

**KESAN SITOTOKSIK DAN MEKANISME KEMATIAN SEL OLEH  
EKSTRAK *PHYLLANTHUS PULCHER* TERHADAP PELBAGAI TURUNAN  
SEL KANSER**

**Oleh**

**MOHAMMAD SYAIFUL BAHARI BIN ABDULL RASAD**

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

**Mac 2004**

## PENGHARGAAN

Segala puji bagi Allah kerana dengan izin dan limpah kurnianya maka terhasillah kajian yang tidak seberapa ini.

Setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih diucapkan kepada penyelia utama Profesor Madya Dr. Shaída Fariza Sulaiman atas segala nasihat, tunjuk ajar dan buah fikiran yang disumbangkan dalam menjayakan penyelidikan ini. Sesungguhnya jasa, pengorbanan dan segalanya amat bermakna. Terima kasih juga buat penyelia bersama yang banyak menyumbang dalam penyelidikan ini iaitu Profesor Madya Dr. Tengku Sifzizul Tengku Muhammad dan Profesor Madya Dr. Mohd Nazalan Najimudin. Penghargaan juga ditujukan buat Profesor Zhari Ismail dari Pusat Pengajian Sains Farmasi dan Profesor Madya Dr. Mohd Nor Ahmad dari Pusat Pengajian Sains Kimia atas bantuan yang diberikan serta kepada En Rahim dan Dr. Nizam daripada Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubat-ubatan. Tidak lupa juga buat staf Pusat Pengajian Sains Kajihayat yang banyak membantu sama ada secara langsung atau tidak langsung.

Penghargaan dan terima kasih ditujukan khas buat ibu dan bapa yang dikasihi, Abdull Rasad dan Wan Norasiah atas segala jasa dan pengorbanan yang tidak ternilai. Penghargaan paling istimewa buat isteri tersayang Rahmatul Wahida yang banyak memberi sokongan dan dorongan. Tidak lupa buat keluarga Zuhairi dan Hidayati, terima kasih atas dorongan yang diberikan serta buat adik-adik; Syazwan, Adibah dan Asyraf, semoga kejayaan ini menjadi perangsang untuk kalian lebih berjaya lagi.

Buat rakan-rakan makmal fitokimia, makmal molekul dan makmal kultur tisu terutamanya Dr. Tan Mei Lan, Venugopal dan Khairul Farihan, terima kasih yang tidak terhingga atas tunjuk ajar dan bantuan yang diberikan. Tidak lupa rakan-rakan seperjuangan Marisa, Hartini, Wan Iryani, Faizah dan rakan-rakan lain yang banyak membantu.

Penghargaan juga ditujukan kepada Universiti Sains Malaysia, Pusat Pengajian Sains Kajihayat, Pusat Pengajian Sains Farmasi, Pusat Pengajian Sains Kimia, Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubat-ubatan dan Institut Pengajian Siswazah atas kemudahan yang diberikan. Terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar Malaysia di atas biasiswa National Science Fellowship sepanjang tempoh pengajian serta FELDA di atas pembiayaan geran penyelidikan.

Akhir sekali, terima kasih kepada semua yang terlibat sama ada secara langsung atau tidak langsung sehingga terhasilnya kajian ini. Sesungguhnya setiap manusia tidak akan mencapai tahap kesempurnaan dalam erti kata yang sebenarnya. Sesungguhnya kajian ini tidak akan terhasil tanpa bantuan kalian. Terima kasih.

**MOHAMMAD SYAIFUL BAHARI ABDULL RASAD**

## KANDUNGAN

	Muka surat
<b>Penghargaan</b>	<b>ii</b>
<b>Kandungan</b>	<b>iii</b>
<b>Senarai Jadual</b>	<b>viii</b>
<b>Senarai Rajah</b>	<b>xi</b>
<b>Senarai Singkatan</b>	<b>xvi</b>
<b>Abstrak</b>	<b>xviii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xx</b>
<b>1.0 PENGENALAN</b>	<b>1</b>
1.1 Perubatan herba dan kanser	1
1.1.1 Tumbuhan <i>Phyllanthus pulcher</i>	4
1.2 Fitokimia dan kanser	6
1.3 Kajian sitotoksisiti dan kanser	6
1.3.1 Kanser	9
1.3.2 Karsinoma hepatoselular	14
1.3.3 Kajian <i>in vitro</i> antikanser	17
1.4 Mekanisme kematian sel	21
1.4.1 Apoptosis dan nekrosis	21
1.4.2 Caspase-3	25
1.4.3 p53	27
1.5 Toksikologi	29
1.6 Objektif penyelidikan	33
<b>2.0 BAHAN DAN KAEDAH</b>	<b>35</b>
2.1 Penyediaan ekstrak tumbuhan <i>P. pulcher</i>	35
2.1.1 Pensampelan tumbuhan	35
2.1.2 Pengekstrakan tumbuhan	35
2.1.3 Pencairan ekstrak tumbuhan	36
2.2 Kajian sitotoksik <i>P. pulcher</i> terhadap turunan sel kanser	36

2.2.1 Pengkulturan <i>in vitro</i> sel	38
2.2.1.1 Kultur sel	38
2.2.1.1.1 Sel dan medium	39
2.2.1.2 Pengkulturan sel dari nitrogen cecair	40
2.2.1.3 Pengkulturan dan pemeliharaan sel	40
2.2.1.4 Penukaran medium	41
2.2.1.5 Pengsubkulturan sel	41
2.2.1.6 Pemplatan sel	42
2.2.1.7 Pengawetan sel	43
2.2.2 Pengujian ekstrak tumbuhan	43
2.2.2.1 Rekabentuk eksperimen	43
2.2.2.2 Pengujian ekstrak pada sel	44
2.2.2.3 Pengujian Vinkristin sulfat sebagai kawalan positif	45
2.2.2.4 Asai metilina biru	45
2.2.2.5 Pengukuran daya penyerapan	46
2.2.2.6 Pengiraan dan statistik	48
2.3 Penyaringan fitokimia dan penyisihan fraksi berdasarkan bioaktiviti	
<i>P. pulcher</i>	49
2.3.1 Pengesanan sebatian bioaktif	49
2.3.1.1 Kromatografi lapisan nipis	49
2.3.1.2 Kromatografi turus	50
2.3.2 Penyaringan fitokimia	51
2.3.2.1 Penyaringan terpenoid	51
2.3.2.1.1 Pengesanan sebatian monoterpenoid	51
2.3.2.1.2 Pengesanan sebatian diterpenoid	52
2.3.2.1.3 Pengesanan sebatian triterpenoid	53
2.3.2.1.3.1 Ujian saponin	53
2.3.2.2 Pengesanan sebatian alkaloid	54
2.3.2.2.1 Bahan uji Mayer	54
2.3.2.2.2 Reagen Dragendorff	55
2.3.2.3 Penyaringan flavonoid	56
2.3.2.3.1 Pengesanan tanin	56
2.3.2.3.2 Ujian flavonoid untuk pengesanan flavonoid glikosida	56
2.4 Mekanisme kematian sel	57

2.4.1 Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™ (Promega)	57
2.4.1.1 Penyediaan sel pada slaid	57
2.4.1.2 Pengesanan apoptosis	58
2.4.1.3 Rawatan DNase I sebagai kawalan positif	59
2.4.2 Sistem Pengesanan Apoptosis Fragmentasi DNA Sel Secara ELISA	59
2.4.3 Pengekspresan gen	61
2.4.3.1 Pengekstrakan RNA	61
2.4.3.2 Penyediaan gel agarosa formaldehid	62
2.4.3.3 Penyediaan sampel RNA dan larian gel	63
2.4.3.4 Analisis spektrofotometer	65
2.4.3.5 Rawatan RNA	65
2.4.3.6 Sintesis cDNA tetali tunggal	66
2.4.3.7 Rekabentuk pencetus	66
2.4.3.8 Tindakbalas rantai polimerase (PCR)	68
2.4.3.9 Penyediaan gel agarosa 1.2%	69
2.4.3.10 Larian gel agarosa produk PCR	69
2.4.3.11 Analisis kadar pengekspresan mRNA	70
2.5 Ketoksikan ekstrak <i>P. pulcher</i>	70
2.5.1 Penyediaan ekstrak	70
2.5.2 Penyediaan 3% air laut buatan	70
2.5.3 Penetasan telur <i>Artemia salina</i>	71
2.5.4 Ujian ketoksikan	71
<b>3.0 KEPUTUSAN</b>	<b>73</b>
3.1 Kajian sitotoksik <i>P. pulcher</i> terhadap turunan sel kanser	73
3.1.1 Kesan sitotoksik ekstrak <i>P. pulcher</i> terhadap sel	73
3.1.2 Kesan sitotoksik ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i> terhadap sel HepG2 pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam	77
3.1.3 Perbandingan nilai EC <sub>50</sub> keseluruhan	80
3.1.4 Kesan sitotoksik Vinkristin sulfat sebagai kawalan positif	82
3.2 Penyisihan fraksi berdasarkan bioaktiviti <i>P. pulcher</i>	86
3.2.1 Sistem pelarut terbaik untuk memisahkan ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i>	86

3.2.2 Pemisahan ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i> dengan kromatografi turus	88
3.2.3 Kesan sitotoksik fraksi-fraksi ekstrak kloroform terhadap sel HepG2	90
3.3 Penskrinan fitokimia <i>P. pulcher</i>	100
3.3.1 Penskrinan terpenoid	100
3.3.1.1 Penskrinan monoterpenoid	100
3.3.1.2 Penskrinan diterpenoid	108
3.3.1.3 Penskrinan triterpenoid	115
3.3.2 Ujian saponin	122
3.3.3 Pengesanan sebatian alkaloid	122
3.3.3.1 Bahan uji Mayer	122
3.3.3.2 Reagen Dragendorff	122
3.3.4 Pengesanan tanin	124
3.3.5 Ujian flavonoid untuk pengecaman flavonoid glikosida	124
3.4 Mekanisme kematian sel	126
3.4.1 Penentuan mekanisme kematian sel secara apoptosis oleh ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i> : Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™	126
3.4.1.1 Rawatan sel HepG2 dengan ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i>	126
3.4.1.2 Rawatan sel HepG2 dengan DNase sebagai kawalan positif	129
3.4.1.3 Rawatan sel HepG2 dengan DMSO sebagai kawalan negatif	129
3.4.2 Sistem Pengesanan Apoptosis Fragmentasi DNA Sel Secara ELISA	130
3.4.3 Penentuan pengekspresan gen apoptosis pada sel HepG2 yang dirawat dengan ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i>	133
3.4.3.1 Pengekstrakan RNA daripada sel HepG2	133
3.4.3.2 Analisis spektrofotometri	133
3.4.3.3 Pengoptimuman amplifikasi gen $\beta$ -actin, caspase-3 dan p53	135
3.4.3.4 Pengekspresan gen caspase-3 dan p53	137
3.5 Ketoksikan ekstrak <i>P. pulcher</i>	144
3.5.1 Kesan ketoksikan ekstrak <i>P. pulcher</i> terhadap <i>Artemia salina</i>	144
3.5.2 Kesan ketoksikan ekstrak heksana <i>P. pulcher</i>	144
3.5.3 Kesan ketoksikan ekstrak kloroform <i>P. pulcher</i>	147
3.5.4 Kesan ketoksikan ekstrak metanol <i>P. pulcher</i>	150
3.5.5 Kesan ketoksikan kawalan positif (Kalium dikromat)	153

3.5.6 Perbandingan keseluruhan ketoksikan sampel	156
<b>4.0 PERBINCANGAN</b>	<b>159</b>
<b>5.0 RUMUSAN DAN CADANGAN</b>	<b>192</b>
5.1 Rumusan dan kesimpulan	192
5.2 Cadangan	194
<b>RUJUKAN</b>	<b>196</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>233</b>

## SENARAI JADUAL

<b>Jadual 2.1</b> : Senarai penyediaan bahan untuk ujian sitotoksisiti.	47
<b>Jadual 2.2</b> : Larutan stok dan bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis RNA dan DNA.	64
<b>Jadual 2.3</b> : Jujukan-jujukan pencetus dan anggaran saiz produk PCR.	67
<b>Jadual 3.1</b> : Kesan sitotoksik ekstrak <i>Phyllanthus pulcher</i> terhadap sel-sel kanser berbeza. Nilai $EC_{50}$ dengan huruf yang sama (a,b,c,...) adalah tidak berbeza secara signifikan ( $p<0.05$ ) antara sampel.	81
<b>Jadual 3.2</b> : Kesan sitotoksik vinkristin sulfat terhadap sel-sel kanser berbeza. Nilai $EC_{50}$ dengan huruf yang sama (a,b,c,...) adalah tidak berbeza secara signifikan ( $p<0.05$ ) antara sampel.	85
<b>Jadual 3.3</b> : Warna dan Rf bagi kombinasi fraksi ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> .	89
<b>Jadual 3.4</b> : Kesan sitotoksik fraksi 1-20 ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> terhadap sel HepG2. Nilai $EC_{50}$ dengan huruf yang sama (a,b,c,...) adalah tidak berbeza secara signifikan ( $p<0.05$ ) antara sampel.	99
<b>Jadual 3.5</b> : Keputusan penskrinan monoterpenoid ekstrak heksana <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut benzena : kloroform, 1 : 1.	102
<b>Jadual 3.6</b> : Keputusan penskrinan monoterpenoid ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut benzena : kloroform, 1 : 1.	103
<b>Jadual 3.7</b> : Keputusan penskrinan monoterpenoid ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut benzena : kloroform, 1 : 1.	104
<b>Jadual 3.8</b> : Keputusan penskrinan monoterpenoid ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut kloroform : etil asetat, 8 : 2.	105
<b>Jadual 3.9</b> : Keputusan penskrinan diterpenoid ekstrak heksana <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut heksana : etil asetat, 17 : 3.	109
<b>Jadual 3.10</b> : Keputusan penskrinan diterpenoid ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut heksana : etil asetat, 17 : 3.	110

<b>Jadual 3.11</b> : Keputusan penskrinan diterpenoid ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut heksana : etil asetat, 17 : 3.	111
<b>Jadual 3.12</b> : Keputusan penskrinan diterpenoid ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut kloroform : etil asetat, 8 : 2.	112
<b>Jadual 3.13</b> : Keputusan penskrinan triterpenoid ekstrak heksana <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut heksana : etil asetat, 1 : 1.	116
<b>Jadual 3.14</b> : Keputusan penskrinan triterpenoid ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut heksana : etil asetat, 1 : 1.	117
<b>Jadual 3.15</b> : Keputusan penskrinan triterpenoid ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut heksana : etil asetat, 1 : 1.	118
<b>Jadual 3.16</b> : Keputusan penskrinan triterpenoid ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis sistem pelarut kloroform : etil asetat, 8 : 2.	119
<b>Jadual 3.17</b> : Kandungan saponin dalam ekstrak tumbuhan <i>Phyllanthus pulcher</i> .	123
<b>Jadual 3.18</b> : Kandungan alkaloid dalam ekstrak tumbuhan <i>Phyllanthus pulcher</i> .	123
<b>Jadual 3.19</b> : Keputusan penskrinan alkaloid ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> .	125
<b>Jadual 3.20</b> : Keputusan penskrinan tanin ekstrak heksana, kloroform dan metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> .	125
<b>Jadual 3.21</b> : Komponen flavonoid dalam ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> .	125
<b>Jadual 3.22</b> : Keadaan optimum PCR untuk amplifikasi gen $\beta$ -actin, caspase-3 dan p53.	136
<b>Jadual 3.23</b> : Kematian bilangan nauplii selepas 6 jam dan 24 jam ekstrak heksana <i>Phyllanthus pulcher</i> .	145
<b>Jadual 3.24</b> : Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 6 jam ekstrak heksana <i>Phyllanthus pulcher</i> .	146
<b>Jadual 3.25</b> : Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 24 jam ekstrak heksana <i>Phyllanthus pulcher</i> .	146

<b>Jadual 3.26:</b> Kematian bilangan nauplii selepas 6 jam dan 24 jam ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> .	148
<b>Jadual 3.27 :</b> Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 6 jam ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> .	149
<b>Jadual 3.28 :</b> Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 24 jam ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> .	149
<b>Jadual 3.29 :</b> Kematian bilangan nauplii selepas 6 jam dan 24 jam ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> .	151
<b>Jadual 3.30 :</b> Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 6 jam ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> .	152
<b>Jadual 3.31 :</b> Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 24 jam ekstrak metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> .	152
<b>Jadual 3.32 :</b> Kematian bilangan nauplii selepas 6 jam dan 24 jam Kalium dikromat.	154
<b>Jadual 3.33 :</b> Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 6 jam Kalium dikromat.	155
<b>Jadual 3.34 :</b> Nilai kumulatif dan peratus kematian nauplii selepas 24 jam Kalium dikromat.	155
<b>Jadual 3.35 :</b> Perbandingan kesan ketoksikan ekstrak <i>Phyllanthus pulcher</i> dan Kalium dikromat. Nilai LC <sub>50</sub> dengan huruf yang sama (a,b,c,...) adalah tidak berbeza secara signifikan ( $p < 0.05$ ) antara sampel.	158

## SENARAI RAJAH

<b>Rajah 1.1 :</b> Tumbuhan <i>Phyllanthus pulcher</i> .	5
<b>Rajah 2.1 :</b> Carta alir kaedah penentuan kesan sitotoksik ekstrak <i>Phyllanthus pulcher</i> terhadap sel kanser.	37
<b>Rajah 3.1 :</b> Kesan sitotoksik ekstrak heksana ( $EC_{50}$ 4.046 $\mu\text{g/ml}$ ), kloroform ( $EC_{50}$ 0.919 $\mu\text{g/ml}$ ) dan metanol ( $EC_{50}$ 20.433 $\mu\text{g/ml}$ ) terhadap sel HepG2.	74
<b>Rajah 3.2 :</b> Kesan sitotoksik ekstrak heksana ( $EC_{50}$ 8.712 $\mu\text{g/ml}$ ), kloroform ( $EC_{50}$ 18.098 $\mu\text{g/ml}$ ) dan metanol ( $EC_{50}$ 35.278 $\mu\text{g/ml}$ ) terhadap sel Caov-3.	74
<b>Rajah 3.3 :</b> Kesan sitotoksik ekstrak heksana ( $EC_{50}$ 35.023 $\mu\text{g/ml}$ ), kloroform ( $EC_{50}$ 22.799 $\mu\text{g/ml}$ ) dan metanol ( $EC_{50}$ 15.605 $\mu\text{g/ml}$ ) terhadap sel COLO205.	74
<b>Rajah 3.4 :</b> Kesan sitotoksik ekstrak heksana ( $EC_{50}$ 8.091 $\mu\text{g/ml}$ ), kloroform ( $EC_{50}$ 13.149 $\mu\text{g/ml}$ ) dan metanol ( $EC_{50}$ 26.985 $\mu\text{g/ml}$ ) terhadap sel NCI-H23.	76
<b>Rajah 3.5 :</b> Kesan sitotoksik ekstrak heksana ( $EC_{50}$ 5.315 $\mu\text{g/ml}$ ), kloroform ( $EC_{50}$ T.D.) dan metanol ( $EC_{50}$ 5.326 $\mu\text{g/ml}$ ) terhadap sel T47-D.	76
<b>Rajah 3.6 :</b> Kesan sitotoksik ekstrak kloroform pada 24 jam ( $EC_{50}$ 94.724 $\mu\text{g/ml}$ ), 48 jam ( $EC_{50}$ 88.745 $\mu\text{g/ml}$ ) dan 72 jam ( $EC_{50}$ 0.919 $\mu\text{g/ml}$ ) terhadap sel HepG2.	79
<b>Rajah 3.7 :</b> Kesan sitotoksik vinkristin sulfat terhadap sel HepG2 ( $EC_{50}$ 0.140 $\mu\text{g/ml}$ ).	83
<b>Rajah 3.8 :</b> Kesan sitotoksik vinkristin terhadap sel Caov-3 ( $EC_{50}$ 0.192 $\mu\text{g/ml}$ ).	83
<b>Rajah 3.9 :</b> Kesan sitotoksik vinkristin terhadap sel COLO-205 ( $EC_{50}$ 0.144 $\mu\text{g/ml}$ ).	83
<b>Rajah 3.10 :</b> Kesan sitotoksik vinkristin sulfat terhadap sel NCI-H23 ( $EC_{50}$ 4.520 $\mu\text{g/ml}$ ).	84
<b>Rajah 3.11 :</b> Kesan sitotoksik vinkristin sulfat terhadap sel T-47D ( $EC_{50}$ 0.098 $\mu\text{g/ml}$ ).	84
<b>Rajah 3.12 :</b> Plat kromatografi ekstrak kloroform <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan sistem pelarut kloroform : etil asetat (8:2).	91
<b>Rajah 3.13 :</b> Kesan sitotoksik fraksi 1 terhadap sel HepG2 ( $EC_{50}$ 93.236 $\mu\text{g/ml}$ ).	91

<b>Rajah 3.14</b> : Kesan sitotoksik fraksi 2 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 88.520 µg/ml).	91
<b>Rajah 3.15</b> : Kesan sitotoksik fraksi 3 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 93.340 µg/ml).	91
<b>Rajah 3.16</b> : Kesan sitotoksik fraksi 4 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 11.069 µg/ml).	92
<b>Rajah 3.17</b> : Kesan sitotoksik fraksi 5 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 4.117 µg/ml).	92
<b>Rajah 3.18</b> : Kesan sitotoksik fraksi 6 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 14.321 µg/ml).	92
<b>Rajah 3.19</b> : Kesan sitotoksik fraksi 7 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 7.638 µg/ml).	93
<b>Rajah 3.20</b> : Kesan sitotoksik fraksi 8 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 11.570 µg/ml).	93
<b>Rajah 3.21</b> : Kesan sitotoksik fraksi 9 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 9.441 µg/ml).	93
<b>Rajah 3.22</b> : Kesan sitotoksik fraksi 10 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 5.218 µg/ml).	94
<b>Rajah 3.23</b> : Kesan sitotoksik fraksi 11 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 10.379 µg/ml).	94
<b>Rajah 3.24</b> : Kesan sitotoksik fraksi 12 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 26.015 µg/ml).	94
<b>Rajah 3.25</b> : Kesan sitotoksik fraksi 13 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 24.345 µg/ml).	95
<b>Rajah 3.26</b> : Kesan sitotoksik fraksi 14 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 8.442 µg/ml).	95
<b>Rajah 3.27</b> : Kesan sitotoksik fraksi 15 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 18.161 µg/ml).	95
<b>Rajah 3.28</b> : Kesan sitotoksik fraksi 16 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 23.230 µg/ml).	96
<b>Rajah 3.29</b> : Kesan sitotoksik fraksi 17 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 4.196 µg/ml).	96
<b>Rajah 3.30</b> : Kesan sitotoksik fraksi 18 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 4.887 µg/ml).	96
<b>Rajah 3.31</b> : Kesan sitotoksik fraksi 19 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 18.129 µg/ml).	97
<b>Rajah 3.32</b> : Kesan sitotoksik fraksi 20 terhadap HepG2 (EC <sub>50</sub> 6.485 µg/ml).	97
<b>Rajah 3.33</b> : Plat kromatografi ekstrak heksana, kloroform dan metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan sistem pelarut benzena : kloroform (1:1) untuk pengesanan monoterpenoid. a: ekstrak heksana; b: ekstrak kloroform; c: ekstrak metanol	106
<b>Rajah 3.34</b> : Plat kromatografi pengesanan monoterpenoid ekstrak heksana, kloroform dan metanol <i>Phyllanthus pulcher</i> menggunakan sistem pelarut benzena :kloroform (1:1) selepas ujian vanillin. a: ekstrak heksana; b: ekstrak kloroform; c: ekstrak metanol	106

- Rajah 3.35** : Plat kromatografi ekstrak pengesanan monoterpenoid ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut kloroform : etil asetat (8:2) selepas ujian Vanillin. 107
- Rajah 3.36** : Plat kromatografi ekstrak heksana, kloroform dan metanol *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut heksana : etil asetat (17:3) untuk pengesanan diterpenoid. a: ekstrak heksana; b: ekstrak kloroform; c: ekstrak metanol 113
- Rajah 3.37** : Plat kromatografi pengesanan diterpenoid ekstrak heksana, kloroform dan metanol *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut heksana : etil asetat (17:3) selepas tindakan 50%. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. a: ekstrak heksana; b: ekstrak kloroform; c: ekstrak metanol 113
- Rajah 3.38** : Plat kromatografi ekstrak pengesanan diterpenoid ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut kloroform : etil asetat (8:2) selepas tindakan 50%. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. 114
- Rajah 3.39** : Plat kromatografi ekstrak heksana, kloroform dan metanol *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut heksana : etil asetat (1:1) untuk pengesanan triterpenoid. a: ekstrak heksana; b: ekstrak kloroform; c: ekstrak metanol 120
- Rajah 3.40** : Plat kromatografi pengesanan triterpenoid ekstrak heksana, kloroform dan metanol *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut heksana : etil asetat (1:1) selepas tindakan 20%. SBCl<sub>3</sub> . a: ekstrak heksana; b: ekstrak kloroform; c: ekstrak metanol 120
- Rajah 3.41** : Plat kromatografi ekstrak pengesanan triterpenoid ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* menggunakan sistem pelarut kloroform : etil asetat (8:2) selepas tindakan 20%. SBCl<sub>3</sub> 121
- Rajah 3.42** : Sel HepG2 yang dirawat dengan ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher*. Sel dirawat dengan 0.919 µg/ml ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* untuk 24 jam dan menggunakan asai Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™. Sel apoptotik ditunjukkan dengan anak panah. Magnifikasi imej pada 100 X. 127
- Rajah 3.43** : Sel HepG2 yang dirawat dengan ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher*. Sel dirawat dengan 0.919 µg/ml ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* untuk 24 jam dan menggunakan asai Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™. Sel apoptotik ditunjukkan dengan anak panah. Magnifikasi imej pada 400 X. 127

- Rajah 3.44** : Sel HepG2 yang dirawat dengan DNase I. Sel dirawat dengan 1 U/ml DNase I untuk 24 jam dan menggunakan asai Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™. Sel apoptotik ditunjukkan dengan anak panah. Magnifikasi imej pada 100 X. 127
- Rajah 3.45** : Sel HepG2 yang dirawat dengan DNase I. Sel dirawat dengan 1 U/ml DNase I untuk 24 jam dan menggunakan asai Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™. Sel apoptotik ditunjukkan dengan anak panah. Magnifikasi imej pada 400 X. 128
- Rajah 3.46** : Sel HepG2 yang dirawat dengan DMSO. Sel dirawat dengan 1% (i/i) DMSO untuk 24 jam dan menggunakan asai Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd™. Magnifikasi imej pada 200 X. 128
- Rajah 3.47** : Graf menunjukkan nilai penyerapan (450nm) terhadap masa Fragmentasi DNA Sel secara ELISA ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* dan DNase. Kehadiran apoptosis sel HepG2 dikesan akibat rawatan ekstrak kloroform *P. pulcher* dan DNase bersandarkan masa. 132
- Rajah 3.48** : Elektroforesis gel formaldehid agarosa 1% RNA yang diekstrak daripada sel HepG2 yang dirawat oleh 0.919 µg/ml ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* selepas 1: 0 jam; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 1 jam; 5: 3 jam; 6: 6 jam; 7: 9 jam; 8: 12 jam; 9: 18 jam dan 10: 24 jam. Anak panah menunjukkan kehadiran dua jalur rRNA 28S dan 18S. 134
- Rajah 3.49** : Elektroforesis gel agarosa pengekspresan mRNA β-actin sel turunan hepatoselular manusia, HepG2 dengan kehadiran medium sahaja (kawalan) atau kehadiran ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* untuk sela masa tertentu sebagai kawalan integriti dalaman dan amaun cDNA yang sama diguna untuk setiap tindakbalas PCR. M: Penanda DNA 1 kb; 1: 0 jam; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 1 jam; 5: 3 jam; 6: 6 jam; 7: 9 jam; 8: 12 jam; 9: 18 jam; 10: 24 jam; K: kawalan 139
- Rajah 3.50** : Elektroforesis gel agarosa pengekspresan mRNA caspase-3 sel turunan hepatoselular manusia, HepG2 dengan kehadiran medium sahaja (kawalan) atau kehadiran ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* untuk sela masa tertentu. M: Penanda DNA 1 kb ; 1: 0 jam; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 1 jam; 5: 3 jam; 6: 6 jam; 7: 9 jam; 8: 12 jam; 9: 18 jam; 10: 24 jam; K: kawalan 140
- Rajah 3.51** : Elektroforesis gel agarosa pengekspresan mRNA p53 sel turunan hepatoselular manusia, HepG2 dengan kehadiran medium sahaja (kawalan) atau kehadiran ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* untuk sela masa tertentu. M: Penanda DNA 1 kb ; 1: 0 jam; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 1 jam; 5: 3 jam; 6: 6 jam; 7: 9 jam;

8: 12 jam; 9: 18 jam; 10: 24 jam; K: kawalan 141

**Rajah 3.52** : Pengekspresan gen caspase-3 yang dirawat ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* dalam tempoh 24 jam menggunakan imbasan densitometrik. Nilai mewakili nisbah produk RT-PCR gen caspase-3 kepada  $\beta$ -actin. 1: 0 jam; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 1 jam; 5: 3 jam; 6: 6 jam; 7: 9 jam; 8: 12 jam; 9: 18 jam; 10: 24 jam; K: kawalan 142

**Rajah 3.53** : Pengekspresan gen p53 yang dirawat ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* dalam tempoh 24 jam menggunakan imbasan densitometrik. Nilai mewakili nisbah produk RT-PCR gen p53 kepada  $\beta$ -actin. 1: 0 jam; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 1 jam; 5: 3 jam; 6: 6 jam; 7: 9 jam; 8: 12 jam; 9: 18 jam; 10: 24 jam. 143

## SENARAI SINGKATAN

Apaf-1	protease pengaktif apoptotik faktor-1
ATCC	American Type Culture Collection
Bak	pembunuh antagonis homolog Bcl-2
Bax	protein X berkaitan Bcl-2
BAW	n-butanol: asid asetik: air
Bcl-2	sel B limfoma 2
BCP	bromokloropropana
BRCA 1	kanser payudara, Jenis 1
BRCA 2	kanser payudara, peringkat awal
BrdU	5'-bromo-2'-deoksi-uridina
b/i	berat kepada isipadu
C	celcius
Caov-3	sel adenokarsinoma ovari manusia
caspase	protease spesifik aspartat berdasarkan sistiena
cDNA	asid deoksiribonukleik komplimentari
CHCl <sub>3</sub>	kloroform
CH <sub>3</sub> COOH	asid asetik
COLO205	sel adenokarsinoma kolorektum manusia
CO <sub>2</sub>	karbon dioksida
DAB	larutan kromogenik diaminobenzidina
DMEM	Medium Ubahsuai Dulbecco Eagle
DMSO	dimetisulfoksida
DNA	asid deoksiribonukleik
DNase	deoksiribonuklease
EBSS	Larutan Garam Seimbang Earle
EC <sub>50</sub>	nilai jangkaan kepekatan ekstrak yang dapat membunuh 50%
ED <sub>50</sub>	nilai jangkaan dos yang dapat membunuh 50%
EDTA	asid etilendiaminatetrasetik
ELISA	asai imuno-penyerapan-enzim fotometrik
FasL	ligan Fas
FCS	serum anak lembu
g	gram
GF	faktor pertumbuhan
HCL	asid hidroklorik
HEPES	asid N-2 hidroksietipiperazin-N'-2-etanasulfonik
HepG2	sel karsinoma hepatoselular manusia
Hg <sub>2</sub> Cl	merkurik (II) klorida
HRP	horseradish peroksidase
i/i	isipadu kepada isipadu
kb	kilo bes
kDa	kilo Dalton
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	kalium dikromat
KI	kalium iodida
LC <sub>50</sub>	nilai kepekatan ekstrak yang dapat membunuh 50%
M	molar
MBA	Asai Metilina Biru
MEM	Medium Eagle Minimum Perlu

mg	miligram
MgSO <sub>4</sub>	magnesium sulfat
ml	mililiter
MMLV	Virus Leukemia Murin Moloney
MOPS	asid 3-(N-morfolino) profanilsulfonik
mRNA	asid ribonukleik pesanan
NCI	Institut Kanser Nasional
NCI-H23	sel adenokarsinoma paru-paru manusia
NH <sub>4</sub> OH	ammonium hidroksida
nm	nanometer
OD	ketumpatan optik
PBS	garan penimbal fosfat
PCR	tindakbalase berantai polimerase
PDGF	faktor pertumbuhan terbitan platlet
Rf	relatif pergerakan
RNA	asid ribonukleik
RNase	ribonuklease
RPMI	Medium Rosewell Park Memorial Institute
RT-PCR	PCR transkriptase berbalik
SDS	sodium dodesil fosfat
SSC	sodium sitrat piawai
TBE	tris borat EDTA
TdT	deoksinukleotidil transferase terminal
TGF	faktor pertumbuhan terubah
TNF	reseptor faktor nekrosis tumor
T-47D	sel kalenjar mamari payudara karsinoma manusia
T25	piring kultur steril 25 cm <sup>3</sup>
T75	piring kultur steril 75 cm <sup>3</sup>
UV	ultra ungu
µg	mikrogram
%	peratus

## ABSTRAK

Kajian *in vitro* penyaringan aktiviti antikanser ekstrak tumbuhan *Phyllanthus pulcher* dilakukan. Aktiviti sitotoksik ekstrak heksana, kloroform dan metanol *P. pulcher* terhadap turunan sel HepG2 (sel karsinoma hepatoselular manusia), Caov-3 (sel adenokarsinoma ovari manusia), COLO205 (sel adenokarsinoma kolorektum manusia), NCI-H23 (sel adenokarsinoma paru-paru manusia) dan T-47D (sel karsinoma kalenjar mamari payudara manusia), dinilai menggunakan asai metilina biru (MBA). Kesemua ekstrak menunjukkan perencatan sel bersandarkan dos kecuali ekstrak kloroform terhadap sel T-47D. Ekstrak kloroform *P. pulcher* menunjukkan kesan perencatan terbaik terhadap sel HepG2 dengan nilai  $EC_{50}$  0.919  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak kloroform difraksinasi menghasilkan 20 fraksi dan fraksi F5 menunjukkan kesan perencatan terbaik terhadap sel HepG2 dengan nilai  $EC_{50}$  4.117  $\mu\text{g/ml}$ . Nilai ini lebih tinggi daripada ekstrak kasar. Kemudian, mekanisme kematian sel HepG2 oleh ekstrak kloroform *P. pulcher* ditentukan sama ada melalui apoptosis atau nekrosis menggunakan kaedah Sistem Pengesanan Apoptosis Kolorimetrik DeadEnd, Sistem Pengesanan Apoptosis Fragmentasi Sel DNA Secara ELISA dan pengekspresan gen apoptosis melalui tindakbalas berantai polimerase-transkripsi berbalik (RT-PCR). Sel didapati mati melalui apoptosis berdasarkan kaedah tersebut serta gen caspase-3 dan p53 diekspreskan pada tahap maksimum selepas 9 jam dan 30 minit masing-masing dengan ujian ekstrak. Penyaringan fitokimia sebatian utama dilakukan di mana ekstrak kloroform *P. pulcher* didapati mengandungi saponin dan terpenoid iaitu monoterpenoid, diterpenoid dan triterpenoid. Ekstrak kloroform *P. pulcher* mengandungi paling banyak triterpenoid manakala tiada alkaloid, flavonoid dan tanin dikesan pada ekstrak tersebut. Kesan ketoksikan ekstrak *P. pulcher* juga dinilai

menggunakan asai udang kecil air masin *Artemia salina*. Didapati ketiga-tiga ekstrak heksana, kloroform dan metanol adalah tidak toksik dengan nilai  $LC_{50}$  melebihi 3 dan 1 mg/ml masing-masing bagi kedua-dua ketoksikan akut dan kronik. Ekstrak kloroform *P. pulcher* menunjukkan nilai ketoksikan akut dengan nilai  $LC_{50}$  3.981 mg/ml manakala toksisiti kronik dengan nilai  $LC_{50}$  1.563 mg/ml. Kesimpulannya, ekstrak kloroform *P. pulcher* mengandungi sebatian bioaktif tertentu yang mempunyai aktiviti antikanser dengan ketoksikan yang rendah dan mengaruh kematian sel secara apoptosis di mana kajian lebih lanjut boleh dilakukan untuk menjadikannya sebagai agen antikanser terhadap kanser hati

**TITLE : CYTOTOXICITY AND CELL DEATH MECHANISMS OF  
*PHYLLANTHUS PULCHER* EXTRACTS ON VARIOUS CANCER  
CELL LINES**

**ABSTRACT**

An *in vitro* anticancer screening of hexane, chloroform and methanol extracts of *Phyllanthus pulcher* extracts were tested against various cell lines, i.e. HepG2 (human hepatocellular carcinoma), Caov-3 (human ovarian adenocarcinoma), COLO205 (human colorectal adenocarcinoma), NCI-H23 (human lung adenocarcinoma) and T-47D (human breast ductal carcinoma) cell lines. Cell survival was determined by Methylene blue assay (MBA). All plant extracts inhibited cell growth in a concentration-dependent manner except chloroform extract against T-47D cell line. The chloroform extract of *P. pulcher* appeared to be the most potent with EC<sub>50</sub> value of 0.919 µg/ml. The extract was subjected to fractionation and from the 20 fractions obtained, fraction 5 was considered as the most potent fraction with EC<sub>50</sub> value of 4.117 µg/ml against HepG2 cell line, although the EC<sub>50</sub> value is higher than the crude chloroform extract. Cell death mechanism (apoptosis) of *P. pulcher* chloroform extract was confirmed through DeadEnd Colorimetric Apoptosis Detection System, Cellular DNA Fragmentation ELISA and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Caspase-3 and p53 mRNA expression were up-regulated and reached a maximum level at 9 hours and 30 minutes respectively. The phytochemical evaluation of *P. pulcher* was conducted. The chloroform extract of *P. pulcher* contains saponin and terpenoid (monoterpenoid, diterpenoid and triterpenoid) which

is triterpenoid was mostly detected, while no flavonoid, alkaloid or tannin was detected. The toxicity of hexane, chloroform and methanol were observed by general toxicity against brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay. All extract were relatively non-toxic to brine shrimp with LC<sub>50</sub> value >3 mg/ml and >1 mg/ml for the acute and chronic toxicity respectively. LC<sub>50</sub> values of the chloroform extract were 3.981 mg/ml for acute toxicity and 1.563 mg/ml for chronic toxicity. In conclusion, data from the study indicates that the chloroform extract of *P. pulcher* contains bioactive non-toxic compound that could induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma and more research can be conducted to make it applicable as chemotherapeutic agent for cancer treatment.

## **BAB 1: PENGENALAN**

### **1.1 Perubatan herba dan kanser**

Lapan puluh peratus penduduk dunia terutamanya di negara-negara yang sedang membangun dan juga negara mundur kurang berpeluang atau tidak dapat menggunakan ubat-ubatan moden kerana kosnya yang tinggi (Akerele, 1993). Perubatan moden memiliki kekuatan tertentu dan juga batas tertentu (Izuddin, 2001). Di Malaysia terdapat empat kumpulan utama perubatan tradisional iaitu perubatan tradisional Melayu, India, Cina dan Barat di mana setiap kumpulan biasanya menggunakan sumber herba tersendiri. Malaysia sebagai salah sebuah daripada 12 negara yang diiktiraf sebagai kaya dengan pelbagai sumber tumbuhan dengan 185 000 spesies fauna, 12 500 spesies tumbuhan berbunga dan 1 100 spesies paku-pakis berupaya untuk membangunkan sumber kekayaan ini untuk industri biofarmaseutikalnya (Abdul Majid, 2003). Lebih kurang 1 200 spesies iaitu 8% daripada tumbuhan di negara ini dikatakan mempunyai nilai perubatan dan telah digunakan sejak turun temurun sebagai ramuan di dalam penyediaan ubat herba tradisional (Soepadmo, 1999). Daripada jumlah tersebut terlalu sedikit digunakan dalam industri pemprosesan produk tempatan.

Walaupun perubatan tradisional dikenali sebagai sebahagian program penjagaan kesihatan utama (WHO, 1978), ekstrak kasar perlu dinilai secara saintifik dari segi kandungan farmakodinamik dan perubatan, kegunaan klinikal dan potensi toksikologi (Kyerematen & Ogunlana, 1987). Objektif penskrinan tumbuhan ialah untuk mencari ubat baru, mendapatkan molekul penanda (kebiasaannya bahan kimia

novel) yang boleh diubahsuai secara kimia kepada komponen bioaktif baru dan menyediakan rasional kepada penggunaan klinikal (Dhawan, 1991). Perkembangan farmaseutikal pada peringkat awal bergantung pada perolehan drug daripada sumber tumbuhan. Kegunaan drug dari sumber tumbuhan sehingga kini masih lagi relevan kerana dianggarkan bahawa tidak kurang 3 bilion penduduk dunia masih lagi menggunakan ubat herba dalam rawatan penjagaan kesihatan utama dan dianggarkan kira-kira 25% daripada drug yang terdapat dalam pasaran mengandungi bahan aktif yang pada mulanya dipencilkan daripada tumbuhan (Abdul Majid, 2003).

Dalam kajian makmal ke atas haiwan, didapati bahawa wujud kandungan tertentu daripada tumbuhan tradisional ini yang dapat menyekat pertumbuhan kanser. Ini mungkin disebabkan peranan bahan aktif daripada tumbuhan ini terhadap sistem enzim yang wujud dalam sel-sel badan kita yang dikenali sebagai sistem oksidasi fungsi bercampur (Hausman, 1987). Teori ini menyatakan bahawa sistem enzim tersebut mempunyai kuasa untuk menghapuskan tindakan kimia yang merbahaya daripada kesan kanser. Kajian saintifik menunjukkan banyak tumbuhan perubatan tradisional Melayu menunjukkan aktiviti antikanser (Hun, 2000). Antara tumbuhan yang telah dikaji dan dikenalpasti mempunyai aktiviti antikanser ialah *Allium sativum* (bawang putih), *Aloe vera* (lidah buaya), *Alpinia galanga* (lengkuas), *Andrographis paniculata* (hempedu bumi), *Annona squamosa* (nona), *Cassia alata* (gelenggang besar), *Cassia fistula* (pokok kasia), *Cucurbita moschata* (labu), *Curcuma domestica* (kunyit), *Morinda citrifolia* (mengkudu), *Hydrocotyle asiatica* (pegaga) dan *Catharanthus roseus* (kemunting cina) (Hun, 2000). Umpamanya tumbuhan *Eurycoma longifolia* dilaporkan mempunyai kesan sitotoksik pada semua turunan sel manusia dan murin dengan ED<sub>50</sub> 2.0-12.0 µg/ml (Kinghorn, 1993). Selain itu,

beberapa tumbuhan telah digunakan untuk merawat kanser seperti akar susun kelapa (*Tabernaemontana divaricata*), akar melur (*Jasminum sambac*), bunga raya putih (*Hibiscus rosa-sinensis*) dan ubi bembun (*Marantha arundinaceae*) (Zakaria & Muhammad, 1994). Menurut Hoffman (1999), tumbuhan daripada famili Euphorbiaceae yang dilaporkan dari seluruh dunia mengandungi aktiviti antikanser termasuklah *Acalypha indica*, *Aleurites moluccana*, *Chamaesyce hypericifolia*, *Euphorbia* sp., *Hippomane mancinella*, *Jatropha* sp., *Manihot esculenta*, *Mercurialis annua*, *Stillingia sulvatica* dan *Ricinus communis*.

Penemuan vinkristin dan vinblastin daripada *Catharanthus roseus* sebagai agen antitumor secara klinikal pada tahun 1960 telah memangkinkan Institut Kanser Nasional, Amerika Syarikat melakukan penskrinan ekstrak tumbuhan untuk aktiviti antikanser (Johnson, 1982). Di bawah Program Kemoterapi Kanser Nasional, 120 000 jenis tumbuhan yang terdiri daripada 35 000 spesies berbeza diuji (Frei, 1982). Sejak 1986, Institut Kanser Nasional mengadakan program produk semulajadi baru iaitu kira-kira 1 500 sampel tumbuhan dikutip setiap tahun daripada wilayah tropika dan subtropika di Afrika, Madagascar, selatan dan tengah Amerika dan Asia Tenggara di mana pada tahun 1991 hampir 29 000 sampel digunakan untuk pemilihan sitotoksiti terhadap turunan sel sebagai kriteria utama menggunakan ekstrak tumbuhan untuk fraksinasi fitokimia (Crag *et al.*, 1993). Institut Kanser Nasional, Amerika Syarikat menggunakan tikus leukemia 3PS (P388) (aruhan metilkolantrina) secara *in vivo* dan 9KB (sel karsinoma nasofarinks manusia) secara *in vitro* untuk menguji kesan sitotoksiti ekstrak tumbuhan terhadap sel kanser (Rahman *et al.*, 2001).

### 1.1.1 Tumbuhan *Phyllanthus pulcher*

*Phyllanthus* merupakan tumbuhan divisi Spermatophyta, kelas Angiosperma yang tergolong dalam subkelas Dicotyledoneae, order Euphorbiales yang merupakan genus dalam famili Euphorbiaceae, subfamili Phyllanthoideae dan tribus Phyllanthae (Hsuan Keng, 1986). Di Malaysia *Phyllanthus pulcher* dikenali Kelurut Tanjong, Naga Buana dan Semelit Patong; di Thailand Kaang Plaa, Trueng Baa Daan dan Waan Thoraanee Saan. *P. pulcher* didapati di Myanmar, Indo-China hingga Thailand, Semenanjung Malaysia, Sumatera, Borneo, Jawa dan kepulauan Sunda. Selain itu, ia juga ditanam di Sri Lanka, Tanzania dan barat India. *P. pulcher* merupakan pohon rendah monoecious yang boleh mencapai ketinggian hingga 1.5 meter (Rajah 1.1). Ia mempunyai dahan phyllantoid. Bentuk daun adalah oblong ke eliptikal atau ovat-eliptikal, bersaiz 18-28 mm x 8-14 mm, asimetri, petiolat kecil, stipul berulang-ulang dan lanseolat segitiga (Padua *et al.*, 1999). *P. pulcher* boleh ditemui di kawasan hutan yang lama dibersihkan, atau sebagai rumpai di kebun buah-buahan dan tebing sungai. Tumbuhan ini boleh juga ditemui hidup di hutan malar hijau sehingga altitud 700 m (Padua *et al.*, 1999).



**Rajah 1.1** : Tumbuhan *Phyllanthus pulcher*.

Di Semenanjung Malaysia, air rebusan *P. pulcher* diminum untuk mengurangkan sakit perut dan juga sebagai pencuci mata. Ia juga diguna dengan menuam kepada kulit untuk merawat bisul, bisul gusi dan bengkak-bengkak, kepada hidung untuk merawat ulser, pada abdomen untuk demam dan masalah buah pinggang kepada kanak-kanak. Daun tumbuhan ini digunakan pada gusi untuk merawat sakit gigi. Selain digunakan untuk perubatan, ia juga ditanam sebagai tumbuhan hiasan (Padua *et al.*, 1999).

## **1.2 Fitokimia dan kanser**

Fitokimia atau kimia tumbuhan mengaitkan pelbagai jenis sebatian organik yang dihasilkan oleh tumbuhan dan berkisar kepada struktur kimia bahan atau sebatian pembiosintesisan, metabolisme, taburan semulajadi dan fungsi biologi tumbuhan. Penghasilan metabolit bagi organisma hidup dibahagikan kepada metabolit primer dan metabolit sekunder. Kebanyakan sebatian dalam tumbuhan yang ditemui berguna dalam perubatan merupakan bahan metabolit sekunder (Harborne, 1998). Sesuatu bahan dianggap sebagai metabolit primer sekiranya ia mengambil bahagian secara terus dalam lintasan metabolisme dan fotosintesis. Ini termasuklah asid amino dan protein. Metabolit sekunder pula tidak mempunyai fungsi yang tertentu dalam tumbuhan. Ia termasuklah pigmen berwarna, bahan racun (untuk pertahanan), bahan berbau dan harum yang dirembeskan. Sebatian metabolit sekunder ini terdapat dalam kelas alkaloid, fenol, terpenoid dan sebagainya. Penskrinan fitokimia merupakan salah satu kaedah tradisional memilih tumbuhan untuk kajian lebih lanjut (Said *et al.*, 1993).

Terdapat pelbagai kelas bahan metabolit sekunder dalam tumbuhan yang ditemui membunuh sel kanser atau dikenali sebagai agen sitotoksik (Kinghorn, 1993). Agen kemoterapi yang diperolehi daripada tumbuhan dan digunakan secara komersil termasuklah vinkristin, vinblastin, vindesin, etoposida, teniposida, paclitaxel, docetaxel, irinotecan dan topotecan (Olver, 1998). Vinblastin dan vinkristin merupakan sebatian metabolit dalam kelas alkaloid yang dipencilkan daripada *Catharanthus roseus*. Alkaloid daripada tumbuhan *Stephania tetrandra* iaitu tetrandrin mempunyai kesan antiproliferatif terhadap turunan sel hepatoma manusia (HepG2) (Yoo *et al.*, 2002).

Aktiviti antitumor diterpin banyak dilaporkan (Calabrese & Chabner, 1995). Diterpin iaitu Taxol (Paklitaxel) dipencilkan daripada batang *Taxus brevifolia* merupakan sumber semulajadi utama agen antikanser yang menunjukkan aktiviti terhadap beberapa jenis kanser yang rintang terhadap pelbagai drug (Lin, 2000). Diterpin jenis casban daripada *Agrostistachys hookeri* pula aktif terhadap sel leukemia limfasitik P-388 (Choi *et al.*, 1988). Diterpin kaurena dan B-sekokaurena daripada *Rhabdosia* sp. juga menunjukkan aktiviti sitotoksik dan antitumor (Alcaraz & Rios, 1991).

Fernandes *et al.* (2003), melaporkan aktiviti antitumor triterpin dalam spesies *Chrysobalanus icaco* dan *Licania tomentosa*. Pemencilan triterpin iaitu asid betulunik, oleanolik dan pomolik daripada tumbuhan tersebut menunjukkan perencatan pertumbuhan turunan sel eritroleukimia K562 dan Lucena 1. Aktiviti sitotoksik asid betulunik dan oleanolik terhadap beberapa jenis tumor secara *in vitro* dan *in vivo* telah dilaporkan (Tokuda *et al.*, 1986; Pisha *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997; Fulda *et al.*,

1999; Kim *et al.*, 2000). Asid betulitik juga dapat mengaruh apoptosis pada tumor neuroektodermal (Schmidt *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2001) dan juga menghalang pertumbuhan sel leukemia tikus (Noda *et al.*, 1997). Asid oleanolik pula dapat merencat angiogenesis (Noda *et al.*, 1997), pertumbuhan turunan sel secara *in vitro* (Kim *et al.*, 2000) dan tumor aruhan kimia atau pemindahan sel tumor (Tokuda *et al.*, 1986; Hsu *et al.*, 1997). Sitotoksisiti asid pomolik terhadap turunan sel melanoma dan karsinoma servik juga dilaporkan (Neto *et al.*, 2000). Triterpenoid iaitu asid ursolik dan asid oleanolik pada bunga *Ixora coccinea* pula dilaporkan mempunyai kesan menghalang pembentukan kanser kulit oleh 12-*O*-tetradekanoil phorbol-13-asetat (TPA) (Tokuda *et al.*, 1986). Seskuiterpin lakton iaitu krotipoksida daripada *Croton macrostachys* juga merupakan perencat tumor (Hoffmann, 1999).

Wagonin iaitu sejenis flavonoid yang diekstrak daripada *Scutellaria baicalensis* pula menunjukkan aktiviti antiproliferasi sel kanser serta menunjukkan kesan aktiviti mengaruh apoptosis terhadap sel karsinoma kolorektum (COLO205) dan karsinoma hepatoselular (SK-Hep) (Lee *et al.*, 2002c). Flavonoid iaitu wagonin, dan juga baicalein, apigenin, mirsetin dan fisetin pula menunjukkan kesan sitotoksik terhadap turunan sel leukemia manusia HL-60 (Lee *et al.*, 2002c). Menurut Hoffmann (1999), pula selain dari jenis flavonoid yang disebutkan di atas, terdapat beberapa sebatian fenolik yang lain yang juga menunjukkan aktiviti antikanser termasuklah terbitan asid sinnamik, asid p-hidroksisinnamik, asid o-hidroksisinnamik, asid kafeik dan asid ferulik. Flavonoid juga mampu merencat aktiviti beberapa enzim yang terlibat dalam pembentukan kanser termasuk lipoksigenase, siklooksigenase dan xanthine monoooksigenase (Hoult *et al.*, 1994; Hodnick *et al.*, 1994; Siess *et al.*, 1995).

### **1.3 Kajian sitotoksisiti dan antikanser**

#### **1.3.1 Kanser**

Kanser bukanlah merupakan hanya satu penyakit tetapi merujuk kepada koleksi lebih daripada 100 penyakit berbeza yang mempunyai satu ciri umum iaitu pertumbuhan sel tanpa kawalan akibat mutasi gen dan lebih 100 jenis kanser telah dikenalpasti (Stacie, 1999). Kanser merujuk kepada populasi sel yang membahagi tanpa kawalan normal disebabkan oleh kegagalan tubuh mengawal pertumbuhan sel di mana dalam proses hayat sel normal, pembahagian sel adalah berdasarkan julat tertentu dan sel akan memainkan fungsinya serta melalui proses kematian. Ini berbeza dengan sel kanser di mana ia akan mereplikasi berterusan kepada dua sel yang berfungsi sepenuhnya tanpa kawalan, dan setiap satu akan bereplikasi lagi secara geometrik (Lope Pihie, 1998a). Pengelasan tumor pula dibuat berdasarkan asal usul kelas tisu tumor terbentuk yang boleh dibahagikan kepada tiga kategori iaitu (i) karsinoma, (ii) sarkoma dan (iii) limfoma, leukemia, eritroblastoma dan mieloma. Karsinoma merujuk kepada kanser yang berpunca atau terbit daripada tisu epitelium, iaitu sel yang melapisi sesuatu kelenjar atau organ tubuh seperti kulit, lapisan salur usus dan salur pernafasan. Sarkoma merujuk kepada kanser yang berasal daripada tisu perantara yang berperanan menyokong struktur tubuh seperti otot dan tulang. Bagi tumor jenis limfoma, leukemia, eritroblastoma dan mieloma pula, kesemuanya melibatkan tisu pembina darah seperti sum-sum tulang, limpa dan nodus limfa dan termasuk sistem leukositik (Lope Pihie, 1998a).

Setiap tahun, 10 juta kes baru kanser didiagnosis di mana risiko kanser adalah berbeza untuk kumpulan bangsa dan kawasan geografi (Schneider, 2002). Selepas penyakit jantung, kanser merupakan penyebab kematian utama di Amerika Syarikat (Friedrich, 1999; Kubetin, 2000; Greenlee *et al.*, 2000). Di Malaysia pada tahun 2002, neoplasma malignan menduduki tempat ketiga antara sepuluh penyebab utama kematian iaitu 9.23% selepas penyakit jantung (14.51%) dan septisemia (15.44%). Daftar Kanser Kebangsaan (NCR) (2004), melaporkan bahawa purata setiap seorang daripada empat rakyat Malaysia akan mendapat kanser dengan peringkatan 40 000 kes baru setiap tahun. Menurut NCR, Malaysia kini mempunyai jumlah pesakit kanser hidung dan tekak tertinggi dunia di mana kanser yang kerap dihidapi lelaki negara ini ialah kanser paru-paru, nasofarinks, usus, leukemia, rektum dan prostat manakala bagi wanita pula ialah payudara, pangkal rahim, usus, leukemia dan paru-paru. Menurut anggaran, secara umumnya kadar kehidupan lima tahun pesakit kanser ialah 60% iaitu 60% dari pesakit kanser hanya boleh hidup lima tahun. Beberapa jenis kanser mempunyai kadar kehidupan lima tahun kurang daripada 20% termasuk kanser paru-paru, kerongkong, hati dan pankreas (American Cancer Society, 1999).

Terdapat banyak punca yang meningkatkan risiko seseorang itu menghidap kanser. Mutasi gen di antara jenis kanser yang sama juga berbeza contohnya kebanyakan kanser payudara disebabkan mutasi gen p53 yang berfungsi menghalang pertumbuhan tumor dalam keadaan biasa manakala sebab lain disebabkan pewarisan mutasi gen BRCA1 (Breast Cancer Gene 1) (Stacie, 1999). Antara faktor-faktor yang berisiko ialah cara hidup dan persekitaran di mana diet, merokok, radiasi dan hormon atau ubatan disyaki karsinogen. Contoh diet termasuklah pengambilan alkohol, lemak dan aflatoksin manakala radiasi ialah pendedahan kepada sinaran-x, ultraungu, bom

atom dan cahaya matahari yang berlebihan manakala hormon atau ubatan termasuklah pengambilan estrogen, testosteron dan agen kemoterapi. Selain itu, virus dan keadaan kesihatan juga menyumbang kepada kanser contohnya virus Epstein-Barr yang menyebabkan kanser hidung serta penyakit seperti diabetes yang boleh menyebabkan kanser uterus dan vulva. Risiko pekerjaan seperti bidang pembuatan dan perlombongan menyebabkan pendedahan kepada agen karsinogen (Stacie, 1999). Pemakanan menyumbang kepada kira-kira 35% faktor risiko diikuti penggunaan tembakau iaitu 30%, faktor pewarisan 5 hingga 10%, faktor pekerjaan 5%, radiasi 1 hingga 2% dan lain-lain 16-23% (Offit, 1998).

Antara rawatan kanser yang biasa digunakan secara meluas termasuklah pembedahan, radioterapi dan kemoterapi. Pembedahan dan radiasi merupakan kaedah rawatan setempat manakala kemoterapi dan hormon terapi merupakan rawatan sistemik. Kaedah rawatan boleh dilakukan secara berasingan ataupun gabungan. Walaubagaimanapun, terdapat kesan sampingan dan kelemahan kaedah-kaedah tersebut. Pembedahan menyebabkan kesakitan, sejumlah besar tisu normal di sekeliling tumor turut dibuang yang boleh mengganggu fungsi normal tisu-tisu dalam tubuh. Radioterapi pula kadangkala gagal membunuh kesemua sel-sel tumor. Kemoterapi menyebabkan muntah, hilang selera makan, keguguran rambut, dan kehilangan berat badan manakala radioterapi boleh menyebabkan kesakitan, loya dan keguguran rambut. Kelemahan yang paling utama bagi kesemua bentuk rawatan ini adalah ia gagal merawat kanser yang telah bermetastasis (Mani, 1999). Terapi biologi ialah rawatan piawai untuk beberapa jenis kanser yang bergantung pada hormon dan dapat tumbuh dengan cepat dengan kehadiran hormon tertentu contohnya, kanser prostat, payudara dan uterus. Terapi hormon melibatkan halangan pembentukan atau

aktiviti hormon yang membolehkan pertumbuhan tumor menjadi perlahan (Narins, 2000). Immunoterapi juga merupakan terapi biologi di mana sistem imun badan seseorang dapat memusnahkan sel kanser. Antara agen imunologi termasuk interferon, interleukin, faktor pertumbuhan, antibodi monoklon dan vaksin (Narins, 2000).

Kanser payudara merupakan kanser yang paling banyak dihadapi oleh golongan wanita dan jenis yang paling biasa ialah kanser salur dan kanser lobus. Ia mempunyai kadar yang tinggi di Amerika Syarikat, Kanada dan Eropah (Schneider, 2002). Menurut NCR (2004), kanser ini dikesan pada wanita dengan kadar 52.8 per 100 000 populasi dan menyumbang kepada 31% daripada jumlah kes kanser yang baru didiagnosis di kalangan wanita. Kanser payudara pada peringkat asalnya yang ditemui berbentuk tumor benigna tidak memudaratkan sel perumah lain tetapi apabila pembahagian menjadi tidak terkawal secara berterusan, ia menjadi malignan dan bermetastasis ke bahagian tubuh lain seperti hati, paru-paru, otak dan sebagainya secara patologi (Harris *et al.*, 1982). Terdapat dua jenis kanser payudara iaitu kanser bersandar hormon dan jenis tidak bersandar hormon (King *et al.*, 1985). Faktor-faktor yang mempengaruhi kanser tersebut ialah umur, jantina, hormon dan reproduktif. Antaranya termasuk pengambilan alkohol, haid pada usia awal, terapi estrogen, sejarah keluarga, lewat menopause, radiasi dan lain-lain lagi. Kaedah rawatan kanser payudara termasuk pembedahan mastektomi dan lumpektomi, radioterapi, kemoterapi, terapi hormon dan kombinasi rawatan tersebut.

Kanser kolon merupakan kanser yang kedua tertinggi di dunia dan insiden kanser kolorektum didapati tinggi selepas seseorang berusia 50 tahun terutamanya

pada lelaki (Schneider, 2002). Pada tahun 2003, ia menduduki tempat ketiga paling kerap jenis kanser yang dihadapi rakyat Malaysia dan menyumbang sebanyak 7.6% daripada semua jenis kanser (NCR, 2004). Jenis utama kanser kolon adalah adenokarsinoma yang terdiri daripada pelbagai histologi (Schneider, 2002). Faktor-faktor utama yang menyumbang kepada kanser kolon adalah bahan-bahan yang dimakan termasuk alkohol, rokok, pengambilan lemak berlebihan dan daging. Kaedah rawatan utama ialah pembedahan manakala radioterapi dan kemoterapi (ECF) juga diaplikasikan.

Kanser ovari merupakan kanser kelima tertinggi di kalangan wanita di Amerika Syarikat (Schneider, 2002). Di Malaysia, ia menyumbang kepada 4.1% daripada kanser yang dihadapi wanita dan menduduki tempat keenam berbanding kanser lain (NCR, 2004). Kanser ovari mempunyai kadar kemortalan yang tinggi kerana tidak ada gejala yang nyata sehingga pada tahap lewat. Terdapat tiga jenis utama kanser ovari iaitu karsinoma yang terbentuk daripada epitelium; granulosa sel tumor yang terbentuk dari stroma; dan disgerminoma yang terbentuk di antara sel pembiakan (Schneider, 2002). Antara faktor-faktor risiko mendapat kanser ovari termasuklah penangguhan mengandung, sejarah keluarga, kemandulan, pengambilan laktosa yang tinggi dan penggunaan serbuk talkum. Rawatan yang biasa dilakukan termasuk pembedahan pembuangan ovari (laporotomi), pembuangan tiub-fallopian (salpingo-oophorektomi) dan uterus serta radiasi dan kemoterapi (Chuen, 2002).

Kanser paru-paru merupakan kanser tertinggi dihadapi penduduk di dunia dan terdapat pada kadar yang tinggi di New Zealand dan Amerika Syarikat (Olver, 1998; Schneider, 2002; Macdonald *et al.*, 2004). Kanser ini juga merupakan kanser paling

tinggi di Malaysia dan menyumbang sebanyak 13.8% berbanding kanser utama lain. Dua jenis utama kanser paru-paru termasuk karsinoma sel paru-paru kecil (SCLC) dan karsinoma sel paru-paru tidak kecil (NSCLC) (Macdonald *et al.*, 2004). Kajian epidemiologi menunjukkan bahawa kajian sejak 50 tahun lalu yang mengaitkan risiko kanser paru-paru dengan merokok. Kaedah rawatan utama ialah secara pembedahan.

### **1.3.2 Karsinoma hepatoselular**

Karsinoma hepatoselular atau kanser hati merupakan penyakit malignan keempat paling kerap di dunia dengan peningkatan insiden berlaku setiap tahun (Pedersen *et al.*, 2002). Kanser hati primer pula merupakan jenis yang paling kerap dihidapi diseluruh dunia (Macdonald *et al.*, 2004). Di Malaysia, kanser hati menduduki tempat ke 10 bagi jenis kanser yang dihidapi di mana lebih kerap dicatatkan pada lelaki Cina berbanding India dan Melayu (NCR, 2004). Kanser hati mempunyai kadar yang paling tinggi di negara-negara seperti tengah dan barat Afrika, China, timur dan barat daya Asia dan Mali manakala kadar kanser tersebut adalah rendah bagi timur Eropah dan negara-negara membangun (Boyle, 1997; Parkin *et al.*, 1999; Scheneider, 2002). Bagi kanak-kanak pula, antara kanser yang paling kerap di Amerika Syarikat termasuklah kanser hati (Fromer, 1998). Karsinoma hepatoselular merupakan penyakit hati yang paling merbahaya iaitu mencatatkan jumlah pesakit sebanyak 90% berbanding penyakit hati lain (Okuda, 1992). Karsinoma hepatoselular dilaporkan menular di kalangan penduduk Asia yang kebanyakannya berakhir dengan kematian (Hasegawa *et al.*, 1999). Insiden jangkitan dengan karsinoma hepatoselular dan kadar kematian adalah hampir sama (Kew & Geddes, 1982; Okuda *et al.*, 1985). Kadar kehidupan lima tahun secara relatif bagi pengidap kanser pada semua peringkat bagi kanser hati ialah hanya 5% (American Cancer Society, 1999).

Kanser hati terbahagi kepada tiga jenis iaitu kolangiokarsinoma, hemangiokarsinoma dan karsinoma hepatoselular di mana ia adalah dari jenis tisu hati dan sistem organ pencernaan (Cooper, 1992). Kebanyakan penyakit kanser hati primer melibatkan karsinoma hepatoselular yang terbit daripada hepatosit. Sementara hepatoblastoma berasal daripada jenis sel yang sama tetapi amat jarang berlaku. Kedua-dua jenis tumor ini kadangkala lebih dikenali sebagai hepatoma kerana kedua-duanya berasal daripada sel-sel hepatosit (Lope Pihie, 1998a).

Faktor risiko kanser hati termasuk diet iaitu pengambilan alkohol, virus atau infeksi contohnya hepatitis B dan C, schistosomiasis (jangkitan parasit) dan keadaan kronik seperti hemakromatosis (Offit, 1998). Selain itu, faktor risiko pekerjaan juga boleh menyebabkan kanser hati berlaku iaitu arsenik (perlombongan, pestisid) dan vinil klorida (industri pembuatan PVC) (Cooper, 1992). Kanser hati juga berpunca daripada jangkitan sekunder akibat metastasis setelah mendapat tumor pada paru-paru, pankreas, usus atau ovari (Cariaga & Henson, 1995; Del Olmo *et al.*, 1998). Kedua-dua virus hepatitis B dan C merupakan di antara 20 faktor penyumbang peningkatan risiko kanser hati (Donato *et al.*, 1998). Data epidemiologi dan eksperimen menunjukkan perkaitan antara insiden karsinoma hepatoselular dengan infeksi kronik virus hepatitis dan pendedahan mikotoksin (Miyazaki & Namba, 1994). Hepatitis B adalah virus yang lebih prevalens di mana taburan jangkitan seluruh dunia menggambarkan corak kanser hati. Dengan pengetahuan risiko kaitan dan prevalens jangkitan di kawasan berbeza, langkah pencegahan boleh diambil. Sekurang-kurangnya untuk hepatitis B terdapat vaksin yang mencegah jangkitan semasa kanak-kanak. Di Taiwan, immunisasi hepatitis B kepada bayi yang diberikan semenjak 1984 dan penerimaan vaksinasi kohort kelahiran pada kanak-kanak berusia 6 hingga 9

tahun telah menunjukkan penurunan dramatik insiden kanser hati (Chang *et al.*, 1997).

Kanser hati akan menyebabkan fungsi normal hati terganggu, ini akan menjejaskan sistem tubuh yang lain dan kegagalan fungsi hati akan mengakibatkan pelbagai komplikasi. Antara simptom-simptom klinikal kanser hati termasuk rasa tidak sedap badan, sakit, demam, jaundis, pruritis, kehadiran jisim yang ketara dan pembesaran hati (Burdette, 1998).

Kanser hati merupakan satu daripada tumor malignan paling agresif dan tiada rawatan yang efektif terhadapnya (Cameron *et al.*, 1976). Rawatan kepada pesakit kanser hati bergantung kepada jenis kanser hati, histologi, tumor yang terlibat, peringkat dan keadaan kesihatan pesakit. Rawatan lebih sukar pada hepatoselular berbanding hepatoblastoma kerana sel hepatoselular lebih agresif dan kebiasaannya melibatkan semua lobus hati (Honna & Keene, 1999). Rawatan juga tidak sesuai bagi hati yang telah rosak contohnya akibat jangkitan hepatitis B atau C. Terdapat pelbagai kaedah rawatan kanser hati termasuklah pembedahan dan kemoterapi. Rawatan yang paling efektif merawat karsinoma hepatoselular ialah reseksi hepatic iaitu sejenis kaedah pembedahan (Lin, 1976). Antara jenis pembedahan yang biasa dilakukan termasuk lobektomi, trisegmentomi dan torakotomi. Kadar kehidupan selepas pembedahan ialah 70-80% manakala 30-46% hidup sehingga lima tahun (Mani, 1999). Rawatan lain termasuk pemindahan hati atau hepatektomi yang berkesan pada pesakit peringkat paling awal. Rawatan kemoterapi juga menjadi pilihan rawatan kanser hati walaupun dilaporkan kurang efektif. Antaranya termasuk menggunakan Doxorubisin, Floxuridin dan Mitomisin. Radiasi jarang digunakan dan pancaran

radioterapi luaran diberi bila rawatan kemoterapi tidak bersesuaian. Biasanya terapi  $^{131}\text{I}$  poliklonal antiferritin antibodi dan terapi  $^{90}\text{Y}$  anti ferritin isotop diberi sebagai rawatan radioterapi (Mani, 1999).

Rawatan yang masih dalam peringkat kajian termasuk kriosurgeri yang melibatkan pembekuan sel kanser untuk membunuh tumor, etanol ablasia iaitu suntikan alkohol pekat ke dalam tumor melalui arteri hepatik, drug kemoterapi dengan tamoxifen, antiangiogenesis dan lain-lain (Honna & Keene, 1999). Menurut Stuart *et al.* (1999), karsinoma hepatoselular adalah penyakit yang tidak dapat diubati lagi dan menyimpulkan bahawa langkah pencegahan adalah yang terbaik.

### 1.3.3 Kajian *in vitro* antikanser

Perkembangan bidang sains perubatan sekitar tahun 1900 dan awal 1940 menyebabkan penyelidik mula memahami struktur, fungsi dan kimia organisma hidup di mana kajian berkaitan kanser bermula dengan struktur sel, karsinogen kimia, teknik diagnosis dan kemoterapi (Stacie, 1999). Kanser akibat virus pada ayam didokumentasikan pada 1911 dan eksperimen membuktikan bahan kimia boleh menyebabkan kanser dilaporkan pada 1915 (Stacie, 1999). Kini, kajian berkembang dengan pesatnya untuk merawat kanser. Kajian antikanser dilakukan secara meluas oleh penyelidik-penyelidik. Antara kajian yang dilakukan ialah kajian *in vitro*, kajian farmaseutikal terhadap haiwan, kajian klinikal dan analisis meta (Stacie, 1999).

Kajian *in vitro* merujuk kepada pengkulturan di luar sel perumah sebagai kultur sel atau kultur organ yang juga digunakan untuk mengkaji tindakbalas biokimia

dan molekul yang dilakukan dalam tabung uji. Kajian *in vitro* boleh diinterpretasi dalam aspek tindakbalas *in vivo* sel atau sekurang-kurangnya perbezaan yang wujud antara kajian *in vitro* dan *in vivo* diketahui dengan jelas. Terdapat beberapa had dalam kajian *in vitro* termasuk dari aspek farmakokinetik, metabolisme dan tindakbalas tisu dan sistem. Menurut Freshney (2000), antara kelebihan-kelebihan kultur tisu ialah ianya dapat mengawal persekitaran psikokimia seperti pengawalan pH, suhu, osmolariti dan gas terlarut dan dapat mengawal keadaan fisiologi seperti kepekatan hormon dan nutrien. Selain itu, kelebihan kultur tisu ialah dari segi kehomogenan sel, memudahkan pencirian, memudahkan penyimpanan, boleh merekod asal, sejarah dan ketulenan, memudahkan pengkuantitian di mana boleh dilakukan variabiliti dan replikat, mengurangkan penggunaan reagen serta sebagai model *in vivo* di mana kawalan dos, masa dan kepekatan boleh dilakukan selain mengurangkan kadar penggunaan haiwan untuk penskrinan sitotoksik, farmaseutik, kosmetik dan lain-lain. Walau bagaimanapun, terdapat had dalam kultur tisu termasuklah memerlukan kepakaran, kawalan persekitaran, kuantiti dan kos, ketidakstabilan genetik dan fenotip serta pengenalanpastian jenis sel (Freshney, 2000).

Lewat 1960 hingga 1970 perkembangan turunan sel tumor manusia mewakili setiap jenis malignansi manusia merupakan aktiviti utama kajian. Kebanyakan kajian biokimia dan biologi molekul kanser diperolehi daripada turunan sel walaupun terdapat persoalan sama ada sebilangan sel daripada kultur turunan sel immortal mewakili penyakit asal (Teicher, 1999). Kebanyakan turunan sel manusia mudah tumbuh dan dipelihara. Dengan langkah-langkah berjaga-jaga yang ringkas dan teknik yang baik, turunan sel boleh menjadi model yang mewakili hampir keseluruhan jenis kanser manusia secara klinikal (Masters & Palsson, 1999). Penggunaan turunan sel

tumor manusia dalam kultur untuk program penyelidikan melibatkan biologi sel dan molekul moden, genetik dan onkologi semakin berkembang berbanding dahulu (Hay *et al.*, 1994).

Turunan sel hepatoma berjaya dipencilkan buat pertama kalinya pada 1964. Turunan sel HepG2 diperolehi daripada biopsi tumor hati semasa labektomi seorang lelaki Caucasia berusia 15 tahun dari Argentina (Aden *et al.*, 1979). Tumor hati tersebut yang didiagnos secara histologi didapati sama dengan hepatoblastoma yang lengkap membeza. Sel HepG2 berbentuk epithelium dan morfologinya adalah gabungan sel parenkima hati. Sel HepG2 adalah tidak normal dari segi kromosomnya, dengan kromosom ke-55nya mempunyai ciri pengubahsuaian daripada kromosom 1. Sel HepG2 asalnya bukan tumorigenik apabila disuntik pada kapsul buah pinggang tikus normal (Knowles *et al.*, 1980). Walaubagaimanapun, sel HepG2 kemudiannya dikesan boleh menyebabkan tumor apabila disuntik secara subkutan pada tikus normal (Huber *et al.*, 1985). Turunan sel seperti HepG2 yang didapati daripada hepatoma manusia mengekalkan sesetengah ciri-ciri metabolisme hati normal (Knowles *et al.*, 1980). Turunan sel karsinoma hepatoselular dan hepatoblastoma merupakan model terbaik bukan hanya untuk penyiasatan hepatokarsinogenesis tetapi untuk menjelaskan mekanisme pengawalaturan pengekspresan gen spesifik hati (Miyazaki & Namba, 1994).

Terdapat banyak kelebihan menggunakan sistem pengkulturan sel dalam menyaring bahan aktif daripada ekstrak tumbuhan dan fitofarmaseutikal (Gebhardt, 2000). Kultur sel mamalia menyediakan kaedah yang penting untuk menilai sitotoksiti sebatian dengan potensi aktiviti terapeutik (Pailard *et al.*, 1999). Sel hati

HepG2 dipilih kerana telah terbukti merupakan model yang baik dalam penyelidikan fisiologi dan telah digunakan untuk mencirikan pengambilan nutrien dan substrat (Seliogmann *et al.*, 1991; Said *et al.*, 1994; Said *et al.*, 1998). Sel HepG2 menunjukkan banyak ciri-ciri genotip dan fenotip sel hati normal dan mengekalkan fungsi enzim yang terlibat dalam Fasa I dan Fasa II metabolisme xenobiotik dan HepG2 merupakan model yang boleh akui untuk kajian *in vitro* toksisiti bahan kimia (Tuschl & Schwab, 2003). Sel HepG2 mewakili model yang sesuai untuk kajian hepatotoksiti yang mengekalkan beberapa fungsi hepatosit manusia (Knowles *et al.*, 1980; Javitt, 1990; Kullak-Ublick *et al.*, 1996).

Banyak kajian *in vitro* dijalankan bertujuan mengenalpasti potensi sitotoksik sebatian-sebatian yang dikaji sama ada untuk digunakan dalam farmaseutik atau kosmetik untuk membuktikan sebatian tersebut tidak toksik atau eksperimen direkabentuk untuk mengenalpasti agen antikanser dan cara tindakannya (Freshney, 2000). Adalah sukar untuk mengkaji kesan fisiologi dan sistem secara *in vitro*, jadi kebanyakan asai mengenalpasti kesan pada tahap sel atau sitotoksik. Dalam kajian antikanser, sitotoksik merujuk kepada keupayaan agen tertentu untuk membunuh sel kanser.

Terdapat pelbagai kelas struktur metabolit sekunder tumbuhan ditemui membunuh sel kanser atau bertindak sebagai agen sitotoksik (Kinghorn, 1993). Kajian ketoksikan selektif sesuatu bahan bioaktif terhadap pertumbuhan sel tumor dapat dilakukan melalui asai proliferasi *in vitro* dengan menggunakan sel monolapisan (Alley *et al.*, 1998). Menurut Geran *et al.* (1972), ekstrak tumbuhan dikira sebagai

aktif dalam penskrinan sitotoksitasinya sekiranya nilai ED<sub>50</sub> terhadap turunan sel KB adalah kurang daripada 20 µg/ml.

*P. pulcher* yang digunakan dalam kajian ini merupakan tumbuhan yang menunjukkan potensi sebagai agen antikanser berbanding dengan ekstrak *Phyllanthus* sp. yang pernah dikaji iaitu *P. niruri*, *P. pulcher*, *P. debilis*, *P. urinaria*, *P. reticulatus*, *P. emblica*, *P. myrtifolius* dan *P. acidus* terhadap sel HepG2 (Zakaria, 2002; Ching, 2003).

## **1.4 Mekanisme kematian sel**

### **1.4.1 Apoptosis dan nekrosis**

Kanser hanya akan wujud sekiranya berlaku mutasi dalam DNA (Ross, 1998). Proses pengawalan sel seperti pembezaan, proliferasi dan program kematian sel berubah dalam sel kanser. Proses kematian sel terprogram (programmed cell death) merupakan proses bersifat memilih terhadap pembunuhan sel secara fisiologi (Umansky, 1982; Bursch *et al.*, 1990). Beberapa tahun kebelakangan ini, kemajuan pesat dalam mekanisme molekul apoptosis telah mengenalpasti pelbagai tapak jalan kematian sel (Salami & Karami-Tehrani, 2003).

Kematian sel boleh dikelaskan kepada nekrosis dan kematian sel terprogram (Samali *et al.*, 1999). Kematian sel terprogram pula terbahagi kepada dua iaitu apoptotik (jenis 1) dan bukan apoptotik. Kematian sel terprogram bukan apoptotik terbahagi kepada tiga iaitu (i) autofagi atau kematian sel vakuol (jenis 2) (Bowen &

Bowen, 1990), (ii) atropi (jenis 3) (Levi-Montalcini & Aloe, 1981) dan (iii) pembezaan. Salah satu sebab kenapa kematian sel merupakan topik penting dalam hal ini kerana pengawalannya sangat penting dalam pengawalan terapi tumor. Sel tumor mempunyai kadar penggantian yang tinggi dan menunjukkan kadar kehilangan sel yang tinggi.

Mekanisme kematian sel apoptosis dan nekrosis boleh diaruh sama ada oleh perangsang yang sama atau berbeza. Perangsang yang sama dapat mengaruh apoptosis atau nekrosis bergantung kepada dos yang digunakan (Kerr *et al.*, 1972; Ellis *et al.*, 1991; Majno & Joris, 1995; Denecker *et al.*, 2001; Renehan *et al.*, 2001). Mengikut kajian terkini didapati bahawa proses yang berlaku pada kedua-dua mekanisme kematian sel ini dikawalatur oleh pengantara biokimia yang sama di mana yang paling ketara ialah aras ATP dan kalsium di dalam sel, jenis spesies oksigen reaktif dan antioksidan tiolnya (McConkey, 1998). Melalui peringkat permulaan tertentu, perubahan tekanan yang wujud pada pengawalatur ini didapati menukarkan mekanisme kematian sel tersebut daripada apoptosis kepada nekrosis (McConkey, 1998).

Terdapat perbezaan secara morfologi dan fisiologi di antara apoptosis dan nekrosis. Apoptosis merupakan proses aktif manakala nekrosis merupakan suatu proses yang pasif. Bagi mekanisme apoptosis, sel didapati mengecut tetapi di dalam nekrosis sel akan mengembang. Sel yang mengalami apoptosis juga mengalami kondensasi nukleus, membrannya tidak rosak dan tiada inflamasi berbanding sel yang mati secara nekrosis di mana membrannya didapati pecah dan terdapat inflamasi. Secara amnya, apoptosis merupakan tapak jalan perkembangan sel yang memelihara

sel tersebut manakala nekrosis adalah mekanisme biokimia yang toksik (Kroemer *et al.*, 1998).

Istilah apoptosis telah digunakan pada mulanya oleh Kerr *et al.* (1972), untuk menerangkan mengenai perkaitan bentuk morfologi dengan kematian sel secara semulajadi dan beberapa proses patologi secara *in vivo*. Apoptosis merupakan salah satu mekanisme kematian sel yang dicirikan pada perubahan tertentu yang berlaku pada morfoiogi, biokimia dan tahap molekul yang spesifik seperti pengecutan sel, pengembangan membran, kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA (Kroemer *et al.*, 1998). Apoptosis melibatkan jaringan pengawalaturan genetik dan biokimia yang tersedia untuk pembunuhan sel akibat tindakbalas terhadap perangsang tertentu (Corcoran *et al.*, 1994; Wyllie, 1998; Robertson & Orrenius, 2000). Sel yang mengalami apoptosis menunjukkan ciri-ciri piawai seperti kondensasi kromatin nukleus, kehilangan asimetri membran plasma dengan gangguan membran fosfatidilserina (PS) (Bever *et al.*, 1999), pengaktifan protease (seperti caspase) dan endonuklease yang mencerna DNA kepada fragmen-fragmen bersaiz 180 pasangan bes yang dilihat sebagai tetangga klasik pada elektroforesis gel dan segmentasi sel kepada jasad apoptotis (Thornberry, 1998; Chang & Yang, 2000; Zhang & Xu, 2000; Adams & Cory, 2001).

Perkembangan kanser boleh dirujuk sebagai penyusunan yang tidak seimbang di antara kawalan apoptosis dan kawalan proliferasi. Kehilangan pengawalan apoptosis mungkin menyebabkan simptom transformasi neoplastik (Ellis *et al.*, 1991). Penemuan proto-onkogen seperti c-myc dan bcl-2 dan gen penindas tumor seperti p53 memberi maklumat penting terhadap kawalan apoptosis yang memberi fokus kepada

peranan apoptosis dalam tumorigenesis dan sebagai tapak jalan berpotensi untuk terapeutik kanser diarahkan (Kerr *et al.*, 1972). Radioterapi, hormon terapi dan agen kemoterapi kesemuanya mengaruh kematian secara apoptotik sel sasaran (Inada *et al.*, 1997; Cameron & Feuer, 2000; Ramoneda & Thomas, 2002). Aruhan yang membawa kepada kerosakan DNA merupakan tindakan utama kebanyakan agen antikanser. Walau bagaimanapun, kerosakan boleh menyebabkan berlakunya apoptosis atau sebaliknya bergantung kepada fungsi gen p53 (Lowe *et al.*, 1993; Fisher, 1994). Apoptosis boleh diaruh oleh pelbagai agen termasuk gangguan faktor pertumbuhan (Collins *et al.*, 1994) dan drug yang sitotoksik (Nooter *et al.*, 1995). Proses apoptosis diperlukan untuk memusnahkan tumor yang mungkin membawa kerosakan genom yang teruk atau mempunyai fungsi abnormal supaya proliferasi sel tumor dihalang dan tumorigenesis dicegah (Symonds *et al.*, 1994).

Terdapat banyak bukti menunjukkan bahawa apoptosis memainkan peranan penting dalam kajian antikanser. Semasa kemoterapi antikanser, agen sitotoksik pada dos yang rendah biasanya mengaruh kematian sel secara apoptosis (Johnstone *et al.*, 2002). Antaranya penggunaan komponen bioaktif tumbuhan seperti asid betulnik sebagai agen antikanser yang selektif serta merencat melanoma manusia dan mengaruh apoptosis (Pisha *et al.*, 1995). Antara agen kemoterapi yang mencetuskan kematian sel kanser secara apoptosis ialah tamoksifen, taksol (agen mitotik) dan melafan (agen pengalkilat) (Thompson, 1995). Walaubagaimanapun, tamoksifen yang digunakan untuk rawatan kanser payudara dan ovari (Olson, 1994) didapati banyak memberi kesan sampingan seperti simptom menopause, amenorrhea, pertambahan berat, lelehan vagina, kerosakan retina, pembekuan darah, toksisiti pada hati, kemandulan, risiko kanser endometrium dan ovari (Ahotupa *et al.*, 1994;

Sismondi *et al.*, 1996 Epstein, 1997; Lope Pihie, 1998b). Aruhan apoptosis dalam proliferasi sel tumor merupakan strategi yang efisien untuk kemoterapi kanser dan dijalankan secara meluas (Wyllie *et al.*, 1980a; 1980b; Israels & Israels, 1999).

Nekrosis berlaku apabila rangsangan adalah sangat kuat akibat pelbagai jenis tekanan seperti kecederaan psikokimia yang kuat (radikal, radiasi, suhu dan trauma toksik), ketidakseimbangan osmosis, anoksia mendadak, halangan tenaga (keputusan bekalan nutrien contohnya glukosa secara tiba-tiba) serta apabila tapak jalan apoptosis terhalang selepas aruhan apoptosis fisiologi (Huettenbrenner *et al.*, 2003). Ia dicirikan oleh pengembangan sitoplasma dan organel sitoplasma, pengembangan nukleus dan pemecahan peringkat awal membran plasma (Majno & Joris, 1995; Denecker *et al.*, 2001; Renehan *et al.*, 2001).

#### **1.4.2 Caspase-3**

Caspase merujuk kepada protease spesifik aspartat berdasarkan sistena dan ia merupakan istilah untuk mendefinisikan protease yang bergantung kepada enzim penukaran interleukin-1 $\beta$  (ICE) dan protein kematian sel *Caenorhabditis elegans* (CED-3) (Alnemri *et al.*, 1996). Terdapat 11 caspase pada manusia yang telah dikenalpasti walaupun tidak semua dijumpai pada sel manusia. Caspase manusia berkongsi persamaan yang sama pada domain katalitik manakala persamaan yang sedikit pada penghujung amino. Jujukan penghujung amino caspase berbeza-beza kepanjangannya iaitu daripada 22 asid amino dalam caspase 6 hingga melebihi 200 dalam caspase 8 dan 10 (Hofmann *et al.*, 1994). Caspase mempunyai keistimewaannya tersendiri iaitu ia mengandungi zimogen yang mempunyai aktiviti