

**STUDY ON EFFECTS OF
ANDROGRAPHIS PANICULATA ETHANOL EXTRACT
AND ANDROGRAPHOLIDE, ITS BIOACTIVE
COMPOUND TOWARDS THE ACTIVITY OF PHASE II
METABOLISING ENZYMES, UGT AND GST**

by

NORZAINAH BTE AHMAD

Thesis submitted in fulfillment of the requirements
for the degree of
Master of Sciences

October 2008

**KAJIAN KESAN EKSTRAK ETANOL
ANDROGRAPHIS PANICULATA DAN
ANDROGRAFOLIDA, SUATU SEBATIAN BIOAKTIFNYA,
TERHADAP AKTIVITI ENZIM METABOLISME FASA II
UGT DAN GST**

oleh

NORZAINAH BTE AHMAD

Thesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi Ijazah
Sarjana Sains

Oktober 2008

**KAJIAN KESAN EKSTRAK ETANOL
ANDROGRAPHIS PANICULATA DAN
ANDROGRAFOLIDA, SUATU SEBATIAN
BIOAKTIFNYA, TERHADAP AKTIVITI ENZIM
METABOLISME FASA II UGT DAN GST**

NORZAINAH BTE AHMAD

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2008

PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya mengucapkan ribuan terima kasih kepada pihak Universiti Sains Malaysia yang telah memberi peluang kepada saya melanjutkan pengajian peringkat Sarjana Sains. Terima kasih diucapkan kepada Prof Madya Ishak Mat, Timbalan Pengarah (Penyelidikan) IPPT selaku majikan dan Prof Aishah Latif, Pengarah Pusat Kawalan Doping yang telah memberi galakkan dan peluang kepada saya melanjutkan pengajian ini secara separuh masa. Berbanyak terima kasih kepada Penyelia Utama saya iaitu Dr. Sabariah Ismail dan Penyelia Bersama Dr. Roziahanim Mahmud yang telah memberi tunjuk ajar semasa penulisan thesis ini. Penghargaan juga diberi kepada Prof Sharif Mahsufi Mansor, Prof Madya Abas Hj. Husin ke atas kemudahan penyelidikan dihulurkan untuk pengajian ini. Terima kasih juga kepada rakan-rakan pelajar iaitu Chin dan Mahfuz dan kakitangan iaitu En. Arunachalam, En. Zulkeflee, En Abdul Rahim, En. Zamri, En. Asokan, Pn. Vemala, Pn Jurina dan lain-lain yang telah memberi bantuan selama penyelidikan ini dijalankan. Penghargaan juga dirakamkan kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan, sama ada secara langsung atau tidak langsung dalam menjayakan penyelidikan ini. Akhir sekali penghargaan yang tinggi diberikan kepada kedua ibubapa, dan saudara dikasihi yang telah memberi galakkan dalam pengajian ini.

JADUAL KANDUNGAN

Tajuk	Muka surat
Penghargaan	I
Jadual Kandungan	II
Senarai Jadual	XII
Senarai Rajah	XIV
Senarai Simbol, Singkatan atau Tatanama	XVII
Abstrak	XIX
Abstract	XXI
BAB 1 - PENGENALAN	1
1.1 <i>Andrographis paniculata</i> (AP)	1
1.2 Penggunaan <i>Andrographis paniculata</i>	3
1.3 Kandungan <i>Andrographis paniculata</i>	3
1.3.1 Diterpena	3
1.3.1(a) Andrografolida (AND)	5
1.3.1(b) Neoandrografolida	7
1.3.1(c) Dehidroandrografolida	7
1.3.2 Kandungan lain	8

1.4	Kaedah analisis ekstrak <i>Andrographis paniculata</i>	8
1.5	Dos <i>Andrographis paniculata</i>	9
1.6	Hepartoksisiti	10
1.7	Kerosakan hepar disebabkan tetraklorokarbon (CCl ₄)	11
1.8	Penggunaan <i>Andrographis paniculata</i> (AP) untuk merawat ketoksikan hepar	12
1.9	Metabolisme drug	13
1.10	Faktor mempengaruhi metabolime drug	15
1.11	Kajian kinetik	15
1.12	Uridin difosfat-glukuronosiltransferase (UGT)	17
	1.12.1 Pengenalan	17
	1.12.2 Struktur molekul dan subunit UGT	17
	1.12.3 Kedudukan UGT	18
	1.12.4 Tapak aktif UGT	19
	1.12.5 Substrat UGT	19
	1.12.6 Tindakbalas enzim UGT	21
	1.12.7 Kepentingan aktiviti UGT	22
	1.12.8 Faktor mempengaruhi aktiviti pemangkinan UGT	23
	1.12.8 (a) <i>Lipid dan jantung</i>	23
	1.12.8 (b) <i>Farmakokinetik drug</i>	23
	1.12.8 (c) <i>Ekspresi UGT</i>	24
	1.12.8 (d) <i>Gangguan pada membran</i>	24
	1.12.9 Kesan bahan diterpena tumbuhan mempengaruhi aktiviti enzim UGT	26
	1.12.10 Faktor mempengaruhi kaedah asai	26
	1.12.11 Kaedah penentuan aktiviti enzim UGT	27

1.12.12	Kajian-kajian lain melibatkan UGT	27
1.13	Glutation –S-transferase (GST)	28
1.13.1	Pengenalan	28
1.13.2	Kedudukan	29
1.13.3	Subunit, struktur dan morfologi	29
1.13.4	Tapak aktif GST	31
1.13.5	Substrat	31
1.13.6	Tindakbalas GST	32
1.13.7	Fungsi penyingkiran	33
1.13.8	Faktor mempengaruhi aktiviti GST	33
1.13.9	Enzim anti kanser	34
1.13.10	Ekspresi GST	35
1.13.11	Perencat GST	35
1.13.12	Sifat perencatan	36
1.13.13	Kaedah pengukuran aktiviti enzim GST	36
1.14	Objektif Kajian	37
	BAB 2 - BAHAN DAN PERALATAN	39
2.1	Bahan kimia	39
2.2	Ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> dan <i>Andrografolida</i>	40
2.3	Tikus jantan Sprague Dawley	41
2.4	Peralatan	41
2.5	Penyediaan dos ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> (AP)	42
2.5.1	Penyediaan larutan stok ekstrak etanol AP (100 mg/mL)	42
2.5.2	Penyediaan dos ekstrak etanol AP (7.5 mg/mL)	42
2.5.3	Penyediaan larutan ekstrak etanol AP	42

2.5.3 (a) Kepekatan 6.25 mg/mL	42
2.5.3 (b) Kepekatan 0.625 mg/mL	43
2.5.3 (c) Kepekatan 0.0625 mg/mL	43
2.6 Penyediaan larutan andrografolida (AND)	43
2.6.1 Penyediaan larutan AND kepekatan 6.25 mg/mL	43
2.6.2 Penyediaan larutan AND kepekatan 0.625 mg/mL	43
2.6.3 Penyediaan larutan AND kepekatan 0.0625 µg/mL	44
2.7 Larutan penyediaan mikrosom	44
2.7.1 Larutan penyediaan mikrosom kaedah pemendakan kalsium	44
2.7.1 (a) Larutan sukrosa (0.25M)	44
2.7.1 (b) Larutan kalsium klorida (CaCl ₂) (88 mM)	44
2.7.1 (c) Larutan penimbal fosfat pH 7.4	45
2.7.2 Penyediaan larutan Potassium Klorida (KCl) 1.15 % (pH 7.5)	45
2.8 Larutan penentuan kepekatan protein	45
2.8.1 Larutan Lowry	45
2.8.1 (a) Larutan Kuprum sulfat (CuSO ₄ ·5H ₂ O) 1 %	45
2.8.1 (b) Larutan Natrium Kalium Tartarat 2 %	45
2.8.1 (c) Larutan Dinatrium Karbonat (Na ₂ CO ₃) 10 %	46
2.8.2 Reagen fenol Folin Ciocalteu's (10 kali pencairan)	46
2.8.3 Albumin Serum Bovin (BSA) (1 mg/mL)	46
2.8.4 Natrium hidroksida (0.5 M)	46
2.9 Larutan penentuan aktiviti enzim UDP- Glukuronosil transferase	46
2.9.1 <i>p</i> -Nitrofenol (<i>p</i> -NP) (50 mM)	46
2.9.2 <i>p</i> -NP (5 mM)	47

2.9.3 MgCl ₂ (50 mM)	47
2.9.4 Larutan penimbal tris (0.1 M; pH 7.4)	47
2.9.5 Triton X 0.25 %	47
2.9.6 Mikrosom Kawalan 12.5 mg/mL	47
2.9.7 Mikrosom Ekstrak 12.5 mg/mL	48
2.9.8 Larutan UDPGA (15 mM)	48
2.9.9 Larutan TCA (20 %)	48
2.10 Larutan penentuan aktiviti enzim glutation-S-transferase (GST)	48
2.10.1 Pos mitokondria untuk aktiviti enzim GST	48
2.10.1 (a) <i>Pos mitokondria supernatan Kawalan 2 mg/mL</i>	48
2.10.1(b) <i>Pos mitokondria supernatan dari hepar tikus dirawat dengan ekstrak AP</i>	49
2.10.2 Penyediaan larutan stok glutation (GSH) (50 mM)	49
2.10.3 Penyediaan larutan GSH (3, 12, 21, 30 dan 39 mM)	49
2.10.4 Penyediaan larutan stok 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) (50 mM)	49
2.10.5 Penyediaan larutan CDNB (3, 12, 21, 30 dan 39 mM)	50
2.10.6 Penyediaan larutan penimbal potassium fosfat (100 mM; pH 6.5)	50
BAB 3 - KAEDAH	51
3.1 Ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> (AP)	52
3.1.1 Penyediaan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> (AP)	52
3.1.2 Penyediaan dos ekstrak etanol AP.	53
3.1.2 (a) <i>Pengiraan bagi penyediaan dos ekstrak etanol AP</i>	53

3.1.2 (b) <i>Penyediaan dos ekstrak etanol AP (100 mg/mL)</i>	53
3.1.3 Penjagaan tikus	53
3.1.4 Pemberian dos ekstrak etanol AP pada tikus	54
3.1.5 Penyediaan mikrosom mengguna kaedah kalsium klorida	55
3.1.6 Penentuan kandungan protein mikrosom hepar tikus	56
3.2 Kajian kesan ekstrak etanol AP dan AND terhadap enzim UDP-glukuronosiltransferase (UGT).	57
3.2.1 Penyediaan keluk piawai <i>p</i> -nitrofenol (<i>p</i> -NP)	57
3.2.2 Penentuan parameter optima bagi aktiviti UGT	58
3.2.2 (a) <i>Penentuan masa optima aktiviti UGT</i>	58
3.2.2 (b) <i>Penentuan nisbah optima antara Triton X-100 dan protein bagi aktiviti enzim UGT</i>	58
3.2.2(c) <i>Penentuan kepekatan protein optima bagi aktiviti UGT</i>	59
3.2.3 Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas enzim UGT (<i>in vitro</i>)	60
3.2.3 (a) <i>Kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti enzim UGT (in vitro)</i>	60
3.2.3 (b) <i>Kajian kesan ekstrak AP ke atas kinetik aktiviti enzim UGT (in vitro)</i>	61
3.2.4 Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti UGT (<i>in vivo</i>)	61
3.2.4 (a) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti enzim UGT (in vivo)</i>	61
3.2.4 (b) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas kinetik enzim UGT (in vivo)</i>	62
3.2.5 Kajian kesan larutan andrografolida (AND) ke atas aktiviti enzim UGT (<i>in vitro</i>)	62

3.3 Kajian kesan ekstrak AP dan AND ke atas enzim glutation-S-transferase (GST)	63
3.3.1 Penentuan parameter optima asai GST	63
3.3.1 (a) <i>Penentuan kepekatan protein optima aktiviti GST</i>	63
3.3.1 (b) <i>Penentuan masa optima bagi aktiviti enzim GST</i>	63
3.3.1 (c) <i>Penentuan kepekatan glutation (GSH) optima aktiviti enzim GST</i>	64
3.3.1 (d) <i>Penentuan kepekatan CDNB optima aktiviti enzim GST</i>	64
3.3.2 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap enzim GST (<i>in vitro</i>)	64
3.3.2 (a) <i>Penentuan kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>)</i>	64
3.3.2 (b) <i>Penentuan kesan ekstrak etanol AP terhadap kinetik enzim GST berdasarkan perubahan substrat CDNB (<i>in vitro</i>)</i>	65
3.3.2 (c) <i>Penentuan kesan ekstrak etanol AP terhadap kinetik enzim GST (<i>in vitro</i>) berdasarkan perubahan kepekatan GSH</i>	65
3.3.3 Kajian ekstrak etanol AP ke atas enzim GST (<i>in vivo</i>)	66
3.3.3 (a) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti enzim GST (<i>in vivo</i>)</i>	66
3.3.3 (b) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas kinetik enzim GST berdasarkan perubahan kepekatan CDNB (<i>in vivo</i>)</i>	66
3.3.3 (c) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas kinetik enzim GST berdasarkan perubahan kepekatan GSH (<i>in vivo</i>)</i>	67
3.3.4 Kajian kesan AND ke atas enzim GST (<i>in vitro</i>)	67
3.3.4 (a) <i>Kajian aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>)</i>	67

3.3.4 (b) <i>Kajian kesan AND ke atas kinetik enzim GST berdasarkan perubahan kepekatan substrat CDNB (in vitro)</i>	68
3.3.4 (c) <i>Kajian kesan AND ke atas kinetik enzim GST berdasarkan perubahan kepekatan glutation (in vitro)</i>	68
BAB 4 - KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	69
4.1 Keputusan	69
4.1.1 Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> (AP) terhadap perkembangan fizikal tikus	69
4.1.2 Penyediaan tisu hepar tikus bagi penentuan aktiviti enzim UGT dan GST.	71
4.1.3 Penentuan kepekatan protein pada mikrosom dan pos mitokondria hepar tikus.	71
4.1.4 Pengukuran aktiviti enzim UGT pada mikrosom hepar berdasarkan pengurangan penyerapan <i>p</i> -nitrofenol (<i>p</i> -NP).	72
4.1.4 (a) <i>Penentuan julat kepekatan p-nitrofenol dalam membentuk keluk piawai p-NP.</i>	72
4.1.4 (b) <i>Penentuan parameter optima bagi aktiviti enzim UGT</i>	75
4.1.4 (b) i <i>Penentuan masa optima inkubasi bagi penentuan aktiviti enzim UGT</i>	75
4.1.4 (b) ii <i>Penentuan nisbah optima antara Triton X-100 dan protein bagi aktiviti enzim UGT</i>	75
4.1.4 (b) iii <i>Penentuan kepekatan protein (mikrosom) optima bagi aktiviti enzim UGT</i>	77
4.1.5 Kajian kesan ekstrak AP terhadap aktiviti enzim UGT (<i>in vitro</i>)	77
4.1.5 (a) <i>Penentuan kesan ekstrak AP terhadap aktiviti enzim UGT (in vitro)</i>	77
4.1.5 (b) <i>Penentuan kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim UGT dengan perubahan kepekatan substrat p-NP (in vitro)</i>	79

4.1.6 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim UGT (<i>in vivo</i>)	81
4.1.6. (a) Kajian kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti enzim UGT (<i>in vivo</i>)	81
4.1.6. (b) Kajian kesan perubahan kepekatan p-NP ke atas aktiviti enzim UGT pada mikrosom dirawat dengan ekstrak etanol AP (<i>in vivo</i>)	82
4.1.7 Kajian kesan andrografolida (AND) terhadap aktiviti enzim UGT (<i>in vitro</i>)	84
4.1.8 Pengukuran aktiviti enzim glutation-S-transferase (GST) pada pos-mitokondria hepar tikus jantan SD	85
4.1.8 (a) Penentuan parameter optima bagi asai ezim GST	86
4.1.8 (a) i Penentuan kepekatan protein optima bagi aktiviti enzim GST.	86
4.1.8 (a) ii Penentuan masa optima bagi aktiviti enzim GST	90
4.1.8 (a) iii Penetuan kepekatan substrat CDNB optima bagi aktiviti enzim GST.	90
4.1.8 (a) iv Penentuan kepekatan glutation (GSH) optima bagi aktiviti enzim GST.	92
4.1.9 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>)	94
4.1.9 (a) Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>)	94
4.1.9 (b) Kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST dengan perubahan kepekatan substrat CDNB (<i>in vitro</i>)	96
4.1.9 (c) Kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST dengan perubahan glutation (GSH) (<i>in vitro</i>)	99
4.1.10 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vivo</i>)	103

4.1.10 (a) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP (AP) terhadap aktiviti enzim GST dari pos mitokondria tikus jantan SD dirawat ekstrak etanol AP selama 15 hari (in vivo)</i>	103
4.1.10 (b) <i>Kajian kesan perubahan substrat CDNB terhadap enzim GST dari pos mitokondria tikus jantan SD dirawat ekstrak etanol AP selama 15 hari (in vivo)</i>	103
4.1.10 (c) <i>Kajian kesan perubahan kepekatan GSH terhadap enzim GST dari pos mitokondria tikus jantan SD dirawat ekstrak etanol AP selama 15 hari (in vivo).</i>	105
4.1.11 <i>Kesan andrografolida (AND) terhadap aktiviti enzim GST (in vitro).</i>	108
4.1.11 (a) <i>Kesan andrografolida (AND) terhadap aktiviti enzim GST (in vitro).</i>	108
4.1.11 (b) <i>Kajian kesan perubahan kepekatan substrat CDNB terhadap aktiviti enzim GST yang dirawat dengan AND.</i>	109
4.1.11 (c) <i>Kajian kesan perubahan kepekatan substrat Glutation (GSH) terhadap aktiviti enzim GST yang dirawat dengan AND</i>	111
4.2 Perbincangan	113
4.2.1 <i>Kesan ekstrak etanol AP terhadap perkembangan fizikal tikus.</i>	113
4.2.2 <i>Penyediaan tisu hepar tikus bagi penentuan aktiviti enzim UGT dan GST.</i>	114
4.2.3 <i>Penentuan kepekatan protein pada mikrosom dan pos mitokondria hepar tikus.</i>	115
4.2.4 <i>Pengukuran aktiviti enzim UGT pada mikrosom hepar berdasarkan perbentukan p-nitrofenol glukuronida.</i>	117
4.2.4 (a) <i>Penentuan julat kepekatan p-nitrofenol (p-NP) yang sesuai digunakan bagi membentuk keluk piawai p-nitrofenol.</i>	117
4.2.4 (b) <i>Penentuan parameter optima bagi aktiviti UGT</i>	118
4.2.5 <i>Kajian kesan etanol AP terhadap aktiviti enzim UGT (in vitro)</i>	123

4.2.6 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim UGT (<i>in vivo</i>).	124
4.2.7 Kajian kesan AND terhadap aktiviti enzim UGT (<i>in vitro</i>)	126
4.2.8 Pengukuran aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD	127
4.2.8 (a) <i>Penentuan parameter optimum bagi asai aktiviti enzim GST</i>	127
4.2.9 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>)	130
4.2.9 (a) <i>Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (in vitro).</i>	130
4.2.9 (b) <i>Kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST dengan perubahan kepekatan substrat CDNB (in vitro)</i>	131
4.2.10 Kajian kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vivo</i>)	135
4.2.11 Kesan AND terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>)	138
BAB 5 - KESIMPULAN	141
Cadangan Penyelidikan Akan Datang	145
Senarai Rujukan	146
Senarai Penerbitan	155

SENARAI JADUAL

No Jadual	Tajuk Jadual	Muka surat
Jadual 4.1	Perubahan fizikal tikus jantan SD diberi ekstrak etanol AP kepekatan 75 mg/kg/hari secara <i>ad libitum</i> selama 15 hari dibanding tikus kawalan.	70
Jadual 4.2	Kepekatan protein pada mikrosom dan pos mitokondria hepar tikus SD yang dirawat dengan ekstrak etanol AP dibanding kawalan.	70
Jadual 4.3	Perbandingan V_{mak} dan K_m pada enzim UGT yang ditindak dengan ekstrak etanol AP pada kepekatan 5, 50 dan 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein dibanding dengan kawalan.	80
Jadual 4.4	Nilai V_{mak} dan K_m bagi enzim UGT pada mikrosom hepar tikus SD dirawat dengan ekstrak etanol AP berbanding dengan tikus kawalan.	83
Jadual 4.5	Jadual menunjukkan kesan perubahan kepekatan protein ke atas aktiviti enzim GST.	88
Jadual 4.6	Jadual menunjukkan kesan perubahan kepekatan substrat CDNB terhadap aktiviti enzim GST	92
Jadual 4.7	Kesan perubahan kepekatan GSH ke atas aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD normal.	94
Jadual 4.8	Perbandingan nilai V_{mak} dan K_m pada perubahan substrat CDNB bagi aktiviti enzim GST dari pos mitokondria tikus dirawat dengan ekstrak etanol AP dan kawalan (Kajian <i>in vitro</i>).	99
Jadual 4.9	Perbandingan nilai V_{mak} dan K_m pada perubahan substrat GSH bagi aktiviti enzim GST dari pos mitokondria tikus dirawat dengan ekstrak etanol AP dan kawalan (Kajian <i>in vitro</i>).	102
Jadual 4.10	Perbandingan nilai V_{mak} dan K_m pada perubahan substrat CDNB bagi aktiviti enzim GST dari pos mitokondria tikus dirawat dengan ekstrak etanol AP selama 15 hari dibanding dengan dari tikus kawalan. (Kajian <i>in vivo</i>)	104

Jadual 4.11	Perbandingan nilai V_{mak} dan K_m pada perubahan substrat GSH bagi aktiviti enzim GST dari pos mitokondria tikus dirawat dengan ekstrak etanol AP selama 15 hari dan tikus kawalan. (Kajian <i>in vivo</i>).	107
Jadual 4.12	Perbandingan nilai V_{mak} dan K_m pada aktiviti enzim GST ditindak dengan AND	110
Jadual 4.13	Nilai V_{mak} dan K_m bagi enzim GST dari pos mitokondria hepar tikus jantan SD dirawat dengan AND.	112

SENARAI RAJAH

No Rajah	Tajuk Rajah	Muka surat
Rajah 1.1	Pokok <i>Andrographis paniculata</i> yang juga dikenali sebagai hempedu bumi atau akar cerita.	2
Rajah 1.2	Rajah menunjukkan struktur andrografolida (AND) merupakan bahan bioaktif penting yang terdapat pada AP.	6
Rajah 1.3	Struktur enzim glutation S-transferase	30
Rajah 1.4	Tindak balas bagi 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) dan glutation melibatkan enzim glutation S-transferase.	37
Rajah 4.1	Keluk piawai untuk penentuan kepekatan protein pada mikrosom dan pos mitokondria daripada hepar tikus SD berdasarkan kaedah Lowry (1951).	73
Rajah 4.2	Keluk penyerapan berbanding kepekatan <i>p</i> -NP (0.1 – 3.5 mM) untuk menentukan julat kepekatan sesuai bagi membentuk keluk piawai <i>p</i> -NP.	73
Rajah 4.3	Keluk piawai <i>p</i> -NP bagi penentuan aktiviti enzim UGT ke atas substrat <i>p</i> -NP	74
Rajah 4.4	Penentuan masa optima aktiviti enzim UGT pada mikrosom hepar tikus jantan SD normal.	74
Rajah 4.5	Kesan perubahan peratusan Triton X-100 ke atas pembentukan <i>p</i> -NP glukuronida pada mikrosom tikus jantan normal SD.	76
Rajah 4.6	Penentuan kepekatan protein optima bagi aktiviti enzim UGT pada hepar tikus jantan normal SD	76
Rajah 4.7	Perbandingan kesan ekstrak etanol AP kepekatan 5 dan 50 µg/mg protein dengan kawalan terhadap aktiviti enzim UGT dari mikrosom hepar tikus SD terhadap substrat <i>p</i> -NP (<i>in vitro</i>).	78

Rajah 4.8	Perbandingan kesan ekstrak etanol AP kepekatan 50 dan 500 µg/mg protein dengan kawalan terhadap aktiviti enzim UGT dari mikrosom hepar tikus SD terhadap substrat <i>p</i> -NP (<i>in vitro</i>).	78
Rajah 4.9	Kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti enzim UGT pada mikrosom hepar tikus jantan SD pada perubahan kepekatan substrat <i>p</i> -NP.	80
Rajah 4.10	Kesan ekstrak etanol AP ke atas aktiviti enzim UGT terhadap substrat <i>p</i> -NP.	81
Rajah 4.11	Keluk menunjukkan aktiviti enzim UGT pada mikrosom hepar tikus jantan SD terhadap substrat <i>p</i> -NP pada kepekatan berbeza.	83
Rajah 4.12	Kesan AND ke atas aktiviti enzim UGT pada mikrosom dari hepar tikus jantan SD.	85
Rajah 4.13	Keluk menunjukkan kesan perubahan kepekatan protein terhadap aktiviti GST berdasarkan data penyerapan berbanding masa selama lima minit tindak balas.	87
Rajah 4.14	Keluk penyerapan produk CDNB glutation berbanding kepekatan protein pada minit ke lima tindak balas bagi aktiviti enzim GST pada hepar tikus jantan SD normal.	89
Rajah 4.15	Keluk penyerapan produk CDNB glutation berbanding masa bagi pengukuran aktiviti enzim GST dari pos mitokondria supernatan hepar tikus jantan SD normal.	89
Rajah 4.16	Keluk penyerapan produk CDNB glutation pada 340 nm berbanding masa pada kepekatan substrat CDNB berbeza oleh enzim GST dari pos mitokondria hepar tikus jantan SD normal.	91
Rajah 4.17	Keluk aktiviti enzim GST berbanding kepekatan substrat CDNB pada masa minit ke lima tindak balas. Enzim GST daripada pos mitokondria hepar tikus jantan SD normal.	91
Rajah 4.18	Keluk penyerapan produk pada jarak gelombang 340 nm berbanding masa pada kepekatan GSH berbeza oleh enzim GST daripada pos mitokondria hepar tikus jantan SD normal.	93
Rajah 4.19	Keluk aktiviti enzim GST berbanding kepekatan GSH	93

	pada minit ke 5. Enzim GST dari pos mitokondria hepar tikus jantan SD normal.	
Rajah 4.20	Kesan ekstrak etanol AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>).	95
Rajah 4.21	Perbandingan peratusan perencatan antara dos ekstrak AP terhadap aktiviti enzim GST (<i>in vitro</i>).	95
Rajah 4.22	Kesan perubahan kepekatan substrat CDNB pada aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus SD yang ditindak dengan ekstrak etanol AP pada kepekatan berbeza.	97
Rajah 4.23	Kesan perbezaan kepekatan substrat CDNB pada aktiviti enzim GST daripada pos mitokondria hepar tikus jantan SD yang ditindak dengan ekstrak etanol AP pada kepekatan berbeza.	97
Rajah 4.24	Kesan perubahan kepekatan GSH keatas aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD yang ditindak dengan ekstrak etanol AP (<i>in vitro</i>).	100
Rajah 4.25	Aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD dirawat dengan ekstrak etanol AP kepekatan 75 mg/mg/hari selama 15 hari.	102
Rajah 4.26	Kesan perubahan substrat CDNB terhadap aktiviti enzim GST dari pos mitokondria hepar tikus jantan SD yang dirawat ekstrak etanol AP selama 15 hari dibanding dengan dari tikus kawalan.	104
Rajah 4.27	Kesan perubahan kepekatan GSH terhadap aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD dirawat dengan ekstrak etanol AP selama 15 hari dibanding dengan dari tikus kawalan.	107
Rajah 4.28	Kesan AND terhadap aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD (<i>in vitro</i>).	108
Rajah 4.29	Kesan perubahan kepekatan substrat CDNB terhadap aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD yang dirawat dengan AND dibandingkan dengan kawalan (<i>in vitro</i>).	110
Rajah 4.30	Kesan perubahan kepekatan GSH terhadap aktiviti enzim GST pada pos mitokondria hepar tikus jantan SD yang dirawat AND dibanding dengan kawalan.	112

SENARAI SIMBOL, SINGKATAN ATAU TATANAMA

AP	<i>Andrographis paniculata</i>
AND	Andrografolida
ATP	Adenosina Trifosfat
AU	Unit penyerapan
CaCl ₂	Kalsium diklorida
CDNB	2,4-Dinitroklorobenzena
Da	Dalton
DCNB	2,4-Dinitrokloro-4 nitrobenzena
E	Enzim
EA	Asid etakrainik
ES	Komplek enzim substrat
EPNP	1,2-Epoksi-3,4(4-nitrofenoksi) propane
GSH	Glutation
GST	Glutation S transferase
K_m	Kuantiti substrat pada tahap separuh aktiviti maksima (V_{mak}) enzim
Kg	Kilogram
MgCl ₂	Magnesium diklorida
min	Minit

mg	Miligram
Mg	Magnesium
mL	Mililiter
MM	'Machaelis Manten'
nmol	nmol
pI	pH pada tahap Iso-electrik iaitu protein tanpa cas
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -Nitrofenol
rpm	Pusingan per minit
S	Substrat
SD	Sprague-Dawley
sm	Sentimeter
TCA	Trikarbosilik asid
Tris-HCL	Tris-hidroklorik asid
µg	Mikrogram
UDP	Uridina difosfat
UDPGA	Uridina difosfat glutamik asid
UGT	Enzim UDP-glukuronosiltransferase
<i>V</i>	Halaju tindak balas
V_{mak}	Halaju tindak balas maksima

**KAJIAN KESAN EKSTRAK ETANOL *ANDROGRAPHIS PANICULATA*
DAN ANDROGRAFOLIDA, SUATU SEBATIAN BIOAKTIFNYA,
TERHADAP AKTIVITI ENZIM METABOLISME
FASA II, UGT DAN GST.**

ABSTRAK

Andrographis paniculata (Hempedu bumi) ialah tumbuhan herba daripada famili *Acanthaceae* yang penting dari segi perubatan tradisonal bagi penyakit demam malaria, inflamasi pernafasan, asma, bronkitis, disentri dan lain-lain lagi. Kajian secara *in vitro* dijalankan untuk menentukan kesan ekstrak etanol *Andrographis paniculata* (AP) (5, 50 dan 500 µg/mg) terhadap enzim UDP-glukuronosiltransferase (UGT) daripada mikrosom dan glutathione-S-transferase (GST) daripada pos mitokondria hepar tikus jantan Sprague Dawley (SD). Kesan Andrografolida (AND) (kepekatan 5 dan 50 µg/mg) iaitu bahan bioaktif penting AP terhadap enzim UGT dan GST secara *in vitro* juga dilakukan. Manakala kajian secara *in vivo* melibatkan tikus jantan normal SD (142 ± 21 g) diberikan dos ekstrak etanol AP 75 mg/kg/hari selama 15 hari berturut-turut dibandingkan dengan kawalan. Kaedah spektrometri digunakan bagi menentukan aktiviti enzim UGT dengan menggunakan substrat *p*-nitrofenol manakala enzim GST menggunakan substrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB). Keputusan dibandingkan dengan kawalan menggunakan ujian *t* iaitu $p < 0.05$ menunjukkan perbezaan bermakna. Kajian secara *in vitro* menunjukkan aktiviti enzim UGT pada kepekatan AP 5 µg/mg lebih tinggi secara bermakna tetapi tiada kesan pada aktiviti enzim GST. AP pada 50 µg/mg telah menunjukkan tiada perubahan pada aktiviti enzim UGT

dan GST. Seterusnya AP pada kepekatan 500 µg/mg, menunjukkan aktiviti enzim UGT dan GST lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kawalan. Kajian *in vitro* AND pada kepekatan 5 dan 50 µg/mg, tidak menunjukkan perubahan aktiviti UGT dan GST yang bermakna dibandingkan dengan kawalan. Kajian secara *in vivo* menunjukkan dos ekstrak etanol AP 75 mg/kg/hari, yang diberi selama 15 hari merendahkan aktiviti enzim UGT dan GST secara bermakna ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kawalan. Kesimpulan daripada kajian *in vitro* menunjukkan perbezaan dos AP memberi kesan berbeza pada aktiviti enzim UGT dan GST. Kajian *in vivo* menunjukkan pemberian ekstrak AP selama 15 hari merendahkan aktiviti enzim UGT dan GST secara bermakna. AND pada kepekatan 5 dan 50 µg/mg pula tidak memberikan kesan terhadap aktiviti enzim UGT dan GST (*in vitro*).

STUDY ON EFFECTS OF *ANDROGRAPHIS PANICULATA* ETHANOL EXTRACT AND ANDROGRAPHOLIDE, ITS BIOACTIVE COMPOUND TOWARDS THE ACTIVITY OF PHASE II METABOLISING ENZYMES, UGT AND GST.

ABSTRACT

Andrographis paniculata (Hempedu bumi), from *Acanthaceae* family is a traditional medicinal plant for diseases of malaria, inflammatory respiratory, asthma, bronchitis, dysentery and many others. The effects of ethanolic extracts of *Andrographis paniculata* (AP) (5, 50 and 500 µg/mg) on UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzymes from microsome and glutathione-S-transferase (GST) enzymes from post mitochondria of liver of male Sprague Dawley (SD) rats were examined under *in vitro* conditions. The effects of Andrographolide (AND) (concentrations of 5 and 50 µg/mg), an important bioactive compound of AP on UGT and GST enzymes were also studied *in vitro*. *In vivo* studies involved the effect of AP extracts on normal male SD rats (142 ± 21 g) which received AP ethanol extracts (75 mg/kg/day) for 15 consecutive days and compared with control. UGT and GST enzyme activities were studied with substrates *p*-nitrophenol and 1-chloro-2, 4 dinitrobenzene (CDNB) respectively, using spectrometric method. Results were compared with control by using *t* test with P<0.05 as significant value. *In vitro* studies showed that AP at concentration 5 µg/mg significantly increased the UGT enzyme activities but there was no effect on GST. AP at 50 µg/mg showed no

effect on UGT and GST activities, however AP at 500 µg/mg significantly decreased the UGT and GST activities. *In vitro* study on AND concentrations at 5 and 50 µg/mg showed no changes on UGT and GST activities compared to controls. *In vivo* study showed that the activity of UGT and GST enzymes from rats treated with extract of AP 75 mg/kg/day for 15 days decreased significantly ($P < 0.05$) than controls. In conclusion, *in vitro* studies showed that the extracts of AP at various doses had different effects on the activities of UGT and GST enzymes. *In vivo* studies showed that AP given for 15 days decreased significantly the enzyme activities of UGT and GST. AND at concentrations of 5 and 50 µg/mg had no effects on UGT and GST activities (*in vitro*).

BAB 1

PENGENALAN

Pengenalan Am

1.1 *Andrographis paniculata* (AP)

Penggunaan tumbuhan herba dalam perubatan tradisional adalah tinggi di Malaysia terutamanya dalam kalangan masyarakat Melayu. Keberkesanan herba untuk menyembuhkan penyakit perlu dibuktikan dari segi saintifik. Antara tumbuhan herba yang popular dalam perubatan tradisional ialah *Andrographis paniculata* (AP) daripada famili Acanthaceae. Dalam kalangan masyarakat Melayu tumbuhan ini dikenali sebagai hempedu bumi atau akar cerita (Rajah 1.1).

Kebanyakan tumbuhan ini tumbuh di negara tropika. Dari segi morfologi tumbuhan ini biasanya mempunyai ketinggian 46 - 61 sm, daun berwarna hijau gelap, kedudukan daun pada susunan 'racemes' dan mempunyai buah panjang berkapsul (Ismail *et al.*, 1999).



Rajah 1.1 Pokok *Andrographis paniculata* yang juga dikenali sebagai hempedu bumi atau akar cerita

1.2 Penggunaan *Andrographis paniculata*

Keuntungan AP dalam perubatan tradisional adalah untuk merawat penyakit demam malaria, inflamasi pernafasan, asma, bronkitis, disenteri, dispepsia, hepatitis, toksisiti hepar, filariasis dan menggalakkan hipoglisemia. Ekstrak akuos AP pada kuantiti 50 mg/kg berat badan berkesan menurunkan aras glukosa darah tikus hiperglisemia sebanyak 52.90 %. Kesan adalah lebih tinggi apabila bahan telah melalui proses sejuk kering yang digunakan semasa proses pengekstrakan; sebanyak 6.25 mg/kg berat badan telah memberikan keputusan penurunan sebanyak 61.81 % aras glukosa (Husen *et al.*, 2004).

AP juga berkesan terhadap penyakit malaria dalam kajian (*in vivo*) yang menunjukkan xanton (dos 30 mg/kg) daripada akar AP menghasilkan penurunan tahap parasitaemia (62 %) jangkitan *Plasmodium berghi* pada mencit Swiss Albino (Dua *et al.*, 2004).

1.3 Kandungan *Andrographis paniculata*

1.3.1 *Diterpena*

Kajian menunjukkan diterpena ialah bahan penting tumbuhan yang mempunyai unsur perubatan. Diterpena terdiri daripada kumpulan

isoprena bertakat didih tinggi yang dikenali sebagai resin, suatu bahan yang tinggal selepas proses penyulingan.

Bahan diterpena yang terdapat pada AP ialah andrografolida, andrografisida dan neo-andrografolida. Peratusan setiap kumpulan masing-masing berbeza iaitu 0.61, 0.68 dan 0.70 % (Calabrese *et al.*, 2000). Pada daun, kandungan andrografolida ialah 1.0 %, deoksiandrografolida ialah 0.61 % dan neo-andrografolida hanya 0.26 %. Aras diterpenoid pada bahagian batang tumbuhan ialah 2 kali lebih tinggi daripada akar.

Kandungan diterpena lain ialah deoksi-didehidroandrografolida, deoksi-ozoandrografolida, deoksiandrografolida, dideoksiandrografolida, andrografisida, deoksi-methoksiandrografolida, dideoksiandrografolida, deoksiandrografisida dan saponin (Cheung *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2000).

Daripada pelbagai sumber herba, diterpena didapati mempengaruhi pelbagai aktiviti farmakologi iaitu sebagai agen tindak balas penurunan bagi heksabarbital atau fenobarbital semasa tidur, menghalang enzim bagi metabolisme drug, bertindak sebagai antiperoksida pada hati, selain memberikan kesan koleretik dan antikoleretik pada haiwan (Kapil *et al.*, 1993).

Banyak kajian telah dilakukan menunjukkan bahan diterpena daripada tumbuhan mempunyai aktiviti antileukemia, antimitotik, antimutagenik dan antikarsinogenik.

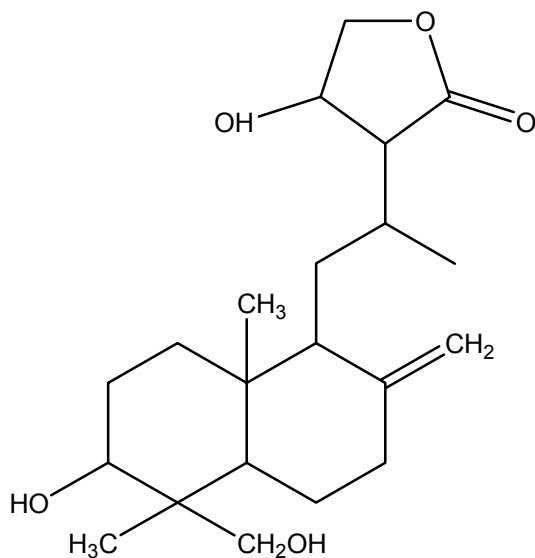
Bahan diterpena seperti kahweol dan cafestol yang terdapat pada biji kopi menggalakkan tindakan kebanyakan subunit enzim GST seperti GST α , GST μ , GST π dan GST X, serta sistem enzim UGT seperti UGT 1 dan UGT 2. Diterpena juga didapati meningkatkan aras GSH dan γ -glutamil-sisteina-sintetase (Huber *et al.*, 2003). Diterpena fenolik seperti karnosol atau asid karnosik telah menunjukkan perubahan enzim metabolisme xenobiotik.

1.3.1 (a) *Andrografolida (AND)*

Andrografolida (AND) ialah bahan aktif utama *Andrographis paniculata*. Ia menyumbang 1 % daripada berat kering AP (Calabrese *et al.*, 2000). AND boleh diekstrak daripada bahagian aerial AP melalui pengekstrakan menggunakan pelarut alkohol atau dengan larutan alkali (Tang & Eisenbrand, 1992). Struktur AND terdiri daripada gelang γ -lakton yang dihubungkan pada sistem gelang dekalin melalui moiety C_2 tak tepu. Hidrolisis AND, iaitu pemecahan pada gelang lakton, menghasilkan garam asid andrografolida yang boleh ditukarkan kepada andrografolida melalui pengasidan (Tang & Eisenbrand, 1992) (Rajah 1.2).

Perbezaan kandungan AND pada AP bergantung pada bahagian tumbuhan atau masa. Pada daun, kandungan AND lebih tinggi (2.6 %) daripada bahagian batang (0.1-0.4 %). Manakala berdasarkan masa,

kandungan sebelum berbunga (2 %) lebih tinggi daripada kandungan selepas berbunga iaitu (0.5 %) (Calabrese *et al.*, 2000). Oleh sebab perbezaan kandungan AND di setiap bahagian tumbuhan ini, maka disyorkan penggunaan keseluruhan tumbuhan untuk perubatan (Cheung *et al.*, 2001). AND telah didapati menghalang penghasilan oksigen radikal bebas dan seterusnya menghalang penyakit inflamasi. Ia juga menghalang apoptosis sel endothelium melalui pengaktifan



Rajah 1.2 Rajah menunjukkan struktur andrografolida (AND) merupakan bahan bioaktif penting yang terdapat pada AP.

tindak balas fosfatidil inositol-3-kinase/Akt iaitu isyarat antiapoptosis (Chen *et al.*, 2004). Di samping itu, AND mengurangkan kesan toksik parasetamol yang dihasilkan oleh enzim (GOT, GPT dan alkalin fosfatase) pada serum terutama pada sel hepatic yang dipencilkan. Andrografolida lebih berkesan daripada silimarin, iaitu agen perlindungan hepar piawai (Visen *et al.*, 1993).

1.3.1 (b) *Neoandrografolida*

Neoandrografolida ialah diterpena glukosida yang merupakan β -glukosida bagi ent-9-hidroksi-8 (17), 13-labdadien-16,15-olide. Suatu korelasi komponen ini dengan andrografolida telah dibuat (Chan *et al.*, 1971). Kajian oleh Kapil *et al.* (1993) menunjukkan neoandrografolida (100 mg/kg i.p.) membantu mengawal aras glutation dalam keadaan normal. Aglikon bagi neoandrografolida ialah dideoksiandrografolida (Tang & Eisenbrand, 1992).

1.3.1 (c) *Dehidroandrografolida*

Kajian *in vitro* menunjukkan dehidroandrografolida mempunyai aktiviti terhadap 'human immunodeficiency virus' (HIV) (Cheung *et al.*, 2001).

1.3.2 Kandungan lain

AP juga mengandung flavonoid yaitu orozilin, wogonin, andrografidine A dan andandrografidine B, C, D, E and F (Tang & Eisenbrand, 1992). Hal ini membuktikan AP menghasilkan 3 flavon yaitu (a)5-hidroksi-7, 8, 2'-trimetoksi-5, (b)2'-dihidroksi-7, 8-dimetoksi, dan (c) 5-hidroksi-7,8-dimetoksi-flavon (Jalal *et al.*, 1979). Pemencilan flavanon glikosida yaitu andrografidin A dan flavon glikosida andrografolidin B,C,D,E dan F daripada akar AP (Thang & Eisenbrand, 1992).

Flavonoid dikenal pasti daripada AP ialah 5,7,2',3'-tetrametoksiflavon, 5-hidroksi-7,2',3'-trimetoksiflavon, flavonoid 5-hidroksi-7,8-dimetoksiflavon dan 5-hidroksi-3,7,8,2'-tetrametoksiflavon, 5-hidroksi-7,8-dimetoksiflavon (Gupta *et al.*,1983). Andrografisida ialah glukosida bagi andrografolida (Tang & Eisenbrand, 1992).

1.4 Kaedah Analisis Ekstrak *Andrographis paniculata*

Pada hari ini banyak kajian dijalankan untuk menganalisis kandungan ekstrak AP. Antara peralatan yang telah digunakan untuk analisis AP ialah Kromatografi Lapisan Nipis (TLC), UV-Spektrofotometer, 'chemiluminescence' dan Kromatografi Cecair

Tekanan Tinggi (HPLC). Kaedah menggunakan 'Thin Layer Chromatography' memerlukan masa selama 1-3 jam. Manakala kaedah spektrofotometer menghasilkan keputusan bacaan ultra lembayung (UV) 94% daripada nilai sebenar. Kaedah 'chemiluminescence' menghasilkan keputusan secara tidak langsung kerana pengesanan cahaya yang stabil terbentuk melalui pembentukan kompleks luminol- $H_2O_2-Co^{2+}$.

Pemisahan melalui kaedah HPLC menggunakan kolom 'spherical silica' (berukuran 3.9 mm X 15 sm) hanya mengambil masa 3 minit. Cheung *et al.*, (2001) mengemukakan kaedah kromatografi elektrokinetik 'micellar' (MEKC) dan berjaya menjalankan pemisahan untuk menentukan kuantiti andrografolida, deoksiandrografolida dan neoandrografolida. Du *et al.*, (2003) menganalisis andrografolida dan neoandrografolida daripada daun AP menggunakan kromatografi 'counter-current'. Pengesanan struktur menggunakan kaedah spektrometri jisim semburan elektro (elektrospray MS), spektroskopi resonan magnet nukleus (NMR) 1 dimensi, 'dichroism' sirkular, penyebaran optikal rotasi dan optikal rotasi spesifik.

1.5 Dos *Andrographis paniculata*

Berdasarkan Duke *et al.*, (2000) dos AP yang disyorkan ialah 1.5-6.0 g berat kering /hari atau 3-12 mL larutan ekstrak (1:2). Kajian

toksikiti terhadap haiwan telah membuktikan penggunaan cara tradisional bahan AP dan terbitan yang lain adalah selamat (Calabrese *et al*, 2000). Wang (1983) melaporkan dos maut (LD_{50}) keseluruhan diterpena lakton pada mencit ialah 13.4 g/kg. LD_{50} bagi deoksi-, neo-, atau dehidro-andrografolida melebihi 20 g/kg, dan LD_{50} bagi andrografolida melebihi 40 g/kg (Calabrese *et al.*, 2000). Thamlikitkul *et al.* (1991) melaporkan sebanyak 9-15 g serbuk herba ini boleh menghasilkan 90-150 mg andrografolida sehari. Ujian klinikal pula telah menggunakan dos yang lebih tinggi iaitu 2.25-22.5 mg/kg berat badan atau melebihi 1500 mg pada subjek 70 kg sehari (Calabrese *et al.*, 2000).

1.6 Hepatotoksikiti

Kajian hepatotoksikiti telah mendapat perhatian ramai kerana kejadian pengumpulan toksin telah menyebabkan timbulnya penyakit hepar dan seterusnya penyakit lain seperti rheumatoid arthritis, ekzema, migrain, sindrom prahaid dan lain-lain. Sistem kompleks enzim iaitu anilinhidroksilase, *N*-demetilase dan *O*-demetilase hadir pada mikrosom atau endoplasmik retikulum pada hepatosit mamalia. Sistem ini memainkan peranan penting dalam proses biotransformasi bahan xenobiotik. Antara aktiviti enzim ini ialah mengubah sesuatu bahan menjadi bahan biologi aktif atau sebaliknya di dalam badan (Choudhury

et al., 1987). Apabila penyakit hepar berlaku, penurunan aktiviti bagi enzim UDP-glukuronosiltransferase, sulfotransferase, asetiltransferase, glutathion S-transferase dan semua enzim sitosolik serta enzim mikrosom akan berlaku (Pacifci *et al.*, 1990).

Peningkatan separuh hayat drug pada hepar yang cedera adalah disebabkan perubahan aktiviti enzim Fasa I dan II. Pada pesakit sirosis, separuh hayat drug morfin dan oksazepam didapati berada pada aras yang lebih rendah daripada separuh hayat parasetamol dan kloramfenikol. Hal ini kerana morfin dan oksazepam masing-masing memerlukan proses metabolisme yang lebih kompleks (Pacifci *et al.*, 1990).

1.7 Kerosakan Hepar Disebabkan Tetraklorokarbon (CCl₄)

Antara bahan kimia yang boleh menyebabkan kerosakan hati ialah tetraklorokarbon (CCl₄). Enzim sitokrom *P*-450 (CYP) merupakan enzim penggalak bagi karsinogen. Kehadiran enzim sitokrom *P*-450 mono-oksigenase telah diketahui menggalakkan pembentukan radikal bebas iaitu triklorometil (Teyssier *et al.*, 2001).

Kehadiran oksigen radikal bebas boleh menambah kesan buruk iaitu mengalkil sel protein (termasuk sitokrom *P*-450) dan makromolekul. Bahan ini bertindak serentak terhadap asid lemak politattepu untuk menghasilkan lipid peroksida. Nekrosis berlaku pada

hepar kerana terhasilnya metabolit bersifat reaktif elektrofilik. Metabolit ini boleh menarik atom hidrogen daripada lipid, membentuk lipid yang mengandungi karbon tengah yang radikal. Kajian menunjukkan lipid pada hepar mencit yang telah bertindak balas dengan tetraklorokarbon dan tert-butilhidroperoksida (tBHP) mengandungi bahan peroksida. Bahan ini boleh menggalakkan proses peroksida atau berkonjugat dengan glutathion pada hepar. Keadaan kerosakan hepar ini menyebabkan pengurangan glutathion diikuti dengan kemunculan kerosakan hepar. Keadaan ini boleh ditentukan melalui peningkatan aras enzim pada serum (Kapil *et al.*, 1993). Peningkatan yang ketara aktiviti enzim-enzim SGOT, SGPT, LDH, alkali fosfatase, sorbitol dan glutamate dehidrogenase dalam tempoh 24 jam pendedahan mencit terhadap satu dos tetraklorokarbon telah menunjukkan kecederaan sel hepar (Kapil *et al.*, 1993; Bishayee *et al.*, 1995). Selain sebatian CCl₄, drug parasetamol boleh menyebabkan penurunan peratusan sel viabel dan perubahan parameter biokimia pada hepatosit yang dipencilkan.

1.8 Penggunaan *Andrographis paniculata* (AP) untuk Merawat Toksik Hepar.

Kajian oleh Kapil *et al.* (1993) menunjukkan AP memberikan perlindungan pada hepar mencit daripada kesan toksik oleh sebatian karbon tetraklorida. Ekstrak daun AP juga telah dilihat mempunyai

kesan perencatan atau penggalak fungsi oksidase (Choudhury *et al.*, 1987).

Pemberian secara intraperitoneal bagi andrografolida (I), andrografisida (II) dan neoandrografolida (III) telah merencat pembentukan malondialdehyde (MDA) hepatic.

Kecederaan hepar menyebabkan berlaku gangguan fungsi pengangkutan enzim hepar, hasil daripada gangguan ketelapan membran plasma. Keadaan ini menyebabkan pengurangan aras enzim dalam sel dan sebaliknya peningkatan aras enzim dalam plasma (Visen *et al.*, 1993).

1.9 Metabolisme Drug

Drug akan melalui proses metabolisme yang melibatkan Fasa I dan Fasa II pada manusia. Sifat kerintangan sistem biologi terhadap bahan kimia karsinogen sebahagiannya dikawal oleh keseimbangan antara sistem enzim Fasa 1 (bersandarkan sitokrom *P*-450 atau mono-oksigenase) dengan Fasa II melibatkan enzim UDP-glukuronosiltransferase (UGT), glutathion S-transferase (GST) dan quinone reductase (Kusamran *et al.*, 1998).

Kebanyakan drug yang melalui Fasa I akan terlibat dengan tindak balas oksidasi, reduksi, hidrolisis atau hidrasi, iaitu perubahan kumpulan fungsi seperti OH, NH₂ atau COOH. Tindak balas ini akan meningkatkan polariti drug dan keaktifan drug untuk seterusnya menjalani tindak balas dalam fasa seterusnya, Fasa II (Gibson & Skett, 1986).

Metabolisme drug Fasa II memainkan peranan penting dalam proses detoksifikasi. Kebanyakan drug yang telah melalui Fasa I akan melalui Fasa II iaitu tindak balas konjugasi yang melibatkan proses glukuronidasi, glikosida, sulfurasi, metilasi dan lain-lain. Konjugasi glukuronida merupakan tindak balas konjugasi yang utama di dalam badan. Ia melibatkan perubahan xenobiotik atau bahan endogenus kepada metabolit larut air yang polar (bahan hidrofilik). Konjugat glukuronida yang terhasil di lumen endoplasmik retikulum bercas, larut air, dengan berat molekul yang tinggi (300-1000 Da). Konjugat akan berpindah secara aktif pada hempedu melalui membran 'canalicular' oleh pengangkut 'multiple organic anion' (Banhegyi *et al.*, 1996). Tindak balas ini menghasilkan produk yang lebih larut air untuk dikeluarkan daripada badan melalui urin atau hempedu melalui tinja. Keadaan ini merupakan laluan yang penting dalam proses nyah toksin daripada badan. Sama ada UDP-glukuronosiltransferase (UGT) atau glutathione S-transferase (GST), kedua-duanya merupakan enzim penting dalam proses nyah toksin daripada badan haiwan (Teyssier *et al.*, 2001).

1.10 Faktor Mempengaruhi Metabolisme Drug

Antara faktor yang mempengaruhi metabolisme drug termasuklah faktor dalaman dan luaran. Contoh faktor dalaman ialah spesis, seks, umur, hormon, kehamilan, penyakit dan lain-lain.

Antara faktor luaran termasuklah diet dan persekitaran. Faktor diet adalah seperti protein, lemak, karbohidrat, vitamin, unsur surih dan lain-lain. Vitamin A, B, C dan E penting untuk mengawal tahap metabolisme drug yang normal. Vitamin C memberikan kesan pada sitokrom *P-450* secara tidak langsung. Vitamin C juga terlibat untuk mengawal keutuhan struktur membran endoplasmik retikulum.

Faktor persekitaran adalah seperti melibatkan pendedahan pada bahan cemar seperti hasil petroleum, pirolisis dan logam berat, faktor pH, suhu dan lain-lain lagi.

Enzim yang bertanggungjawab dalam tindak balas konjugasi glukuronida terhadap drug ialah UDP-glukuronosiltransferase.

1.11 Kajian Kinetik

Kajian kinetik ialah untuk memahami keadaan semulajadi tapak aktif bagi enzim dan tindak balas enzim pada persekitaran fisiologi. Tindak balas pemangkinan enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antaranya ialah

kepekatan enzim, kepekatan ligand (substrat, produk, perencat dan pengaktif), pH, kekuatan ionik dan suhu (Houston *et al.*, 2003).

K_m adalah afiniti enzim pada substrat, dan menentukan enzim melalui ketepuan *in vivo*. Kajian kinetik boleh menyediakan maklumat mengenai mekanisme tindakan enzim. Kehadiran penggalak dan bahan modulator semulajadi boleh dikesan. Enzim dari pelbagai sumber boleh dibuat perbandingan kerana nilai K_m adalah sama bagi enzim (Houston *et al.*, 2003).

Dalam kajian kinetik, keadaan mantap (steady-state) mengandaikan bahawa $[S]$ 'total' = $[S]$ 'free', maka $[S] \gg [ES]$ dan pembentukan kompleks enzim substrat tidak merubah kepekatan substrat. Keadaan ini boleh berlaku jika $[S] \gg [E]$ atau $K_m \gg [E]$. Keadaan ini umum berlaku mengguna enzim dari mikrosom bagi kajian kinetik (Houston *et al.*, 2003).

Persamaan Michaelis Menten (MM) memperihalkan perhubungan hiperbolik antara halaju awal tindak balas dengan kepekatan substrat. Kinetik MM pada suatu tindak balas melibatkan enzim dan substrat dalam keadaan yang seimbang pada komplek enzim-substrat tanpa dipengaruhi oleh kepekatan hasil pada awal tindak balas (Bergmeyer, 1983)

Nilai K_m dan V_{mak}/K_m bagi tindak balas melibatkan sesuatu substrat ialah parameter terbaik bagi pengukuran spesifikasi enzim terhadap molekul xenobiotik (Burchell *et al.*, 1995). Kinetik bagi proses glukuronidasi *p*-nitrofenol disaksikan melalui kepekatan UDPGA yang rendah diperlukan untuk tindak balas dengan enzim UGT tikus belanda.

1.12 Uridin Difosfat -Glukuronosiltransferase (UGT)

1.12.1 *Pengenalan*

UDP glukuronat β -D-glukuronosiltransferase (UGT) (EC 2.4.1.17) ialah enzim glikoprotein. Enzim UGT ialah enzim yang penting dalam proses glukuronidasi iaitu tindak balas utama bagi proses biotransformasi dan detoksifikasi metabolisme drug Fasa II pada haiwan vertebrata (Banhegyi *et al.*, 1995; Grancharov *et al.*, 2001). Substrat bagi enzim ini diketahui tidak spesifik (Falany *et al.*, 1987).

1.12.2 *Struktur Molekul dan Subunit UGT*

Berat molekul monomer bagi enzim UGT yang telah dipisahkan berbeza iaitu dari 50 kDa hingga 60 kDa. Multi isomer UGT telah diklasifikasikan kepada dua famili, iaitu UGT1 dan UGT2. Kepelbagaian aktiviti bagi isomer UGT ini memberikan kepentingan bagi setiap isoenzim (Brunelle *et al.*, 1996). Bentuk isomer utama UGT yang ditemui daripada tikus ialah 1A1, 1A6, 2B1 dan 2B12 (Narayanan *et al.*, 2004). Aktiviti UGT yang ditentukan dengan menggunakan *p*-nitrofenol sebagai substrat dipercayai melibatkan isomer 1A6. Isomer ini terlibat

secara aktif dalam proses nyah toksin bahan kimia yang bersifat karsinogen seperti hidrokarbon polisiklik dan kumpulan amina aromatik heterosiklik (Bock *et al.*, 1983). Famili multi-gen mengkod beberapa enzim UGT yang memangkin aktiviti metabolisme ini (Tephly & Burchell, 1990). Isoenzim yang terikat pada membran ini ialah famili multigen (Grancharov *et al.*, 2001).

1.12.3 Kedudukan UGT

UGT merupakan kumpulan isoenzim yang terikat pada membran. Enzim ini ditemui dalam kebanyakan organ mamalia iaitu hepar, ginjal, usus kecil, paru-paru, kulit, adrenal, limfa dan otak (Narayanan *et al.*, 2004). Walau bagaimanapun aktiviti yang tinggi terdapat pada hepar. Enzim ini terdapat pada endoplasmik retikulum (Grancharov *et al.*, 2001) terutamanya pada fraksi membran (Banhegyi *et al.*, 1995). Kajian oleh Fulceri *et al.* (1994) juga menyokong hipotesis bahawa pemetakan intravesikular merupakan tapak pengaktifan UGT pada mikrosom. Kajian menunjukkan kebanyakan enzim terdapat pada lumen endoplasmik retikulum dan trans-membran berhampiran terminal karboksi. Orientasi luminal tapak aktif UGT membuktikan terdapat sekurang-kurangnya dua sistem pengangkutan membran bagi mengangkut ko-substrat yang bercas tinggi seperti UDPGA daripada sitoplasma, iaitu tempat ia disintesis, kepada lumen ER dan seterusnya

mengangkut hasil glukuronidasi daripada lumen ke sitoplasma (Kauffman, 1994).

1.12.4 Tapak Aktif UGT

Pelbagai terbitan UDP menunjukkan perbezaan dari segi keupayaan menghalang aktiviti UGT yang mempunyai tapak aktif yang berbeza (Noort *et al.*, 1990). UDP-asid glukuronik (UDPGA) berhubung dengan residu pada kedua-dua domain terminal N- dan C-, manakala tapak pengikatan aglikon terdapat pada domain terminal N-. Asid amino yang dikenal pasti penting sebagai tapak pengikatan dan pemangkinan substrat ialah arginina, lisina, histidina, prolina dan residu mengandungi asid karboksilik. Perkembangan dalam pemilihan perencat bagi isomer UGT membantu kajian tapak aktif bagi enzim ini (Grancharoc *et al.*, 2001)

1.12.5 Substrat UGT

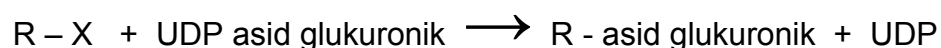
UGT bertindak terhadap pelbagai substrat, antaranya ialah endogen dan eksogen yang berperanan aktif secara farmakologi. Substrat-substrat ini juga merupakan bahan nukleofilik yang mempunyai kumpulan berfungsi terkandung oksigen, nitrogen, sulfur dan karbon pada hepar (Kauffman, 1994). Telah diketahui bahawa

berlakunya selektiviti substrat mengikut konformasi struktur enantiomer atau stereo isomer bagi kebanyakan drug manusia (Kauffman, 1994). Isomer enzim ini mempunyai spesifisiti substrat yang bertindan iaitu beberapa isomer UGT mempunyai aktiviti terhadap *p*-nitrofenol (Brunelle *et al.*, 1996). Proses glukuronidasi terhadap testosteron dan steron melibatkan isomer enzim UGT yang berlainan daripada tikus. Antara bahan penerima atau substrat dalam tindak balas glukuronidasi ialah bahan fenol seperti (propofol, nalokson, parasetamol), alkohol (kloramfenikol, kodeina, oksazepam) amina alifatik (ciclopiroxolamine, lamotriptyline), atom karbon asidik (sulfinpirazon, feprazone) dan asid karbosilik (naproxen) (Brunelle *et al.*, 1996).

Kajian melalui profil kromatofokusi menunjukkan proses glukuronidasi melibatkan testosteron, steron, androgen, androsteron, dihidrotestosteron, 1-naftol, morfina, *p*-nitrofenol, 2-aminofenol dan 2-aminobenzoat sebagai substrat oleh sebab enzim UGT dalam bentuk 'pl rendah' (Falany *et al.*, 1987). Melalui kajian ekspresi cDNA, didapati sebanyak 350 bahan telah dikenal pasti sebagai substrat bagi isomer enzim ini (Tukey *et al.*, 2000). Asparagina (Asp 446) ialah asid amino yang perlu terlibat dengan aktiviti enzim isoform UGT1A6 (Iwano *et al.*, 1997). Bilirubin telah digunakan sebagai substrat prob pilihan bagi UGT1A1 dan 4-metilumbelliferon (4MU) pula ialah substrat prob bagi UGT1A6 (Peters *et al.*, 2003).

1.12.6 Tindak balas Enzim UGT

Enzim UGT memangkin proses glukuronidasi yang melibatkan pemindahan asid glukuronik daripada asid uridina 5'-difosfat-D-asid glukuronik (UDPGA; ko-faktor) kepada tapak nukleofilik pada molekul penerima iaitu substrat yang mengandungi kumpulan hidroksi-, amino-, karboksi- atau kumpulan sulfhidril untuk menghasilkan konjugat glukuronida yang larut air iaitu β -(D)-glukuronida (Falany *et al.*, 1987; Kauffman, 1994; Grancharov *et al.*, 2001). Molekul substrat penerima termasuklah xenobiotik seperti ubat-ubatan, pestisid serta bahan endogenous seperti steroid dan bilirubin, hasil daripada tindak balas oksidasi oleh enzim oksidase atau aglikon lipofilik.



R-X merupakan xenobiotik atau endobiotik manakala X merupakan kumpulan berfungsi yang akan menerima asid glukuronik (UDPGA) seperti OH, COOH, amino, kumpulan sulfur dan karbon tengah. Enzim ini akan menyerang atom C1 pada gelang asid piranosa pada UDPGA untuk pembentukan konjugat glukuronida asid β -D-glukupiranosiduronik (Kauffman, 1994). Atom karbon 1 asid glukuronik pada UDPGA adalah dalam kedudukan konfigurasi α dan semasa

pemindahan substrat penerima, berlaku inversi menghasilkan pembentukan konfigurasi β (Choudhury *et al.*, 1987).

1.12.7 Kepentingan Aktiviti UGT

Berlakunya tindak balas glukuronidasi yang menghalang aktiviti biologi kebanyakan bahan di dalam badan (Kauffman, 1994). Hasil tindak balas ini penting untuk penyahaktifan bahan toksik menjadi konjugat glukuronida yang kurang toksik dan larut air serta lebih mudah dikeluarkan daripada badan berbanding drug yang asal (Kauffman, 1994; Falany *et al.*, 1987). Fungsi perlindungan sel ini berlaku adalah dengan menghalang pengumpulan bahan xenobiotik yang bertoksik di dalam tubuh; ia menghalang bahan xenobiotik ini menjadi bioaktif dan menjadi bahan perantara yang lebih bertoksik (Green & Tephly, 1996). Hasil konjugat glukuronida ini dinyah daripada tubuh sama ada melalui urin atau hempedu dan seterusnya ke bahagian usus. Pada bahagian usus, hasil konjugat dikeluarkan melalui tinja atau dihidrolis oleh enzim β -glukuronidase daripada bakteria dalam usus yang akan menghasilkan drug asal untuk diserap kembali oleh sistem peredaran darah (Narayanan *et al.*, 2004). Proses ini dikenali sebagai kitaran enterohepatik.

1.12.8 Faktor Mempengaruhi Aktiviti Pemangkinan UGT

1.12.8 (a) Lipid dan Jantina

Aktiviti pemangkinan UGT dipengaruhi oleh kehadiran lipid (fosfolipid) (Gibson & Skett, 1986). Aktiviti UGT natif pada mikrosom tikus jantan ialah 47% lebih tinggi daripada tikus betina kerana perbezaan kandungan asid lemak pada struktur membran. Membran mikrosom tikus jantan terdiri daripada asid oleik dan linolik yang tinggi manakala mikrosom tikus betina mengandungi tahap asid stearik dan dekohezanoik yang lebih rendah. Komposisi bendalir membran, fosfolipid dan nisbah kolesterol / fosfolipid tikus jantan dan tikus betina adalah sama. Keputusan ini menunjukkan perbezaan aktiviti enzim UGT bergantung pada jantina kerana perbezaan jumlah dan tahap fungsi enzim (Catania *et al.*, 1995).

1.12.8 (b) Farmakokinetik Drug

Kadar glukuronidasi mempengaruhi tindakan farmakokinetik drug. Glukuronida yang dilihat pada awalnya bertindak mengaktifkan UGT pada membran natif telah didapati merencat aktivitinya selepas rawatan dengan detergen TritonX-100. Keadaan ini menunjukkan kesan kawalan UGT oleh detergen TritonX-100 bergantung pada membran;

produk ini mempunyai kesan allosterik pada enzim permease yang kesannya akan hilang apabila berlaku gangguan membran (Kasper & Henton, 1980). UDP-N-asetilglukusamina (UDP-Ace) merupakan pengawal bagi enzim UGT *in vivo*, iaitu meningkatkan konjugasi bertanding dengan UDP. Apabila kepekatan detergen rendah, keupayaan untuk meningkatkan sifat pendam enzim berkurang dan oleh sebab itu UDP-Ace akan menghalang tindak balas. Jika kepekatan detergen tinggi, kehadiran gula nukleotida tidak memberikan kesan (Kasper & Henton, 1980). 3-metilolantrina atau fenobarbital meningkatkan aktiviti UGT (Mottino *et al.*, 1991).

1.12.8 (c) *Ekspresi UGT*

Kadar metabolisme drug juga dipengaruhi oleh faktor pengekspresan UGT (Burchell, 1999).

1.12.8 (d) *Gangguan pada Membran*

Membran mikrosom memainkan peranan penting mempengaruhi kesampaian substrat pada tapak aktif enzim UGT. UDPGA bertindak sebagai ko-faktor dalam tindak balas glukuronidasi memasuki membran mikrosom secara resapan lemah. Perkara ini berkait dengan enzim