

KESAN EKSTRAK ETANOL *ANDROGRAPHIS*  
*PANICULATA* (BURM. F.) NEES KE ATAS  
TIKUS BETINA DIABETIK ARUHAN-  
STREPTOZOTOSIN

AHMAD SYAHRIN BIN MOHD SAIFUDDIN

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA  
2006

## PENGHARGAAN

Alhamdulillah, syukur kepada ALLAH SWT kerana dengan izin-Nya memberi peluang dan keupayaan kepada saya untuk menjalankan kajian saintifik bagi memenuhi keperluan ijazah sarjana sains dan untuk memperkasakan ilmu pengetahuan yang telah dipelajari semasa diperingkat ijazah sarjanamuda. Di kesempatan ini, saya ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Kementerian Sains Teknologi dan Inovasi (MOSTI) kerana mengurniakan biasiswa NSF kepada saya untuk menjalankan penyelidikan dalam bidang farmaseutikal. Jutaan terima kasih juga diucapkan kepada IRPA (304.PPSP.6150052) kerana membenarkan saya menjalankan penyelidikan ini dibawah geran peruntukkannya. Terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada semua penyelia utama dan bersama iaitu Prof. Syed Mohsin Sahil Jamalulail, PM Dr. Siti Amrah Sulaiman dan PM DR. Hasenan Nordin, di atas segala tunjuk ajar, bimbingan dan nasihat yang membina kepada saya di sepanjang tempoh kajian ini. Di samping itu, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada PM Dr. Hasnan Jaafar, Dr. Rahimah Zakaria dan En. Lukmi Ismail, di atas segala pertolongan dan cadangan yang diberikan. Tidak lupa juga diucapkan kepada En. Ruzman dan Pn. Roslina kerana sanggup meluangkan masa bersama-sama saya untuk membantu melancarkan kerja-kerja penyelidikan ini. Ucapan terima kasih ditujukan kepada semua staf di Unit Rumah Haiwan, USM Kubang Kerian, kerana sedia memberikan sokongan teknikal dalam menjayakan kajian ini. Sekalung penghargaan dihulurkan kepada En. Ismail (Makmal Patologi) dan Pn. Mellisa (Makmal Immunologi) di atas tunjuk ajar dan bantuan yang diberikan. Rakan-rakan seperjuangan, terima kasih di atas segala sokongan yang diberikan. Akhir sekali, saya merakamkan penghargaan teristimewa kepada isteri, anak dan kedua-dua ibu bapa kerana memahami tugas kajian ini.

## KANDUNGAN

	<b>Halaman</b>
<b>MUKA SURAT JUDUL</b>	i
<b>PENGHARGAAN</b>	ii
<b>KANDUNGAN</b>	iii
<b>SENARAI JADUAL</b>	xi
<b>SENARAI RAJAH</b>	xiii
<b>SENARAI GAMBAR FOTO</b>	xvi
<b>SENARAI SIMBOL DAN TATANAMA</b>	xviii
<b>ABSTRAK</b>	xxi
<b>ABSTRACT</b>	xxiv
<b>BAB I     PENDAHULUAN</b>	1
1.1       Pengenalan	1
1.2       Matlamat & Objektif kajian	6
1.2.1 Matlamat kajian	6
1.2.2 Objektif kajian	6
1.2.2 (a) Kajian permulaan	6
1.2.2 (b) Eksperimen 1: Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas tikus betina diabetik aruhan-STZ	7

	<b>Halaman</b>
1.2.2 (c) Eksperimen 2: Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas tikus Sprague Dawley betina normal	7
1.3 Skop kajian dan had kajian	8
1.4 Hipotesis kajian	8
1.5 Manfaat kajian	9
<b>BAB II TINJAUAN BACAAN</b>	<b>11</b>
2.1 <i>Andrographis paniculata</i>	11
2.1.1 Kriteria botanikal <i>Andrographis paniculata</i>	11
2.1.2 Komposisi kimia <i>Andrographis paniculata</i>	12
2.1.3 Penghasilan serbuk <i>Andrographis paniculata</i>	14
2.1.4 Kegunaan <i>Andrographis paniculata</i> sebagai tumbuhan perubatan tradisional	15
2.1.5 Kesan sampingan <i>Andrographis paniculata</i>	16
2.2 Diabetes Melitus	18
2.2.1 Diabetes Melitus Jenis I	19
2.2.2 Patofisiologi Diabetes Melitus	22
2.2.3 Model tikus diabetes	24
2.3 Streptozotosin	26
2.3.1 Struktur dan komposisi kimia Streptozotosin	26
2.3.2 Mekanisme tindakan Streptozotosin	28
2.3.3 Kesan tindakan Streptozotosin	33
2.3.4 Kegunaan Streptozotosin	36

	<b>Halaman</b>
2.4	Pankreas 36
	2.4.1 Kepulauan Langerhans 38
	2.4.2 Sel beta 39
	2.4.3 Insulin 40
	2.4.3 (a) Mekanisme tindakan insulin 41
	2.4.3 (b) Kesan tindakan insulin 43
	2.4.4 Histopatologi pankreas dalam diabetes 45
2.5	Kitaran estrus dan hormon yang terlibat 49
	2.5.1 Kitaran estrus 50
	2.5.2 Peranan hormon dalam kitaran estrus 51
<b>BAB III</b>	<b>BAHAN DAN KAEDAH</b> 54
3.1	Bahan 54
	3.1.1 Bahan kimia 54
	3.1.2 Alat radas 55
	3.1.3 Ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 56
	3.1.4 Tikus Sprague Dawley betina 57
3.2	Rekabentuk kajian 57
	3.2.1 Kajian permulaan 59
	3.2.1 (a) Kajian penghasilan model tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin 59
	3.2.1 (b) Kajian penentuan peringkat dos ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> untuk merawat tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin 61

	<b>Halaman</b>
3.2.2 Eksperimen 1: Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin	64
3.2.3 Eksperimen 2: Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas tikus Sprague dawley betina normal	68
3.3 Kaedah	70
3.3.1 Pengekstrakan <i>Andrographis paniculata</i>	70
3.3.2 Aruhan diabetes dalam tikus	73
3.3.3 Pengambilan sampel darah	74
3.3.3 (a) Tusukan pada vena lateral ekor	74
3.3.3 (b) Tusukan pada vena kava posterior	75
3.3.4 Pengambilan sampel organ	75
3.3.5 Penentuan aras glukosa darah	77
3.3.6 Asai hormon ELISA	78
3.3.6 (a) Prinsip ujian ELISA	79
3.3.6 (b) Kaedah asai hormon ELISA	79
3.3.7 Teknik apusan vagina	81
3.3.8 Teknik histologi	82
3.3.8 (a) Fiksasi tisu	82
3.3.8 (b) Pemprosesan tisu	83
3.3.8 (c) Penanaman tisu	83
3.3.8 (d) Pemotongan tisu	84
3.3.8 (e) Perwarnaan Harris Hematoksilin dan Eosin (H&E)	84

	<b>Halaman</b>
3.4.8 (f) Pemeriksaan mikroskopik	86
3.3.9 Pengiraan	88
3.3.9 (a) Peratus tikus yang hidup (PTH)	88
3.3.9 (b) Kepadatan sel endokrin (KSE) pulau Langerhans	88
3.3.9 (c) Bilangan kitar lengkap estrus (BKE) dan tempoh kitar lengkap estrus (TKE)	89
3.4 Analisis statistik	89
3.5 Etika haiwan	92
<b>BAB IV HASIL KAJIAN</b>	<b>93</b>
4.1 Kajian permulaan	93
4.1.1 Kajian penghasilan model tikus betina diabetik aruhan- streptozotosin	93
4.1.1 (a) Populasi dan keadaan fizikal haiwan kajian	93
4.1.1 (b) Jisim badan	95
4.1.1 (c) Aras glukosa darah	95
4.1.1 (d) Kitar estrus	102
4.1.1 (e) Histologi pankreas	102
4.1.2 Kajian penentuan peringkat dos ekstrak etanol <i>Andrographis</i> <i>paniculata</i> untuk merawat tikus betina diabetik aruhan- streptozotosin	108
4.1.2 (a) Populasi dan keadaan fizikal haiwan kajian	108
4.1.2 (b) Jisim badan	108
4.1.2 (c) Aras glukosa darah puasa	113

	<b>Halaman</b>
4.1.2 (d) Kitar estrus	118
4.2 Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin	118
4.2.1 Populasi dan keadaan fizikal haiwan kajian	118
4.2.2 Jisim badan	122
4.2.3 Aras glukosa darah puasa	128
4.2.4 Aras insulin serum puasa	132
4.2.5 Kitar estrus	132
4.2.6 Histologi pankreas	136
4.3 Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas kitar estrus tikus Sprague Dawley betina	144
4.3.1 Jisim badan, organ reproduktif dan kelenjar pituitari	144
4.3.2 Aras hormon insulin, progesteron, 17 $\beta$ -estradiol, hormon peransang folikel dan hormon peluteinan serum	145
4.3.3 Kitar estrus	146
<b>BAB V PERBINCANGAN</b>	<b>159</b>
5.1 Kajian permulaan	159
5.1.1 Kajian penghasilan model tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin	159
5.1.2 Kajian penentuan peringkat dos ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> untuk merawat tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin	161



	<b>Halaman</b>
5.2	Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin 162
5.2.1	Populasi dan keadaan fizikal haiwan kajian 162
5.2.2	Jisim badan 163
5.2.3	Aras glukosa darah puasa 164
5.2.4	Aras insulin serum puasa 165
5.2.5	Kitar estrus 166
5.2.6	Histologi pankreas 167
5.3	Kesan ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95% ke atas kitar estrus tikus Sprague Dawley betina 168
5.3.1	Jisim badan, organ reproduktif dan kelenjar pituitari 168
5.3.2	Aras hormon insulin, progesteron, 17 $\beta$ -estradiol, hormon perangsang folikel dan hormon peluteinan serum 169
5.3.3	Kitar estrus 170
<b>BAB VI</b>	<b>PERBINCANGAN KESELURUHAN</b> 171
<b>BAB VII</b>	<b>KESIMPULAN DAN CADANGAN</b> 176
	<b>RUJUKAN</b> 179
	<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b> 190
	Lampiran A: Bahan kimia dan alat radas yang digunakan untuk merealisasikan objektif bagi setiap kaedah kajian. 191
	Lampiran B: Teknik penyediaan larutan segar streptozotosin 194
	Lampiran C: Isipadu larutan segar streptozotosin yang perlu disuntik mengikut julat jisim badan tikus 195

	<b>Halaman</b>
Lampiran D: Teknik penyediaan dos ekstrak etanol <i>Andrographis paniculata</i> 95%	196
Lampiran E: Etika haiwan	198
Lampiran F: Graf lengkung piawai bagi asai hormon ELISA	199
<b>PENERBITAN</b>	<b>205</b>

## SENARAI JADUAL

<b>No. Jadual</b>		<b>Halaman</b>
3.1	Peratus kandungan andrografolid, neoandrografolid and 14-deoksiandrografolid dalam ekstrak etanol AP 95% yang dibekalkan oleh NOVA Pharmaceutical Sdn Bhd sebelum dan selepas proses pengeringan ekstrak etanol AP menggunakan kaedah semburan kering pada suhu dan tekanan yang tinggi.	58
4.1	Kesan aruhan STZ ke atas jisim badan dan aras glukosa darah tikus ujikaji sepanjang enam minggu kajian.	96
4.2	Kesan aruhan STZ ke atas kitar estrus tikus ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	103
4.3	Populasi tikus dalam setiap kumpulan ujikaji di sepanjang tempoh kajian.	109
4.4	Perubahan fizikal dan klinikal yang berlaku bagi setiap kumpulan tikus ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	110
4.5	Kesan ekstrak etanol AP 50% ke atas jisim badan dan aras glukosa darah tikus ujikaji yang dirawat selama enam minggu.	114
4.6	Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas bilangan tikus diabetik aruhan-STZ selepas enam minggu rawatan.	119
4.7	Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas jisim (g) badan tikus diabetik yang dirawat selama enam minggu.	126
4.8	Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas aras glukosa darah puasa (mmol/L) tikus diabetik yang dirawat selama enam minggu.	129
4.9	Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas aras insulin serum puasa dan kitar estrus tikus diabetik selepas enam minggu rawatan.	133
4.10	Kepadatan sel endokrin (bilangan sel/ $\mu\text{m}^2$ ) dalam pulau Langerhans bagi setiap kumpulan tikus ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	141

<b>No. Jadual</b>	<b>Halaman</b>
4.11 Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas jisim badan tikus betina SD selepas tiga minggu kajian dijalankan.	148
4.12 Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas jisim basah organ dalaman tikus betina SD selepas tiga minggu kajian dijalankan.	150
4.13 Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas aras hormon insulin, progesteron, $17\beta$ -estradiol, FSH dan LH selepas tiga minggu kajian dijalankan.	152
4.14 Kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas kitar estrus tikus betina SD selepas tiga minggu kajian dijalankan.	153

**SENARAI RAJAH**

<b>No. Rajah</b>		<b>Halaman</b>
1.1	Carta alir pelan penyelidikan keseluruhan.	5
2.1	Struktur kimia streptozotosin (STZ) yang ditentukan oleh Herr <i>et al.</i> (1967).	27
2.2	Carta alir mekanisme toksisiti aruhan STZ dalam sel $\beta$ pankreas tikus.	32
2.3	Carta alir menunjukkan interaksi hormon seks yang mengawal kitar estrus.	53
3.1	Carta alir bagi eksperimen penghasilan model tikus betina diabetik aruhan-STZ.	60
3.2	Carta alir bagi eksperimen penentuan peringkat dos ekstrak etanol AP untuk merawat tikus betina diabetik aruhan-STZ.	63
3.3	Carta alir bagi eksperimen kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas tikus betina diabetik aruhan-STZ.	67
3.4	Carta alir bagi eksperimen kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas kitar estrus tikus SD betina.	69
3.5	Carta alir kaedah pengekstrakan serbuk AP tulin daripada bahagian aerial pokok AP.	72
3.6	Carta alir kaedah umum asai hormon ELISA.	80
3.7	Carta alir teknik histologi.	87
4.1	Graf garis menunjukkan corak perubahan jisim badan bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	99

<b>No. Rajah</b>		<b>Halaman</b>
4.2	Graf garis menunjukkan corak perubahan aras glukosa darah bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	100
4.3	Carta pai menunjukkan peratus tikus yang mengalami diabetik selepas enam minggu aruhan STZ dijalankan.	101
4.4	Graf bar menunjukkan bilangan kitar lengkap estrus bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	104
4.5	Graf bar menunjukkan tempoh satu kitar lengkap estrus bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	105
4.6	Graf garis menunjukkan corak perubahan jisim badan bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	116
4.7	Graf bar menunjukkan corak perubahan aras glukosa darah puasa bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	117
4.8	Graf bar menunjukkan peratus bilangan tikus yang masih hidup bagi setiap kumpulan ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	120
4.9	Graf garis dos-respons menunjukkan bahawa peratus bilangan tikus yang hidup semakin bertambah mengikut cerun peningkatan dos ekstrak AP.	121
4.10	Graf garis menunjukkan corak perubahan jisim badan bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	127
4.11	Graf garis menunjukkan corak perubahan aras glukosa darah puasa bagi setiap kumpulan tikus ujikaji di sepanjang tempoh kajian dijalankan.	131
4.12	Graf kotak menunjukkan aras insulin serum puasa bagi setiap kumpulan tikus ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	134
4.13	Graf kotak menunjukkan bilangan kitar lengkap estrus bagi setiap kumpulan tikus ujikaji sepanjang kajian dijalankan.	135
4.14	Graf kotak menunjukkan diameter pulau Langerhans bagi setiap kumpulan tikus ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	142
4.15	Graf kotak menunjukkan kepadatan bilangan sel dalam pulau Langerhans per unit luas ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup> bagi setiap kumpulan tikus ujikaji selepas enam minggu kajian dijalankan.	143

<b>No. Rajah</b>		<b>Halaman</b>
4.16	Graf bar menunjukkan peratus pertambahan jisim badan bagi setiap kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	149
4.17	Graf bar menunjukkan perbandingan jisim basah organ reproduktif dan kelenjar pituitari antara setiap kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	151
4.18	Graf bar menunjukkan perbandingan aras insulin serum antara kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	154
4.19	Graf bar menunjukkan perbandingan aras progesteron serum antara kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	155
4.20	Graf bar menunjukkan perbandingan aras FSH serum antara kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	156
4.21	Graf bar menunjukkan perbandingan aras 17beta-estradiol serum antara kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	157
4.22	Graf bar menunjukkan perbandingan aras LH serum antara kumpulan tikus ujikaji selepas tiga minggu kajian dijalankan.	158

## SENARAI GAMBAR FOTO

<b>No. Gambar Foto</b>		<b>Halaman</b>
2.1	Tumbuhan <i>Andrographis paniculata</i> (AP). Daun lanseolat yang berwarna hijau, kelihatan berminyak dan mempunyai rasa yang sangat pahit.	13
4.1	Perbandingan keadaan fizikal antara tikus kawalan normal dengan tikus aruhan diabetik selepas enam minggu kajian dijalankan.	94
4.2	Perbandingan morfologi pulau Langerhans antara kumpulan kawalan normal (A) dengan kumpulan aruhan STZ (B).	106
4.3	Perbandingan morfologi pulau Langerhans antara kumpulan kawalan normal (A) dengan kumpulan aruhan STZ (B).	107
4.4	Perbandingan keadaan fizikal antara tikus kawalan normal dengan tikus kawalan diabetik selepas enam minggu kajian dijalankan	111
4.5	Perbandingan keadaan fizikal antara tikus diabetik yang dirawat dengan ekstrak etanol AP 50% dengan tikus kawalan diabetik tanpa rawatan selepas enam minggu kajian dijalankan.	112
4.6	Perbandingan keadaan fizikal di antara tikus kawalan normal dengan tikus kawalan diabetik selepas enam minggu kajian dijalankan.	123
4.7	Perbandingan keadaan fizikal di antara tikus diabetik yang dirawat dengan ekstrak AP dengan tikus kawalan diabetik tanpa rawatan selepas enam minggu kajian dijalankan.	124
4.8	Perbandingan morfologi pulau Langerhans antara kumpulan kawalan normal (A) dengan kumpulan kawalan diabetik (B). Perwarnaan H&E. Pembesaran x100.	137
4.9	Perbandingan morfologi pulau Langerhans antara kumpulan kawalan normal (A) dengan kumpulan kawalan diabetik (B). Perwarnaan H&E. Pembesaran x400.	138



<b>No. Gambar Foto</b>	<b>Halaman</b>
4.10 Bentuk pulau Langerhans bagi tikus kumpulan diabetik yang dirawat (B: dos 50 mg/kg, C: dos 100 mg/kg, D: dos 200 mg/kg) adalah tidak simetri berbanding dengan kumpulan kawalan diabetik (A). Perwarnaan H&E. Pembesaran x100.	139
4.11 Perbandingan morfologi pulau Langerhans antara kumpulan diabetik yang dirawat (B: dos 50 mg/kg, C: dos 100 mg/kg, D: dos 200 mg/kg) dengan kumpulan kawalan diabetik (A). Pengosongan sitoplasma (a) dan bahan hialin (b). Perwarnaan H&E. Pembesaran x400.	140

**SENARAI SIMBOL DAN TATANAMA**

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\delta$	delta
$\gamma$	gamma
$^{\circ}\text{C}$	darjah celcius
%	peratus
ANOVA	analisis varians
AP	andrographis paniculata
ATP	adenosin trifosfat
BKE	bilangan kitar lengkap estrus
BSA	albumin serum bovin
BUN	nitrogen urea darah
CAT	katalase
cGMP	siklik guanosin monofosfat
CMC	karboksil metil selulos
DM	diabetes melitus
DMJI	diabetes melitus jenis I
DNA	asid deoksiribunukleik
ED <sub>50</sub>	dos efektif untuk 50% daripada populasi
ELISA	asai imuno-resapan terangkai enzim

FSH	hormon perangsang folikel
g	gram
GLUT2	molekul pengangkut glukos
GnRH	hormon pelepas gonadotrofin
HLA	antigen lokus histokesesuaian
HPLC	kromatografi cecair berprestasi tinggi
IR	julat interkuartil
IRS	reseptor insulin
KSE	kepekatan sel endokrin
LH	hormon peluteinan
M	molar
mg/kg	miligram per kilogram
mmol/L	milimol per liter
mRNA	pengutus asid ribonukleik
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
nm	nanometer
NO	nitrik oksid
OD	kepadatan optikal
OGTT	ujian toleransi glukosa oral
PARP	poli-(ADP-ribose) polimerase
pH	darjah keasidan atau kealkalian
PTH	peratus tikus yang hidup
r.p.m	pusingan per minit
SEM	min ralat piawai
SD	Sprague Dawley

SOD	superoksid dismutase
STZ	streptozotosin
TKE	tempoh kitar lengkap estrus
μm	mikrometer
WHO	pertubuhan kesihatan sedunia

## ABSTRAK

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit kronik yang dicirikan dengan hiperglisemia dan pelbagai ketaknormalan metabolik. Kerintangan insulin dipercayai menjadi salah satu faktor penyebab dalam pembentukan komplikasi diabetes. Kebanyakan data yang telah diterbitkan, menunjukkan bahawa ekstrak akues dan etanol *Andrographis paniculata* (AP) yang dikeringkan melalui kaedah vakum sejuk beku mempunyai kesan antihiperglisemik yang kuat dalam jangka masa singkat untuk menurunkan aras glukosa darah dalam haiwan jantan diabetik aruhan-STZ. Walaubagaimanapun, kajian kesan jangka panjang (enam minggu) ekstrak etanol AP yang disediakan melalui kaedah semburan kering ke atas tikus betina diabetik bukan saja perlu bahkan sangat penting. Objektif utama kajian ini adalah untuk menilai kesan ekstrak piawai etanol AP 95% ke atas tikus Sprague Dawley (SD) betina diabetik aruhan-streptozotosin dan kitar estrus tikus SD betina normal. Dalam kajian kawalan serentak ini, tikus betina yang mempunyai kitar estrus yang teratur dipilih untuk kajian dan dibahagikan secara rawak ringkas kepada lima kumpulan. Kumpulan kawalan normal dan diabetik diberi larutan karboksil metil selulos (CMC) 2% sebagai vehikel. Manakala, tiga kumpulan ujikaji diabetik yang lain diberi ekstrak etanol AP 95% masing-masing pada dos 50, 100 dan 200 mg/kg/hari secara oral selama 42 hari. Jisim badan tikus, aras glukosa darah dan insulin serum puasa diukur dan kitar estrus dinilai pada setiap hari. Pada hari terakhir eksperimen, tikus dipuasa semalaman dan dibunuh setelah dibiuis. Kemudian, sampel darah diambil untuk penentuan aras insulin serum dan tisu pankreas diambil untuk pemeriksaan histologi. Peratus tikus diabetik yang masih hidup setelah dirawat dengan

ekstrak etanol AP 95%, didapati meningkat mengikut cerun kepekatan ekstrak. Aras glukosa darah puasa didapati tidak berbeza dengan signifikan ( $p>0.05$ ) dalam tikus diabetik yang dirawat dengan ekstrak etanol AP 95% selama enam minggu berbanding dengan tikus kawalan diabetik. Tikus diabetik yang dirawat dengan ekstrak etanol AP pada dos 100 mg/kg menunjukkan penurunan aras insulin serum puasa yang signifikan ( $p<0.05$ ) berbanding dengan kumpulan kawalan diabetik. Kepadatan sel endokrin didapati meningkat dengan signifikan ( $p<0.05$ ) dalam tikus diabetik yang dirawat dengan ekstrak etanol AP pada dos 50 mg/kg berbanding dengan kedua-dua kumpulan kawalan normal dan kawalan diabetik. Pemeriksaan histologi pankreas tikus diabetik yang dirawat dengan dos 100 mg/kg ekstrak etanol AP 95% menunjukkan pembalutulihan daripada degenerasi hidrofik yang berlaku pada sel endokrin dalam pulau Langerhans berbanding dengan kumpulan kawalan diabetik. Manakala, ekstrak etanol AP 95% yang diberi kepada tikus SD betina normal selama tiga minggu pada peringkat dos 10, 100 dan 1000 mg/kg/hari, menunjukkan perbezaan yang tidak signifikan ( $p>0.05$ ) dalam peratus pertambahan jisim badan, jisim basah organ reproduktif, kitar estrus, aras hormon insulin dan aras progesteron serum berbanding dengan kumpulan kawalan normal (CMC 2%). Walaubagaimanapun, aras hormon FSH dan LH serum didapati menurun dengan signifikan ( $p<0.05$ ) dalam ketiga-tiga peringkat dos ekstrak etanol AP 95% berbanding dengan tikus kawalan normal. Hanya ekstrak etanol AP 95% pada dos 1000 mg/kg menunjukkan penurunan aras  $17\beta$ -estradiol serum yang signifikan ( $p<0.05$ ) berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Berdasarkan hasil eksperimen dan data yang sedia ada, maka diandaikan bahawa ekstrak etanol AP 95% tidak mempunyai kesan antihiperglisemik dalam tikus betina diabetik aruhan-STZ dan tidak mengganggu kitar estrus dalam tikus SD betina normal. Walaubagaimanapun, ekstrak etanol AP 95% menunjukkan keupayaan untuk meningkatkan peratus hidup

tikus diabetik, membaikpulihan degenerasi hidrofik sel endokrin akibat tindakan STZ dan meningkatkan kepadatan sel endokrin dalam pulau Langerhans tikus diabetik aruhan-STZ.

**ABSTRACT****EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF *ANDROGRAPHIS PANICULATA* (BURM. F.) NEES ON STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC FEMALE RATS**

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease, characterised by hyperglycemia and other metabolic abnormalities. Insulin resistance is believed to be one of the pathogenic factors in the development of diabetic complications. Most published data showed that both of aquaes and ethanol extract of *Andrographis paniculata* (AP) which were prepared via freeze dried vacuum technique, have strong antihyperglycemic effect in the short term to reduce blood glucose level in STZ-induced diabetic male animals. However, studies of long term effects (six weeks) of AP ethanol extract which prepared via spray dried technique on female diabetic animal is not only essential but of significant importance. The main objective of this study is to evaluate the standardized of 95% AP ethanol extract on streptozotocin (STZ)-induced female Sprague Dawley (SD) rats and on estrous cycle of normal female SD rats. In this concurrent control study, female rats with regular estrous cycle were selected and randomly divided into five groups. The normal and diabetic control groups were given carboxyl methyl cellulose (CMC) 2% as vehicle. Other three diabetic groups were treated orally with 95% AP ethanol extracts at doses 50, 100 and 200 mg/kg/day respectively for 42 days. The rats body weight, fasting blood glucose and fasting serum insulin level were measured and daily estrous cycle evaluations were performed. At the end of experiment,



rats were fasted overnight and sacrificed after anaesthetised. Then, blood sample were taken for serum insulin level determination and their pancreases were removed for histological examination. The survival percentages of AP-treated diabetic groups were seen to increased dose dependently. The fasting blood glucose level were not significantly difference ( $p>0.05$ ) in AP-treated diabetic group compared to diabetic control group after treatment with 95% AP ethanol extract for six weeks. Diabetic rats treated with 100 mg/kg 95% AP ethanol extract, showed significant decreased ( $p<0.05$ ) in the fasting serum insulin level compared to diabetic control group. Endocrine cells densities were significantly increased ( $p<0.05$ ) in 50 mg/kg AP-treated diabetic rats compared to both diabetic and normal control groups. Histological examination of diabetic rats pancreas, showed recovered from hydropic degeneration in the islet cells of Langerhans after treatment with 100 mg/kg 95% AP ethanol extract compared to diabetic control group. Meanwhile, normal female SD rats which were given 95% AP ethanol extract at doses 10, 100 and 1000 mg/kg/day for 21 days, showed no significant difference ( $p>0.05$ ) in the percentage of weight gain, wet weight of reproductive organs, estrous cycle, serum insulin and serum progesterone levels compared to normal control group (CMC 2%). However, serum FSH and serum LH levels were significantly decreased ( $p<0.05$ ) in all three doses of 95% AP ethanol extract compared to normal control group. Only, 95% AP ethanol extract at dose 1000 mg/kg showed significant decreased ( $p<0.05$ ) in serum  $17\beta$ -estradiol level compared to normal control group. Based on experimental findings and available data it is suppose that 95% AP ethanol extract have no antihyperglycemic effect in STZ-induced diabetic rats and not to disturb estrous cycle in normal female SD rats. However, 95% AP ethanol extract show some abilities of increasing the survival percentage of diabetic rats, repaired hydropic

degeneration of endocrine cells due to STZ action and increasing endocrine cells densities in the islet of Langerhans of STZ-induced diabetic rats.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Pengenalan**

Diabetes melitus adalah satu daripada lima penyakit yang menyebabkan kadar tinggi kematian penduduk dunia. Berdasarkan statistik terkini yang dikeluarkan oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) pada tahun 2004, didapati kira-kira 3.2 juta kematian berlaku pada setiap tahun akibat diabetes di seluruh dunia (WHO, 2004). Jumlah pesakit diabetes dijangka meningkat dari 171 juta dalam tahun 2000 kepada 366 juta orang menjelang tahun 2030 (Sarah *et al.*, 2004). Peningkatan kes diabetes berkait rapat dengan perubahan gaya hidup sesebuah masyarakat yang tidak mengamalkan cara hidup yang sihat daripada aspek pemakanan, penjagaan berat badan dan aktiviti riadah.

Pada tahun 2000, perangkaan global menunjukkan bahawa jumlah pesakit diabetes di Asia adalah kira-kira 22 juta orang dan dijangka meningkat sebanyak 148% mencapai tahun 2030 (Sarah *et al.*, 2004). Berdasarkan statistik dari kajian “Second National Health & Morbidity Survey” 1996, menunjukkan bahawa prevalen diabetes melitus di Malaysia adalah 8.2% iaitu meningkat sebanyak 1.9% berbanding perangkaan dari kajian “First National Health & Morbidity Survey” pada tahun 1986

(Rugayah, 1996). Maka, dipercayai bahawa prevalen penyakit diabetes akan terus meningkat dari semasa ke semasa selagi amaran dari WHO untuk mengubah cara hidup tidak diberi perhatian.

Pada masa dahulu, pesakit diabetes dirawat secara oral dengan pelbagai jenis tumbuhan perubatan berdasarkan kaedah perubatan tradisional (Akhtar & Ali, 1984). Kini pelbagai dadah sintetik digunakan untuk merawat diabetes, sebagai contoh biguanid, sulfonilurea, ti-azolidinedion dan akarbos. Kesemua dadah antidiabetik ini bernilai dalam rawatan diabetes melitus tetapi kegunaannya adalah terbatas kerana mempunyai kesan sampingan dan gagal untuk menghalang komplikasi diabetes (Bailey *et al.*, 1989.; Rang & Dale, 1991). Dadah antidiabetik ini hanya mengawal keadaan metabolik dalam pesakit dan tidak dapat memperbaiki ketidaknormalan biokimia yang berlaku dalam badan pesakit (Taylor & Agius, 1998). Faktor ini mendorong penyelidik untuk mencuba kaedah perubatan alternatif bagi mencari agen hipoglisemik yang lebih efektif dan selamat.

Salah satu tumbuhan yang dikenalpasti berpotensi sebagai antidiabetik adalah pokok Hempedu Bumi (*Andrographis paniculata*). Pelbagai kajian telah dijalankan oleh penyelidik tempatan dan luar negara untuk membuktikan bahawa tumbuhan *Andrographis paniculata* (AP) berpotensi sebagai agen antidiabetik. Berdasarkan kajian yang dijalankan oleh Mariam & Asmawi (1993), Borhanuddin *et al.* (1994) dan Husen *et al.* (2004), didapati bahawa ekstrak akues AP berupaya menurunkan aras glukosa darah secara signifikan pada haiwan aruhan diabetik. Penyediaan ekstrak etanol AP juga menunjukkan kesan antidiabetik berdasarkan kajian yang dijalankan oleh Kartini *et al.*

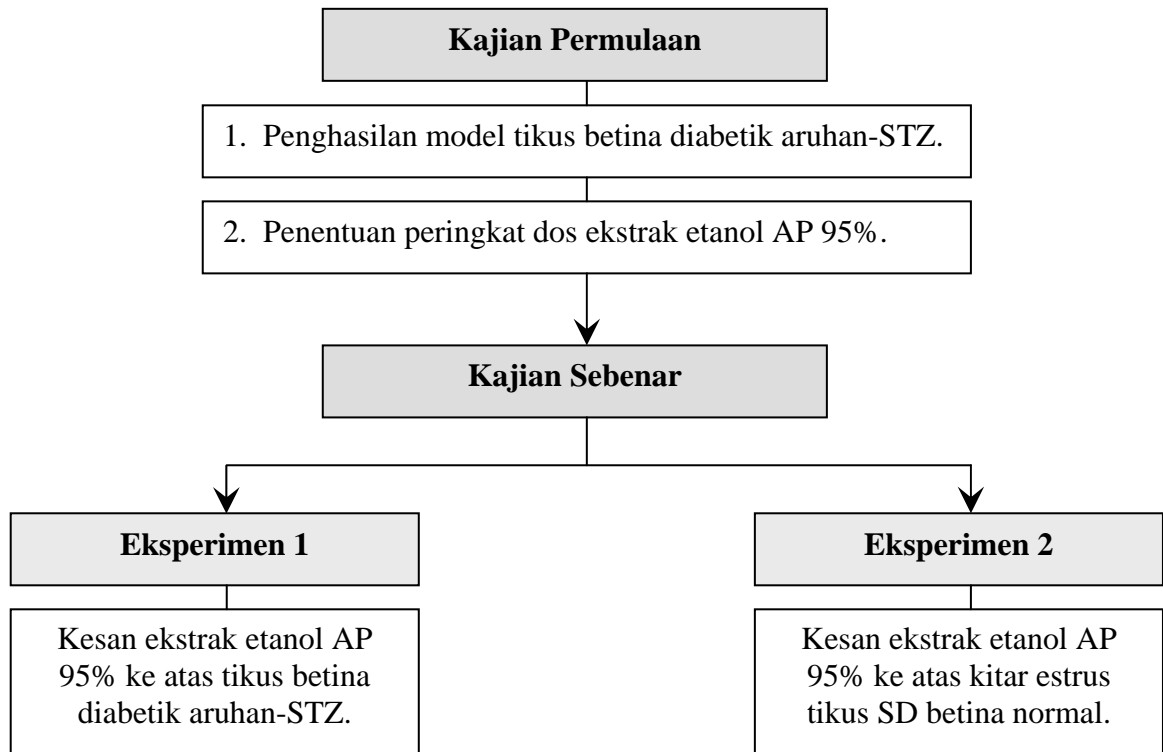
(2000) dan Zhang & Tan (2000). Maka, ternyata ekstrak AP yang disediakan berasaskan kaedah ekstrak air dan etanol mempunyai kesan antidiabetik.

Kebanyakan kajian yang lepas menggunakan ekstrak AP berasaskan air untuk menilai kesan antidiabetik ke atas subjek kajian diabetik. Manakala, kajian yang menggunakan ekstrak etanol AP pula lebih cenderung untuk melihat kesan ekstrak dalam jangka masa yang pendek (kurang daripada tiga minggu) dan menggunakan tikus jantan sebagai subjek kajian mereka. Didapati, kebanyakan kajian lepas menggunakan ekstrak yang dikeringkan melalui kaedah vakum sejuk beku dan peratus kandungan bahan aktif dalam ekstrak tidak ditentukan menggunakan teknik HPLC. Selain itu, faktor peningkatan statistik pesakit diabetes di seluruh dunia terutamanya di Malaysia dan kesedaran tentang pentingnya penerapan kaedah perubatan tradisional yang dikatakan mampu menyembuhkan penyakit ke dalam perubatan moden, merangsang minat penyelidik untuk meneruskan usaha mencari herba yang terbaik dalam perawatan diabetes. Didapati bahawa penyelidikan tentang kesan ekstrak etanol AP 95% (kaedah pengeringan 'Semburan kering') ke atas tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin (STZ) dan kesan toksik penggunaannya terhadap sistem reproduktif tikus betina normal masih belum dijalankan oleh penyelidik di Malaysia. Maka, kajian ini dijalankan untuk melihat keberkesanan rawatan jangka panjang ekstrak etanol AP dalam membantu memperbaiki ketidaknormalan aras glukosa darah dan merangsang penghasilan insulin dalam badan tikus diabetik aruhan-STZ.

Selain itu, diabetes yang dialami oleh model tikus betina diabetik secara tidak langsung mempengaruhi dan mengganggu aktiviti normal sistem reproduktif sehingga menyebabkan kitar estrus tidak teratur dan aras hormon reproduktif tidak normal. Oleh

itu, aktiviti kitar estrus dinilai dalam kajian ini untuk melihat sama ada ekstrak etanol AP mampu untuk memperbaiki ketidaknormalan yang berlaku akibat keadaan diabetik. Seterusnya kajian kedua dijalankan untuk melihat sama ada ekstrak etanol AP yang digunakan dalam eksperimen pertama memberi kesan toksik ke atas sistem reproduktif tikus betina normal. Dalam kajian kedua, untuk menilai sistem reproduktif tikus betina, sekurang-kurangnya parameter yang perlu diukur merangkumi jisim organ reproduktif, aras hormon reproduktif dan aktiviti kitar estrus.

Sebelum eksperimen sebenar dijalankan, kajian permulaan dilakukan terlebih dahulu untuk memahirkan teknik kajian dan penggunaan alat radas makmal. Selain itu, untuk mendapat pendedahan awal keadaan sebenar kajian bagi memudahkan persediaan mental, fizikal dan perancangan masa. Kajian permulaan adalah latihan untuk mempraktikkan teknik bagi mengurangkan sebarang ralat dan kesalahan dalam eksperimen supaya tidak berulang dalam kajian sebenar. Dalam kajian permulaan, dua eksperimen telah dijalankan iaitu, pertama, kajian penghasilan model tikus diabetik aruhan-STZ yang mampu bertahan sekurang-kurangnya enam minggu. Manakala, kajian permulaan kedua adalah untuk mengenalpasti dos ekstrak etanol AP yang sesuai bagi merawat tikus diabetik aruhan-STZ. Saiz sampel bagi kedua-dua eksperimen permulaan adalah kecil dan hanya terhad untuk penentuan parameter seperti jisim badan, aras glukosa darah dan kitar estrus. Penerangan lanjut tentang kajian permulaan ada dijelaskan dalam Bab III, IV dan V. Carta alir pelan penyelidikan keseluruhan ditunjukkan dalam Rajah 1.1.



**Rajah 1.1:** Carta alir pelan penyelidikan keseluruhan.

## **1.2 Matlamat dan Objektif kajian**

### **1.2.1 Matlamat kajian**

Terdapat dua matlamat utama yang perlu dicapai dalam kajian ini iaitu pertama (Eksperimen 1), untuk mencari bukti saintifik keberkesanan penggunaan ekstrak etanol AP 95% dalam merawat tikus betina diabetik aruhan-STZ. Kedua (Eksperimen 2), untuk menilai kesan toksik ekstrak etanol AP 95% ke atas kitar estrus tikus Sprague Dawley (SD) betina normal.

### **1.2.2 Objektif kajian**

Objektif kajian terbahagi kepada tiga bahagian berdasarkan eksperimen yang dijalankan seperti berikut;

#### **1.2.2 (a) Kajian permulaan**

1. untuk menghasilkan model tikus betina diabetik aruhan-STZ yang mampu bertahan sekurang-kurangnya enam minggu.
2. untuk menentukan dos ekstrak etanol AP yang sesuai bagi merawat tikus betina diabetik aruhan-STZ.



**1.2.2 (b) Eksperimen 1: Kesan ekstrak etanol *Andrographis paniculata* 95% ke atas tikus betina diabetik aruhan-streptozotosin**

1. untuk menilai kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas aras glukosa darah puasa, hormon insulin serum puasa dan kitar estrus tikus betina diabetik aruhan-STZ.
2. untuk melihat kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas keadaan fizikal dan jisim badan tikus betina diabetik aruhan-STZ.
3. untuk menilai kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas histologi pulau Langerhans tikus betina diabetik aruhan-STZ dari aspek morfologi, saiz dan kepadatan sel.

**1.2.2. (c) Eksperimen 2: Kesan ekstrak etanol *Andrographis paniculata* 95% ke atas tikus Sprague Dawley betina normal**

1. untuk melihat kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas kitar estrus tikus betina SD normal.
2. untuk membandingkan kesan ekstrak etanol AP 95% pada dos yang berbeza ke atas aras hormon insulin, progesteron,  $17\beta$ -estradiol, LH & FSH serum.
3. untuk menilai kesan ekstrak etanol AP 95% ke atas jisim badan & jisim basah organ reproduktif (ovari, uterus, vagina) dan jisim kelenjar pituitari tikus betina SD normal.

### **1.3 Skop kajian dan had kajian**

Kajian ini melibatkan penyelidikan herba yang merangkumi aspek penyediaan ekstrak etanol AP secara piawai. Teknik penyediaan ekstrak etanol secara piawai dalam kajian ini bermaksud kandungan bahan aktif dalam ekstrak yang digunakan dinilai menggunakan teknik HPLC. Di samping itu, ekstrak etanol AP 95% disediakan oleh syarikat farmaseutikal tempatan yang mengamalkan “Good Laboratory Practice” (GLP) dalam etika kerja dan mendapat pengiktirafan “International Standard Organisation” (ISO) daripada kerajaan Malaysia. Rawatan diabetes melitus dilakukan secara oral berdasarkan kaedah perubatan tradisional. Model tikus betina diabetik aruhan-STZ digunakan sebagai ganti kepada subjek manusia. Selain itu, kesan toksik ekstrak etanol AP juga dijalankan ke atas kitar estrus tikus betina SD normal. Sebarang perubahan biokimia yang berlaku ke atas sistem biologi tikus kajian dinilai dengan menggunakan kaedah asai hormon ELISA dan glukometer elektronik. Teknik histologi diaplikasikan dalam pemeriksaan mikroskopik tisu pankreas yang diwarnakan dengan perwarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E).

### **1.4 Hipotesis kajian**

Berdasarkan kajian lepas, pemikiran dan cerapan awalan, beberapa senarai hipotesis penyelidikan telah dibentuk untuk menguji sama ada hipotesis tersebut akan ditolak atau diterima menggunakan ujian statistik yang sesuai. Hipotesis kajian merangkumi seperti berikut;

1. Terdapat perbezaan jisim badan, jisim basah organ reproduktif (ovari, uterus, vagina) dan kelenjar pituitari antara kumpulan tikus yang diberi ekstrak etanol AP dengan kumpulan tikus kawalan yang tidak dirawat.
2. Terdapat perubahan aras glukosa darah puasa dan hormon (insulin,  $17\beta$ -estradiol, progesteron, FSH dan LH) antara kumpulan tikus yang diberi ekstrak etanol AP dengan kumpulan tikus kawalan yang tidak dirawat.
3. Terdapat perbezaan kesan ekstrak etanol AP antara dos 50, 100 dan 200 mg/kg yang diberi kepada tikus diabetik aruhan-STZ.
4. Terdapat perubahan dalam bilangan dan tempoh kitar lengkap estrus antara kumpulan tikus yang diberi ekstrak etanol AP dengan kumpulan tikus kawalan yang tidak dirawat.
5. Terdapat perubahan histologi yang berlaku pada pulau Langerhans dalam tisu pankreas antara kumpulan tikus yang diberi ekstrak AP dengan kumpulan tikus yang tidak dirawat.

### **1.5 Manfaat kajian**

Kejayaan sesuatu penyelidikan bergantung kepada sejauh mana hasil eksperimen dapat memberi manfaat kepada masyarakat umum dan negara. Hasil kajian ini diharapkan dapat menyediakan suatu teknik rawatan alternatif bagi pesakit diabetes dengan menggunakan produk daripada tumbuhan semulajadi. Dengan itu, herba tempatan yang mempunyai nilai perubatan yang tinggi dapat dikomersilkan baik di dalam atau di luar negeri sebagai bahan asas untuk rawatan diabetes. Selain itu, produk perubatan baru yang mempunyai nilai rawatan berkesan dan selamat daripada kesan sampingan boleh

dihasilkan. Maka, penggunaan dadah sintetik dan impot ubatan daripada negara barat dapat dikurangkan.

Kaedah dan teknik eksperimen yang dijalankan diharapkan dapat menjadi garis panduan kepada penyelidik dan saintis yang ingin mengkaji tumbuhan herba lain bagi merawat diabetes. Pengetahuan tentang teori dan praktikal yang dipelajari dapat diaplikasikan dalam kerja-kerja penyelidikan dan seterusnya secara tidak langsung menyumbang ilmu pengetahuan kepada masyarakat umum. Kesedaran tentang keajaiban dan kemujaraban herba tempatan dalam merawat penyakit dapat diaplikasikan dalam perubatan moden yang bersifat logik. Di samping itu, kajian ini diharapkan dapat membuka mata dan minda pengusaha-pengusaha herba tempatan supaya bertindak jujur dan mengamalkan teknik penyediaan ubatan yang betul dan bersih mengikut aliran kerja yang diterima oleh Kementerian Kesihatan Malaysia.

## BAB II

### TINJAUAN BACAAN

#### 2.1 *Andrographis paniculata*

##### 2.1.1 Kriteria botanikal *Andrographis paniculata*

*Andrographis paniculata* (AP) adalah tumbuhan herba jenis dikotiledon yang berasal daripada famili *Acanthaceae*. Nama saintifik bagi tumbuhan ini ialah *Andrographis paniculata* (Burm. f.), Nees (Christopher & Hoffman, 1990). Selain itu, AP juga dikenali sebagai *Andrographis subspathulata* Burm. f., *Andrographis paniculata* Wall ex. Nees dan *Justicia paniculata* Burm. f. Nama AP adalah berbeza mengikut bahasa iaitu “Hempedu bumi” dalam bahasa Melayu dan “King of Bitter”, “The creat”, “Creyat root”, “Halviva”, “Kariyat”, “Green Chiretta”, “Kreat” dan “Chiretta” dalam bahasa Inggeris (Naiyana, 2002), Kalmegh (Bengali), Kiryat (Hindi), Chaun xin lian (Bahasa Cina), Fa thalaai (Thailand), Cong Cong (Vietnam), Sambiloto atau Sambiroto (Jawa) dan Ros des amers (Perancis).

Dari segi morfologi tumbuhan, AP mempunyai batang berwarna hijau gelap, berbentuk segi empat, berdiameter dalam julat 2-6 mm dan bercabang-cabang. AP mempunyai daun ringkas dan lebar yang berbentuk lanseolat, panjangnya mencapai

8 cm, licin, bersempadan penuh, peruratan jenis pinat dan mempunyai tangkai daun yang sangat pendek. Saiz daun mengecil apabila pokok mencapai kematangan. AP mempunyai bunga jenis panikel yang kecil dan berwarna putih, biseksual dengan dua korola yang bersaiz kira-kira 1.1 cm panjang dan dilitupi oleh rerambut halus. Bunganya mempunyai lima sepal yang berwarna hijau, sebahagiannya gamosepalus dan dilitupi oleh rerambut kelenjar. Terdapat dua stamen pada hujung setiap anter. Filamennya berbentuk rata, berbulu dan mengunjur keluar dari tiub korola. Selain itu, AP mempunyai buah kecil berbentuk kapsul yang berkembar dan mempunyai rasa yang sangat pahit. Buahnya bersaiz 2-3 cm panjang, elastik apabila matang dan mengandungi 6-10 biji benih. (lihat gambar foto 2.1)

Dari aspek penyebaran geografi, AP boleh ditemui di dalam hutan malar hijau, hutan korniferus, hutan daun luruh dan semak di tepi-tepi jalan. AP tumbuh dengan baik di kawasan tropika dan subtropika Cina dan Asia Tenggara. AP boleh tumbuh dalam pelbagai jenis tanah dan ia merupakan satu-satunya pokok yang boleh tumbuh dalam tanah jenis “serpentin”. Tanah jenis ini mengandungi logam jenis aluminium, zink dan tembaga. AP berasal dari selatan India dan Sri Langka, dan boleh ditemui di India dari Himachal Pradesh hingga ke Assam dan Missoram. Pokok ini telah tersebar ke seluruh negara Asia tropikal dan dikenali dengan nama yang berbeza mengikut lokasi.

### **2.1.2 Komposisi kimia *Andrographis paniculata***

Mengikut laporan dari Institut Penyelidikan Herba Cina Sichuan (1973), didapati bahawa bahan kimia utama yang diasingkan oleh Boorsma pada tahun 1896 dalam AP ialah Andrografolid. Kristal Andrografolid mempunyai rasa yang sangat pahit dan



**Gambar foto 2.1:** Tumbuhan *Andrographis paniculata*. Daun lanseolat yang berwarna hijau, kelihatan berminyak dan mempunyai rasa yang sangat pahit.

wujud dalam bentuk hablur tanpa warna. Pada tahun 1911, Corter mengesahkan bahawa bahan ini adalah berbentuk lakton. Terdapat empat jenis lakton dalam AP iaitu deoksiandrografolid (Andrographis A), andrografolid (Andrographis B), neoandrografolid (Andrographis C) dan deoksididehidro-andrografolid (Andrographis D) (Deng, 1982). Bahan kimia lain yang mempunyai prinsip pahit adalah diterpenoid viz deoksiandrografolid, -19-D-glukosid. Unsur bahan kimia aktif AP telah dikenalpasti iaitu diterpene lakton (Tang & Eisenbrandt, 1992) dan flavanoid (Zhu & Liu, 1984., Kuroyanagi *et al.*, 1987). Kepekatan diterpen lakton dalam AP bergantung kepada kawasan tanaman dan juga musim. Daun AP mempunyai jumlah komponen aktif yang tertinggi manakala biji benihnya didapati mengandungi amaun komponen aktif terendah (Sharma *et al.*, 1992). Kepekatan tinggi komponen aktif dalam AP boleh didapati sebelum pokoknya berbunga.

### **2.1.3 Penghasilan serbuk *Andrographis paniculata***

Di Malaysia, AP biasanya tumbuh di kebun-kebun belakang rumah atau ditanam dalam pasu untuk kegunaan perubatan tradisional secara persendirian. Kini tumbuhan ini mula ditanam di pusat penyelidikan dan jabatan pertanian untuk kajian potensi bahan perubatan. Berdasarkan kaedah penanaman dalam “The Green Pharmacy of Malaysia” (Zhari *et al.*, 1999), biji benih AP dibiarkan bercambah di tapak semaian selama 30 hari sebelum dipindahkan ke kebun tanaman. Jarak di antara setiap pokok yang ditanam adalah 1m x 1m supaya pokok dapat tumbuh dengan ketinggian mencapai 85 cm. Sehingga kini tidak terdapat laporan tentang masalah serangan penyakit dan serangga ke atas tumbuhan AP. Pengetaman daun AP untuk penyediaan ubat boleh dilakukan selepas dua bulan tempoh penanaman iaitu sebelum pokok AP berbunga. Mengikut



kajian yang dijalankan oleh Suwanbareerak & Chaichantipyuth (1991), pengetaman pokok AP yang dilakukan dalam tempoh usia 110 hingga 150 hari, menunjukkan peratus kandungan bahan aktif yang tinggi berbanding dengan masa pengetaman yang lain. Selepas proses pengetaman dilakukan, AP dibasuh dalam air dan kemudiannya dipotong kepada kepingan-kepingan yang kecil sebelum dehidrasi dalam peti ketuhar bersuhu 50°C sehingga kering sepenuhnya. AP yang telah kering dikisar menggunakan mesin pengisar dan dimasukkan ke dalam beg plastik kedap udara sebelum disimpan dalam bilik sejuk pada suhu 10°C. Serbuk AP dipastikan disimpan dalam tempoh tidak melebihi satu tahun kerana jumlah diterpene laktone dalam AP akan berkurangan sehingga 25% setiap tahun (Naiyana, 2002).

#### **2.1.4 Kegunaan *Andrographis paniculata* sebagai tumbuhan perubatan tradisional**

AP merupakan tumbuhan herba yang berpotensi untuk kegunaan perubatan kerana mempunyai spektrum farmakologi yang luas (Yeung *et al.*, 1987) seperti anti-alergi, anti-fertiliti, anti-filariasis, anti-fungus, anti-hepatotoksik, anti-venom, anti-tifoid, anti-ulser, anti-asma, anti-diarea, anti-jaundis, anti-gonorea, anti-leishmaniasis, anti-inflamatori, anti-bakteria, anti-periodik, anti-peretik, anti-trombotik, anti-virus, perangsang imuniti dan vermisisidal.

AP kerap digunakan oleh kebanyakan penduduk dunia untuk merawat demam, sakit tekak, herpes, infeksi trak respiratori atas, mengurangkan inflamasi dan menghentikan diarea (Naiyana, 2002). Dalam perubatan tradisional Cina, AP dikenali sebagai herba yang mempunyai sifat penyejuk kerana keupayaannya mengeluarkan

kepanasan daripada badan seperti dalam keadaan demam dan keracunan toksin (Bensky & Gamble, 1993). Selain itu, AP digunakan secara meluas dalam perubatan Cina sebagai anti-inflamasi dan dadah anti-piretik untuk rawatan demam dan laringitis. Di India, AP digunakan sebagai tonik untuk rawatan disentri dan diarea. Campuran beberapa spesis daun AP yang ditumbuk menjadi pelet, dapat merawat sembelit, mengurangkan pecah-pecah kulit dan menambahkan selera makan. Selain itu, AP juga kerap digunakan oleh masyarakat India sebagai antidot kepada venom ular tedung.

Di Malaysia, air rebusan daun AP yang diambil secara oral dikatakan berupaya merawat diabetes dan hipertensi (Ahmad & Asmawi, 1993). Manakala, daun dan akar AP digunakan untuk merawat demam, gangguan perut dan sebagai anti-helmin. Daun AP juga boleh dituam pada kulit yang gatal dan luka akibat gigitan serangga. Selain itu, AP digunakan untuk merawat penyakit asma, arteriosklerosis koronari, angina pectoris dan malaria. Campuran air rebusan AP dan misai kucing (*Orthosiphon stamineus*) dipercayai berkesan dalam merawat diabetes.

### **2.1.5 Kesan sampingan *Andrographis paniculata***

Pelbagai kajian telah dijalankan ke atas AP oleh penyelidik tempatan dan luar negara untuk mengenalpasti sebarang ketoksikan akibat penggunaannya. Sehingga kini, masih belum ada laporan yang mengatakan bahawa AP tidak selamat digunakan untuk merawat sesuatu penyakit. Berdasarkan laporan oleh Sandberg (1994), didapati bahawa tiada kesan toksik yang akut berlaku ke atas haiwan yang diberi ekstrak AP dengan dos yang tinggi iaitu sebanyak 1-10 g/kg jisim badan pada setiap hari. Kajian yang dilakukan oleh Huang (1978), mendapati bahawa mencit yang diberi ekstrak AP secara

oral dengan dos 10 g/kg jisim badan sekali sehari untuk selama tujuh hari, tidak mati selepas menjalani tempoh eksperimen tersebut. Ini adalah dos tertinggi yang boleh menyebabkan mencit mengalami keletihan. Tetapi tiada perubahan histologi yang berlaku di dalam organ dalaman mencit tersebut.

Kajian toksisiti jangka panjang turut dijalankan ke atas subjek manusia yang diberi ekstrak AP dengan dos 50-80 mg/kg jisim badan selama dua bulan. Namun, hasil kajian tidak menemukan sebarang kesan toksik (Barilla, 1999). Subjek kajian yang diberi ekstrak AP, tidak mengalami sebarang perubahan dalam fungsi hepar dan renal serta bilangan sel darah dan biokimia darah (Hancke *et al.*, 1995). Namun begitu, kajian yang dijalankan oleh Akbarsha & Murugaian (2000), menunjukkan bahawa tikus jantan mengalami kemandulan apabila diberi ekstrak AP dengan dos 20 mg/hari selama 60 hari dan pada mencit betina dengan dos 2 g/kg jisim badan selama enam minggu (Zoha *et al.*, 1989) serta boleh menyebabkan keguguran berlaku jika diambil semasa hamil (Sandberg, 1994).

Walaupun, kajian yang dijalankan oleh Burgos *et al.* (1997), menunjukkan bahawa ekstrak AP tidak menyebabkan toksisiti subkronik dalam tikus jantan apabila diberi mengikut dos 20, 200, dan 1000 mg/kg jisim badan sekali sehari selama 60 hari. Secara keseluruhannya, ekstrak AP mempunyai kesan toksik yang sangat rendah bergantung kepada jumlah dos yang diambil dan teknik penyediaan ekstrak. Selain itu, kesan toksik ekstrak AP mungkin mempunyai kesan yang spesifik ke atas spesies haiwan tertentu kerana kajian ke atas arnab normal menggunakan ekstrak AP tidak menunjukkan kesan toksik sebaliknya dapat menghalang daripada berlakunya hiperglisemia (Borhanuddin *et al.*, 1994).

## 2.2 Diabetes Melitus

Diabetes Melitus (DM) ialah penyakit kronik yang dicirikan oleh kekurangan hormon insulin secara relatif atau total akibat tiada toleransi glukosa (Jamaludin, 1993., Chandrasoma & Taylor, 1998). Penyakit ini merupakan sindrom heterogenous (Espinal, 1989) yang disebabkan oleh pelbagai faktor seperti genetik dan persekitaran (Fajans *et al.*, 1978). Ia dicirikan oleh keadaan hiperglisemik yang kronik dan pelbagai keabnormalan metabolik akibat daripada kekurangan kesan insulin (Yasunori *et al.*, 2002). Individu tertentu boleh dikatakan menghidapi diabetes apabila mempunyai simptom seperti poliuria, polidipsia dan pengurangan berat badan serta aras glukosa darah puasanya melebihi 7.8 mmol/L atau aras glukosa plasma darah melebihi 11.11 mmol/L pada dua titik masa yang berbeza semasa ujian toleransi glukosa (OGTT) dijalankan.

Pengelasan terbaru diabetes berdasarkan etiologi dibahagikan kepada diabetes jenis I, diabetes jenis II, diabetes melitus gestasi dan diabetes akibat mekanisme tertentu atau penyakit lain (WHO, 1999). DM jenis I dicirikan oleh kekurangan insulin yang ketara akibat pemusnahan sel beta ( $\beta$ ) hasil tindakan mekanisme autoimun atau penyebab yang tidak diketahui. Penyakit ini biasanya terjadi di peringkat kanak-kanak. Manakala, DM jenis II lebih cenderung kepada golongan dewasa yang berumur lebih 40 tahun dan dicirikan oleh kombinasi kekurangan sekresi insulin dan kerintangan sel sasaran terhadap insulin atau kekurangan sensitiviti insulin. Terdapat dua terbitan diabetes jenis II iaitu obes dan bukan obes. DM yang disebabkan oleh mekanisme atau penyakit lain dibahagikan kepada dua iaitu pertama adalah diabetes akibat mutasi spesifik seperti mutasi dalam gen insulin atau dalam gen reseptor insulin dan ia

dikenal pasti sebagai penyakit turunan genetik. Manakala, kedua adalah diabetes yang berhubung kait dengan keadaan patologi atau mekanisme tertentu seperti sistik fibrosis, pankreatitis, sindrom Cushing akromegali, aruhan dadah dan anti-insulin reseptor autoantibodi.

DM gestasi adalah peringkat ketiadaan toleransi glukosa yang berlaku pada peringkat awal tempoh kehamilan. Kehamilan merupakan salah satu faktor diabetogenik yang berhubung dengan faktor turunan genetik diabetes jenis I dan II. Diabetes jenis ini akan hilang apabila tempoh kehamilan tamat. Tetapi wanita yang mempunyai diabetes jenis ini mempunyai risiko yang tinggi untuk mendapat diabetes jenis I selepas menopause. Didapati bahawa kajian ini lebih menfokuskan kepada DM jenis I kerana STZ yang mengaruhkan haiwan eksperimen bertindak memusnahkan sel-sel  $\beta$  di pulau Langerhans dan menyebabkan berlakunya kekurangan insulin dan pengurangan berat badan yang akut.

### **2.2.1 Diabetes Melitus Jenis I**

Diabetes Melitus Jenis I (DMJI) dikenali sebagai DM juvenil kerana kerap berlaku pada kanak-kanak dan orang dewasa muda yang berumur kurang daripada 30 tahun secara akut (Chambell & Smith, 1993). Puncak insiden bagi penyakit ini berlaku adalah pada sekitar umur lima tahun dan awal puberti. DMJI juga dikenali sebagai diabetes melitus bersandarkan insulin kerana pesakit memerlukan insulin eksogenus untuk mengekalkan homeostasis glukosa (Jakson, 1974) dan menghalang daripada berlakunya ketoasidosis (Chandrasoma & Taylor, 1998). Biasanya pesakit akan menunjukkan ciri-ciri klinikal seperti polidipsia, poliuria, ketoasidosis, koma, susut berat badan yang progresif, letih,

polifagia dan hilang kawalan pundi kencing pada kanak-kanak. Selain itu, DMJI dicirikan oleh kekurangan insulin secara ketara akibat kerosakkan atau penyusutan bilangan sel  $\beta$  yang teruk. Keadaan ini disebabkan oleh tiga mekanisme yang saling berkaitan iaitu persekitaran, vulnerabiliti genetik dan keautoimun (Robbins & Kumar, 1987).

Berdasarkan kajian yang dijalankan ke atas kembar monozigotik, didapati bahawa risiko untuk saudara kembarnya mendapat DMJI adalah 30-40% (Tattersell & Pyke, 1972.; Barnett, 1981.; Hawkes, 1987). DMJI berhubungkait secara signifikan dengan HLA-B8, -B15, DR3 dan DR4 yang terletak di lengan pendek kromosom 6. Penanda genetik bagi penyakit ini adalah asid amino tunggal yang terletak di lokasi 57 rantai  $\beta$  HLA-DQ. Sebarang mutasi atau ketidakhadiran asid amino tersebut boleh meningkatkan risiko dan kecenderungan untuk mendapat DMJI. Namun begitu, pradisposisi genetik dalam penyakit ini tidak sekuat seperti dalam penyakit DM jenis II (Chandrasoma & Taylor, 1998).

Sehingga kini, tiada agen persekitaran yang tepat dapat ditentukan sebagai punca kejadian DMJI tetapi beberapa faktor telah dikenalpasti iaitu infeksi virus, pemakanan dan tekanan (Dahlquist, 1994.; Knip & Akarblom, 1999). Jenis virus yang disyaki terlibat adalah enterovirus seperti Coxsackie B (Lonrot, 2000), sitomegalovirus, rubella, mononukleosis berjangkit dan virus trofik perlahan sel  $\beta$  (Robbins & Kumar, 1987). Peranan infeksi virus dalam etiologi penyakit ini disokong oleh laporan hasil kajian pemencilan virus Coxsackie B<sub>4</sub> daripada pankreas kanak-kanak semasa serangan diabetes ketoasidosis akut (Yoon, 1979). Reaksi automuniti yang berlaku akibat infeksi virus dipercayai sebagai mekanisme major dalam DMJI.

Berdasarkan kes-kes terkini, didapati bahawa 90% daripada hasil diagnosis menunjukkan kehadiran autoantibodi terhadap sel-sel dalam pulau Langerhans (Chandrasoma & Taylor, 1998). Keadaan ini boleh dilihat melalui pemerhatian mikroskopik ke atas pulau Langerhans pesakit DMJI peringkat awal serangan dengan menunjukkan kehadiran infiltrasi limfosit di dalam pulau Langerhans tersebut. Ketaknormalan pengawalaturan imun secara genetik dalam individu meninggikan lagi risiko mendapat kerosakkan sel  $\beta$  akibat infeksi virus dan pada masa yang sama mempradispos kepada tindakan autoimun. Keadaan ini berlaku apabila antigen daripada sel  $\beta$  yang rosak dikeluarkan. Ada hipotesis yang mengatakan bahawa apabila infeksi virus berlaku pada sel  $\beta$ , protein pada virus akan menyerupai protein pada sel-sel  $\beta$  dalam pulau Langerhans. Maka, rangsangan autoimun berlaku di mana sel limfosit T menyerang sel  $\beta$  (Chandrasoma & Taylor, 1998).

Berdasarkan faktor pemakanan, individu tertentu boleh mendapat DMJI apabila bayi diberi susu lembu dan makanan yang mengandungi toksin. Susu lembu yang diberi kepada bayi dipercayai mengandungi albumin serum bovin (BSA) yang dikatakan menyerupai protein dalam sel-sel  $\beta$ . Keadaan ini merangsang penghasilan antibodi oleh badan bayi dan seterusnya bertindak menyerang sel-sel  $\beta$  dalam pulau Langerhans. Situasi yang sama mungkin berlaku apabila terdedah kepada makanan yang mengandungi toksin. Toksin tertentu berkeupayaan untuk merangsang pembentukan autoantibodi terhadap sel-sel  $\beta$  yang menyebabkan insulitis berlaku. Pesakit DMJI yang tidak dirawat segera pada peringkat awal boleh menyebabkan beberapa komplikasi tertentu. Komplikasi akut termasuklah ketoasidosis dan hipoglisemia. Manakala komplikasi kronik merangkumi neuropati, retinopati, nefropati, pre-eklampsia dan keguguran bayi.

### 2.2.2 Patofisiologi Diabetes Melitus

Individu yang mempunyai sistem metabolik dan organ-organ pencernaan yang berfungsi secara normal tidak berisiko untuk mendapat diabetes jika mengamalkan cara hidup yang sihat. Biasanya, santapan normal bagi manusia terdiri daripada karbohidrat, protein, lemak, sejumlah kecil garam mineral dan vitamin. Garam mineral dan vitamin boleh diserap secara langsung oleh badan tanpa melalui proses pencernaan terlebih dahulu. Tetapi bagi bahan makanan yang mengandungi karbohidrat, protein dan lemak perlu dicernakan kepada sebatian asasnya sebelum boleh diserap oleh sel mukosa usus. Karbohidrat dicernakan di mulut, gaster, jejunum dan duodenum. Glukosa mewakili kira-kira 80% daripada hasil pencernaan karbohidrat dan bakinya terdiri daripada galaktosa dan fruktosa. Tapak pencernaan utama bagi lemak ialah di duodenum dan jejunum proksimal. Hasil pencernaan lemak terdiri daripada monogliserida, asid lemak bebas dan gliserol. Manakala protein pula dicernakan di gaster, jejunum dan duodenum. Hasil pencernaan protein terdiri daripada asid-asid amino dan peptida kecil. Kemudian kesemua hasil pencernaan ini diserap ke dalam aliran darah melalui vena portal dan aliran limfa melalui lakteal yang membekali vilus pada usus kecil. Kehadiran glukosa, asid lemak dan asid amino dalam aliran darah merangsang sel-sel  $\beta$  dalam pulau Langerhans untuk sintesis dan sekresi insulin. Insulin yang dirembeskan dalam aliran darah membantu proses metabolisme karbohidrat, protein dan lemak serta menolong menyimpan tenaga dan imbalan nitrogen yang positif (Raman *et al.*, 1995).

Kegagalan pengambilan glukosa oleh sel sasaran menjadi masalah utama gangguan metabolisme glukosa sehingga menyebabkan hiperglisemia berlaku. Keadaan ini menyebabkan glukosa diekskresi dalam urin dan situasi ini dikenali sebagai



glikosuria. Hiperglisemia tidak mengancam kesehatan badan. Akan tetapi, jika paras glukosa plasma melebihi nilai ambang renal iaitu kira-kira 10 mmol/L dan renal gagal menyerap kembali glukosa yang dituras di glomerulus renal, akibatnya diuresis osmotik berlaku. Selain itu, poliuria, dehidrasi dan kenaikan osmolariti cecair intrasel dan ekstrasel yang berlaku merangsang pusat dahaga di otak untuk minum air lebih daripada keadaan normal bagi menggantikan air yang hilang daripada badan (Catherine, 1999).

Kekurangan insulin mempercepatkan katabolisme protein dan glukoneogenesis dalam hepar. Glukoneogenesis di hepar menghasilkan asid amino yang akan digunakan sebagai sumber tenaga oleh otak dan sistem saraf. Proses ini menyebabkan penurunan berat badan dan susut otot berlaku. Selain itu, kekurangan insulin juga merangsang lipolisis dalam tisu adipos. Ini akan meningkatkan kepekatan trigliserid dan asid lemak bebas dalam plasma. Apabila metabolisme karbohidrat terganggu, hepar akan mengoksidasikan asid lemak sebagai substrat bagi penghasilan tenaga. Proses pengoksidaan ini hanya sampai ke peringkat asetil-CoA sahaja kerana dalam ketiadaan insulin, tindakbalas kimia kitaran asid sitrik terencat. Penimbunan asid-asid keto yang berlaku dalam hepar dan peresapannya ke dalam edaran darah menyebabkan asidosis metabolik. Asidosis metabolik akan merangsang pernafasan supaya menjadi dalam dan cepat (pernafasan Kussmaul) untuk kompensasi keadaan tersebut.

Kepekatan kolesterol dalam plasma juga meningkat dalam DM. Keadaan sebegini boleh meningkatkan risiko kejadian aterosklerosis terutama di salur-salur darah retina dan ginjal. Oklusi vaskular periferi akibat pembentukan plak ateromatous boleh menyebabkan gangren pada hujung anggota terutamanya kaki (Chandrasoma & Taylor, 1998).

### 2.2.3 Model tikus diabetes

Dalam kajian ini, tikus telah dipilih sebagai subjek eksperimen bagi menggantikan manusia. Walaupun tikus mempunyai struktur fizikal dan anatomi yang jelas berbeza dengan manusia, tetapi ia adalah haiwan mamalia yang mempunyai beberapa ciri fisiologi dan biokimia yang hampir menyerupai manusia terutamanya dalam aspek metabolisme glukosa melalui perantaraan hormon insulin. Menurut kajian yang dijalankan oleh Michael *et al.* (2003), didapati bahawa tikus yang diaruh STZ berkeupayaan untuk menjadi model DM yang boleh menggantikan pesakit diabetes. Di samping itu, kos penjagaan dan pembelian haiwan ini adalah rendah dan mempunyai tempoh gestasi yang pendek untuk membiak. Pengurusan dan penjagaannya tidak merumitkan serta tinjauan fizikal ke atas tikus selepas rawatan mudah diselidiki.

Terdapat pelbagai jenis tikus yang boleh dipilih dan digunakan sebagai subjek eksperimen. Dalam kajian ini jenis tikus yang digunakan ialah Sprague-Dawley albino (SD). Tikus SD telah diterima umum sebagai subjek eksperimental dalam kebanyakan disiplin penyelidikan bioperubatan termasuklah bidang toksikologi dan farmakologi. Tikus SD dikenalpasti berada di bawah order rodentia dan berasal dari famili muridae. Nama saintifiknya ialah *Rattus norvegicus*.

Tikus boleh mendapat diabetes melalui dua kaedah iaitu secara eksperimental atau spontan. DM secara eksperimental boleh dihasilkan melalui kaedah operasi (Von Mering & Minkowski, 1980) atau aruhan agen diabetogenik. Teknik operasi melibatkan pembuangan sebahagian atau keseluruhan tisu pankreas yang mengakibatkan keadaan diabetes yang kekal pada haiwan. Manakala, pengaruh bahan kimia dalam haiwan