sub-lethal concentrations of three antibiotics. *Foods* 13(11): 1674. https://doi.org/10.3390/foods13111674