

KEAKTIFAN BIOLOGI EKSTRAK MENTAH BAHAGIAN AKAR *THOTTEA CORYMBOSA*

SITI ZAITON BT MAT SO'AD¹, NIK IDRIS YUSOFF², JOAN YEOH³ & MOHD SHAHROM YUSOFF³

¹Fakulti Sains Gunaan, UiTM Cawangan Pahang, Kampus Jengka, 26400 Bandar Jengka. ²Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 46300 Bangi.

³Pusat Pengajian Biosains & Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 46300 Bangi.

ABSTRAK

Ekstrak mentah metanol bahagian akar *Thottea corymbosa* menunjukkan ketoksikan terhadap Ujian Cerakinan Kematian Anak Udang (Brine Shrimp Lethality Bioassay) dengan kadar yang bermakna dengan nilai $LC_{50} \sim 200$ ppm. Ujian potensi antagonis terhadap agregasi platlet teraruh (PAF) juga menunjukkan keaktifan perencatan agregasi platlet aruhan yang tinggi dimana ekstrak tersebut memberikan IC_{50} secara anggaran kurang daripada $10 \mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: *Thottea corymbosa*, aktiviti biologi, ujian Cerakinan Kematian Anak Udang, ujian PAF

PENDAHULUAN

Kajian farmaseutikal dilakukan ke atas komponen-komponen kimia famili Aristolochiaceae samada terhadap ekstrak mentah atau komponen-komponen tulen yang telah dipencil dengan proses kromatografi dan spektroskopi. Kajian mendalam terhadap kesan sampingan dan sifat toksik masing-masing perlu dijalankan bagi memastikan tumbuhan herba ini selamat digunakan. Maklumat tentang kedua-dua ini amat penting bagi memastikan keselamatan penggunaannya bagi tempoh jangka panjang.

Sesuatu ekstrak mentah daripada tumbuh-tumbuhan seharusnya diuji keaktifan dari segi biologi sebelum pemisahan dan penulenan komponen-komponen kimia dilakukan dan ditentukan strukturnya (Anderson et al. 1991). Dalam penyelidikan yang telah kami jalankan, penabiran keaktifan biologi asas dijadikan panduan dalam menentukan komponen-komponen bioaktif yang boleh dimanfaatkan dalam pemisahan bidang farmaseutikal. Dua ujian yang telah kami pilih ialah Ujian Cerakinan Kematian Anak Udang (BSLB) dan Ujian Potensi Antagonis terhadap Agregasi Platlet Teraruh (PAF). Kaedah cerakinan kematian anak udang menggunakan organisma udang papai, *Artemia salina* ini diperkenalkan oleh Mayer et al. 1982. Ia bertujuan untuk menentukan keaktifan biologi komponen-komponen kimia dari tumbuh-tumbuhan, sama ada ekstrak mentah, fraksi-fraksi atau sebatian tulen. Nilai ketoksikan LC_{50} (Lethality Concentration pada 50 %) boleh ditentukan dengan program komputer Finney dengan keyakinan 95 %. Sesuatu sampel bersifat toksik sekiranya nilai LC_{50} kecil daripada 200 ppm (Mc Laughlin et al. 1991).

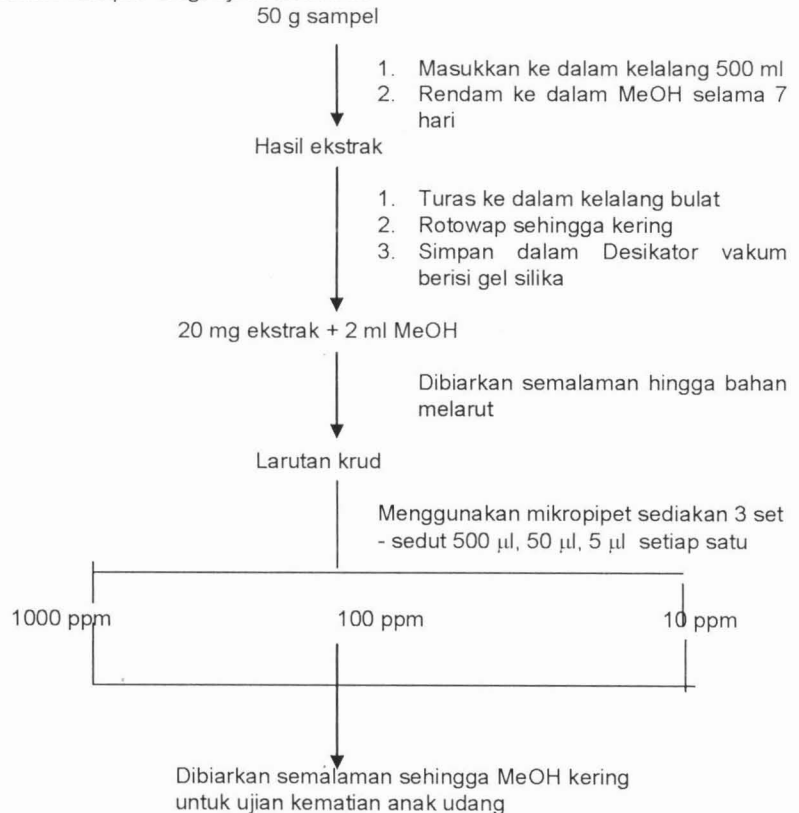
Ekstrak metanol *T. corymbosa* telah disaring untuk ujian potensi antagonis terhadap agregasi platlet teraruh (PAF) dengan kerjasama Dr Mohd Shahrom bin Yusof di bawah projek tahun akhir yang dijalankan oleh Cik Joan Yeoh dari Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, UKM. PAF ialah perantara lipid yang terbentuk dalam

pelbagai jenis sel seperti eosinofil, makrofag, platelet, neutrofil, endotelium vaskular dan ditemui secara semulajadi di dalam tubuh manusia (Vargaftig & Braquet 1987). Fungsi fisiologi bagi PAF ialah pembekuan platelet dan neutrofil, mengakibatkan perubahan pengecutan sistem vaskular, anafilaksi dan hipotensi (Wang & Tai 1992). Kesan fitofisiologi yang dihasilkan ialah lelah akibat pengecutan saluran bronkus (Lee et al. 1997), penolakan terhadap pemindahan organ (Makowka et al. 1990), kelahiran pramatang (Yasuda et al. 1999), pembekuan darah (Kloprogge & Akkerman 1984), kejutan endotoksin (Doebber et al. 1985) dan ulser usus besar (Hsuch et al. 1986). Beberapa tumbuhan dari luar negara telah digunakan untuk menyembuhkan sindrom yang berkaitan dengan PAF seperti *Gingko biloba* untuk asma dan *Piper futokadsurae* bagi menyembuhkan reumatisma dan alergi (Hosford et al. 1988).

BAHAN DAN KAEDAH

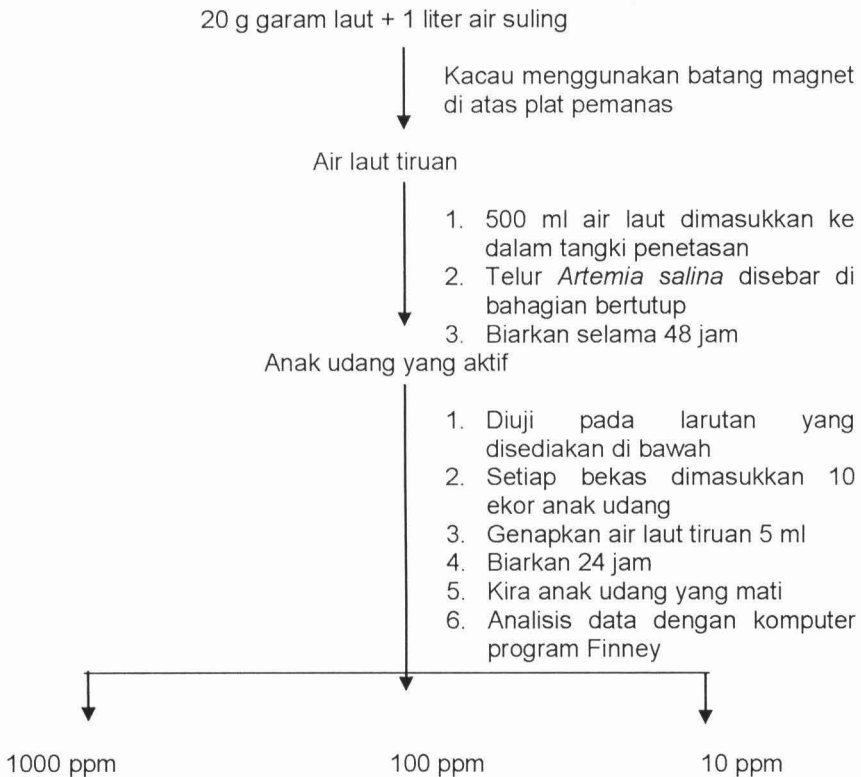
Ujian Cerakinan Kematian Anak Udang (Brine Shrimp Lethality Bioassay, BSLB)

Penetasan anak udang papai *Artemia salina* dilakukan terlebih dahulu. Air laut tiruan disediakan dengan melarutkan 3.8 g garam di dalam 100 ml air suling. Penetasan mengambil masa 48 jam. Sampel ekstrak mentah akar sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 2 ml pelarut yang sesuai, contohnya ekstrak metanol dilarutkan dalam pelarut metanol. Kepekatan setiap larutan ditripletkan iaitu 5 μ l, 50 μ l dan 500 μ l disediakan dalam tiga set setiap satu. Sampel kawalan disediakan dengan mengisikan pelarut metanol ke dalam botol sampel. Pelarut dibiarkan tersejat. Rajah 1. menunjukkan cartalir penyediaan sample bagi ujian tersebut.



RAJAH 1 Cartalir penyediaan ekstrak sampel untuk ujian kematian anak udang

Selepas dua hari, sedikit air laut disikan ke dalam botol sampel. Sebanyak 10 ekor anak udang dimasukkan ke dalam setiap botol sampel dan disisikan air laut pada aras yang sama dalam setiap bekas. Selepas 24 jam bilangan anak udang yang masih hidup dalam setiap sampel dikira seperti dalam Rajah 2.



RAJAH 2 Cartalir Ujian Kematian Anak Udang

Ujian Potensi Antagonis terhadap Agregasi Platlet Teraruh (PAF)

Sumber Platlet

Sumber darah untuk penghasilan platlet adalah daripada enam ekor arnab putih matang dengan berat puratanya diantara dua hingga tiga kilogram. Kesemua arnab ini dibekalkan oleh Rumah Haiwan, UKM Bangi.

Penyediaan Anti-Penggumpal Natrium Sitrat

Sebanyak 1.6 g asid sitrik dan 4.41 g natrium sitrat dilarutkan ke dalam 100 ml air suling dan pHnya diselaraskan dengan menggunakan NaOH 1.0 M atau HCl 1.0 M. Hayat simpanan adalah selama dua minggu pada suhu simpanan 4 °C.

Penyediaan Penimbal Fosfat Bergaram (PBS)

Sebanyak 6.62 g K_2HPO_4 dan 2.90 g NaCl dilarutkan ke dalam 300 ml air suling. Seterusnya, pH larutan diselaraskan kepada pH 7.2 dengan penambahan NaOH 1.0

M atau HCl 1.0 M. Akhirnya, larutan dijadikan 500 ml dengan air suling. PBS disimpan pada suhu bilik dan hayat simpanan adalah selama dua minggu.

Penyediaan Media Eraman

Sebanyak 0.19 g $MgCl_2$ dan 0.24 g Tris-bes dilarutkan ke dalam 100 ml air suling. Kemudian 0.5 g BSA ditambahkan ke dalam larutan. Seterusnya, pH diselaraskan kepada pH 7.0 dan larutan dijadikan 200 ml dengan air suling. Hayat simpanan media eraman ini adalah selama satu minggu dalam suhu simpanan 4 °C.

Penyediaan PAF

Larutan stok PAF disediakan dengan melarutkan satu miligram per botol PAF dengan 1 ml penimbal PBS yang mengandungi 0.25 % BSA untuk memberikan kepekatan akhir 1 mg/ml. Larutan stok PAF ini adalah stabil sekurang-kurangnya enam bulan dalam penimbal ini di bawah suhu – 20 °C. PAF digunakan segar dalam setiap analisis dengan melarutkan stok PAF dalam media eraman untuk memberikan kepekatan 80 ng/ml sebelum analisis dijalankan.

Penyediaan Larutan Dadah Ujian

Ekstrak mentah metanol bagi *T. corymbosa* dan *T. grandiflora* dilarutkan dalam etanol 100 % untuk memberikan larutan stok berpekatan 5 mg/ml. Julat kepekatan larutan stok ditentukan berdasarkan kebolehdapatan sampel. Dari larutan stok 5 mg/ml, larutan ujian 50 µg/ml, 40 µg/ml, 30 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 0.3 µg/ml dan 0.1 µg/ml telah disediakan dengan mencairkannya dalam air suling supaya kepekatan akhir etanol dalam sistem asai tidak melebihi 0.1 %. 100 mg/ml cedrol yang digunakan sebagai dadah rujukan disediakan dengan melarutkannya di dalam etanol 100 %. Dari stok cedrol 100 mg/ml, disediakan cedrol dengan julat kepekatan 20, 40, 60, 80, 100, 120 dan 140 µg/ml .

Penyediaan Plasma Kaya Platlet

Sel platlet yang segar digunakan dalam ujian agregasi, disediakan melalui satu siri pembasuhan mengikut kaedah Teng et al. (1987) dengan sedikit pengubahsuaian. Darah yang di ambil dari vena tengah telinga arnab terus dicampurkan dan disebatikan dengan larutan anti-penggumpal natrium sitrat 3.8 % dalam nisbah isipadu 5: 2. Darah bersitrat kemudiannya diempar dengan menggunakan pengempar meja pada 90 x g selama 15 minit pada suhu bilik. Supernatan yang terhasil merupakan plasma kaya platlet. Supernatan dikeluarkan dengan berhati-hati dan dimasukkan ke dalam tiub pengempar polikarbonat 10 ml yang baru. Ia diempar pada 500 x g selama 10 minit pada suhu bilik untuk mendapatkan pelet platlet.

Pelet ini dipindahkan ke dalam tiub pengempar polikarbonat yang baru dan dicuci dengan 1 ml Tyrode A dan diempar semula pada 500 x g selama 10 minit pada suhu bilik. Akhirnya, pelet platlet diampai dalam larutan Tyrode B mengikut isipadu asal darah yang digunakan. Ampaian sel platlet dicairkan dengan larutan Tyrode B untuk mendapatkan bilangan sel platlet dalam julat $1.1 - 1.3 \times 10^8$ sel/ml. Cara penghitungan sel platlet ditunjukkan dalam jadual . Ampaian sel platlet ini boleh disimpan selama 12 jam pada suhu bilik sebelum pengasaian dijalankan.

Ujian Agregasi Platlet

Ujian agregasi platlet dilakukan ke atas ekstrak mentah matanol *T. corymbosa* untuk mendapatkan kesan ke atas agregasi platlet. Dadah rujukan yang digunakan dalam pengaseian ialah cedrol. Dalam kajian ini, aktiviti agregasi platlet aruhan PAF ditentukan berdasarkan perubahan kandungan oksigen (O.D) ampai platlet pada 620 nm dengan kaedah spektrofotometri. Asei penentuan peratus agregasi platlet pula dijalankan melalui pengoptimum spektrofotometri dan penabiran mikro menggunakan plat mikrotiter 96 telaga. Alat plastik atau alat kaca bersilikon digunakan untuk mengelakkan perlekatan platlet ke dinding bekas.

Dalam pengoptimum spektrofotometri, sebanyak 925 µl dadah ujian pada kepekatan antara 0.1 - 50 µg/ml yang telah dilarutkan dengan etanol dalam analisis tidak melebihi 0.1%. Bagi ujian dadah rujukan cedrol, julat kepekatan yang diuji adalah 20 - 140 µg/ml pada isipadu yang sama. Selepas dieram selama satu minit menggunakan spektrofotometer UV-Lambda.

Komponen bagi kedua-dua asei pengoptimum spektrofotometri dan penabiran mikro adalah sama dan disediakan dalam nisbah isipadu yang sama. Jadual 1.1 menunjukkan komponen campuran ujian agregasi platlet dalam kaedah penabiran mikro. Campuran plasma kaya platlet dan dadah ujian dieram untuk satu minit sebelum perlakuan PAF. PAF ditambahkan sebaik sebelum bacaan pada 620 nm diambil selama tiga puluh minit untuk setiap selangan satu minit menggunakan alat 'Elisa reader'. Peratus perencatan agregasi platlet aruhan PAF dikira mengikut persamaan :

$$\% \text{ Perencatan Agregasi Platlet} = \frac{\text{KN-KP} - (\text{UN-UP})}{\text{KN-KP}} \times 100 \%$$

Dimana, KN = Kawalan Negatif, KP = Kawalan Positif
UN = Ujian Negatif, UP = Ujian Positif

JADUAL 1 Komponen Campuran Analisis Agregasi Platlet

Bahan	Kawalan Negatif	Kawalan Positif	Ujian Negatif	Ujian Positi
Plasma kaya platlet	185 µl	185 µl	185 µl	185 µl
PAF (80 ng/ml)	-	10 µl	-	10 µl
Dadah ujian (ekstrak mentah metanol tumbuhan) 0.1 - 50 µl/ml	-	-	5 µl	5 µl
Media eraman PAF	10 µl	-	10 µl	-
Pelarut etanol (0.1 %)	5 µl	5 µl	-	-
Jumlah	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Nota: Setiap asei dilakukan dalam triplikat dan sampel ekstrak diuji dengan sekurang-kurangnya enam kepekatan berlainan

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Ujian Cerakinan Kematian Anak Udang (Brine Shrimp Lethality Bioassay, BSLB)

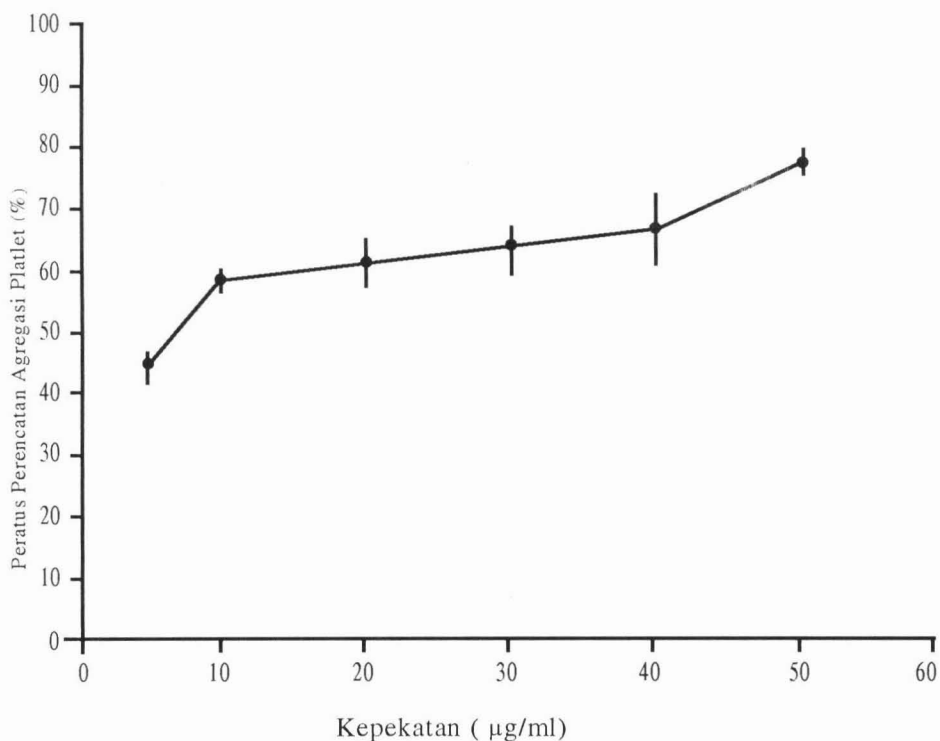
Keaktifan biologi sesuatu sampel dalam ujian ini dinilai berdasarkan nilai LC_{50} yang diperolehi apabila maklumat kematian anak udang dianalisis dengan menggunakan program Komputer Finney. Sesuatu ekstrak mentah dikatakan aktif biologi sekiranya $LC_{50} < 500$ ppm (Anderson et al. 1991).

Keputusan ujian BSLB dalam Jadual 2 menunjukkan nilai LC_{50} dalam julat 30 - 250 ppm. Bagi krud metanol kedua-dua spesies ini memberikan $LC_{50} \sim 200$ ppm iaitu agak toksik pada dos yang tinggi. Ekstrak mentah kloroform bagi *T. corymbosa* (ACB) adalah toksik dengan nilai $LC_{50} \sim 200$ ppm. Fraksi-fraksi yang diperolehi daripada pemisahan ACB secara kromatografi turus kilat kering juga memberikan nilai LC_{50} yang bermakna dimana fraksi ACB3 adalah paling toksik dengan $LC_{50} \sim 45.3$ ppm diikuti oleh ACB1 dengan $LC_{50} \sim 150$ ppm dan ACB2 ~ 180 ppm. Ekstrak mentah petroleum eter bagi *T. grandiflora* juga bersifat sangat toksik dengan $LC_{50} \sim 33$ ppm.

JADUAL 2 Nilai LC_{50} bagi krud dan fraksi-fraksi daripada *T. corymbosa*

Sampel	<i>T. corymbosa</i> LC_{50} (ppm)
Ekstrak mentah metanol	198.8
Ekstrak mentah kloroform	200
Fraksi KTKK	
ACB1	150
ACB2	180
ACB3	45.3

Ujian Potensi Antagonis terhadap Agregasi Platlet Teraruh (PAF)



Nilai menunjukkan min ± S.E.M

RAJAH 3 Graf kesan ekstrak mentah metanol *T. corymbosa* ke atas agregasi platlet

Ekstrak mentah metanol bahagian akar tumbuhan *T. corymbosa* menunjukkan keaktifan perencatan agregasi platlet aruhan PAF yang tinggi. Keputusan peratus perencatan ekstrak *T. corymbosa* ke atas agregasi platlet memberikan nilai IC_{50} secara anggaran kurang daripada 10 µg/ml. Plot graf menunjukkan peratus perencatan turut meningkat dengan dos kepekatan yang digunakan dan mencapai peratus perencatan tertinggi 77.78 % pada kepekatan 50 µg/ml seperti ditunjukkan dalam Rajah 3 bagi Kesan ekstrak mentah metanol *T. corymbosa* ke atas agregasi platlet. Ini menunjukkan kehadiran komponen aktif dalam fraksi metanol ekstrak tumbuhan ini. Ekstrak *T. corymbosa* turut mempamerkan keaktifan perencatan agregasi platlet yang berkadar dengan dos kepekatan yang digunakan dimana keaktifan perencatan meningkat dengan peningkatan kepekatan ekstrak. Keputusan ini adalah berkolerasi dengan penggunaan tumbuhan ini sebagai antidot bisa ular, melegakan bengkak gusi, rawatan selepas bersalin, ubat batuk dan asma.

PENGHARGAAN

Jutaan terima kasih kepada Yayasan Felda diatas pembiayaan geran penyelidikan D/12/2000, Universiti Teknologi Mara kerana biasiswa dan cuti belajar kepada Siti Zaiton bt Mat So'ad, kakitangan-kakitangan Makmal Sebatian Semulajadi dan Makmal Mikrobiologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

RUJUKAN

- Hinou, J., Demetzos, C., Harrata, C. & Roussakis, C. 1990. Cytotoxic acid antimicrobial principles from the roots of *Aristolochia longa*. *International Journal of Crude Drug Research* **28**(2): 149-151.
- Hosford, D., Mencia-Huerta, J. M., Page, C. & Braquet, P. 1988. Natural antagonists of platelet-activating factor. *Phytother. Res.* **2**(1): 1-24.
- Hsueh, W., Gonzalez, F. -C., Arroyave, J. L., Anderson, R. C., Lee, Mark L. & Houliham William J. 1986. Platelet activating factor-induced ischemic bowel necrosis: The effect of PAF antagonists. *Eur. Jour. Pharm.* **123**: 79-83.
- Kloprogge, E., Mommersteeg, M. & Akkerman, J. W. N. 1986. Kinetics of platelet-activating factor 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine-induced fibrinogen binding to human platelets. *J. Biol. Chem.* **261** (24): 11071-11076.
- Lee, C. -C. & Leu, C. Y. 1997. Bronchoconstriction and eosinophil recruitment in guinea pig lungs after platelet activating factor administration. *J. Asthma* **34**(2): 153-160.
- Makowka, L., Chapman, F. A., Cramer, D. V., Shiguang, Q., Hong S. & Starzl, T. E. 1990. Platelet-activating factor and hyperacute rejection. *Transplantation* **50**(3): 359-365.
- Shoshichi, N. 1991. Platelet-activating factor (PAF): An introduction. *Lipids* **26**(12): 965-966.
- Teng, C. M., Chen, W. Y., Ko, W. C. & Ouyang, C. 1987. Antiplatelet effect of butyridenepthalide. *Biochemica et Biophysica Acta* **924**: 357-382.
- Teng, C. M., Chen, I. S., Wu, S. J., Lin, Y. C., Tsai, I. L., Seki, H. & Ko, F. N. 1994. Dimeric 2-Quinolone Alkaloid and Antiplatelet Aggregation Constituents of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry* **36**(1): 237 - 239.
- Wang, C. J. & Tai, H. H. 1992. A sensitive and radioimmunoassay for platelet-activating factor. *Lipids* **27**(3): 206-208.
- Vargaftig, Boris, B. & Braquet, P. G. 1987. PAF-acether today- Relevance for acute experimental anaphylaxis. *Brit. Med. Bull.* **43**(2): 312-33.
- Vishwanath, B. S., Fawzy, A. A. & Franson, R. C. 1988. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. *Inflammation*. **12**(6): 549-561.