

## Kertas Asli/Original Articles

# Profil Toksikologi Ekstrak Heksana *Alpinia conchigera* (Lengkuas Kecil) Secara In vitro (Toxicological Profile of Hexane Extract of *Alpinia conchigera* (Small Ginger) In vitro)

AHMAD ROHI GHAZALI\*, FAZRINA HAMZAH, NORIZAH AWANG & WAN MARAHAINI WAN RAZALI

### ABSTRAK

*Alpinia conchigera* (lengkuas kecil) merupakan sejenis tumbuhan herba yang sering digunakan sebagai rawatan alternatif dalam bidang perubatan tradisional. Kajian ini dijalankan untuk menilai kesan sitotoksik, genotoksik serta mod kematian sel yang disebabkan oleh ekstrak heksana *A. conchigera* ke atas sel hepar Chang. Asai MTT selama 24 jam telah dijalankan untuk mengenal pasti peratus viabiliti sel hepar Chang setelah dirawat dengan ekstrak heksana *A. conchigera*. Keputusan menunjukkan terdapat penurunan viabiliti sel secara signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  (8.6  $\mu\text{g/ml}$ ) berbanding kawalan negatif. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  ini, pewarnaan AO/PI dilakukan untuk menentukan mod kematian sel hepar Chang iaitu sama ada secara apoptosis atau nekrosis. Didapati bahawa terdapat perbezaan secara signifikan ( $p < 0.05$ ) bagi mod kematian sel hepar Chang secara apoptosis berbanding kawalan negatif. Dalam kajian ini, penentuan tahap kerosakan DNA sel hepar Chang turut dilakukan dengan menggunakan asai komet beralkali dengan nilai  $IC_{10}$  dan  $IC_{25}$  yang diperoleh daripada asai MTT (4  $\mu\text{g/ml}$  dan 6  $\mu\text{g/ml}$ ) masing-masing. Setelah sel hepar Chang dirawat dengan ekstrak heksana *A. conchigera* selama 2 jam, didapati terdapat perbezaan secara signifikan ( $p < 0.05$ ) bagi peratus kerosakan DNA bagi kumpulan rawatan berbanding kawalan negatif. Kesimpulannya, ekstrak heksana *A. conchigera* memberi kesan sitotoksik dan genotoksik terhadap sel hepar Chang serta menyebabkan kematian sel secara apoptosis.

**Kata kunci:** *Alpinia conchigera*; sitotoksik; genotoksik

### ABSTRACT

*Alpinia conchigera* (small ginger) is a herbaceous plant that is usually used as an alternative treatment in the field of traditional medicine. This study was conducted to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity and mode of cell death of hexane extract of *A. conchigera* towards Chang liver cells. The 24 hours MTT assay as carried out to determine the viability percentage of Chang liver cells after being treated with hexane extract of *A. conchigera*. The results showed that there was a significant decrease in cell viability ( $p < 0.05$ ) and  $IC_{50}$  value of hexane extract of *A. conchigera* was 8.6  $\mu\text{g/ml}$  compared to negative control. Based on this  $IC_{50}$  value, AO/PI staining was done to determine the mode of cell death in liver Chang cells by means of apoptosis or necrosis. The results showed that there was a significant change ( $p < 0.05$ ) for mode of Chang liver cells death through apoptosis compared to negative control. In this study, the evaluation of DNA damage was also done using alkaline comet assay. The  $IC_{10}$  and  $IC_{25}$  values of 4  $\mu\text{g/ml}$  and 6  $\mu\text{g/ml}$  respectively that were obtained in MTT assay were used. Chang liver cells were treated with *A. conchigera* hexane extract for 2 hours. There was a significant change ( $p < 0.05$ ) for percentage of DNA damage in treated group compared to negative control. As a conclusion, hexane extract of *A. conchigera* gave cytotoxic and genotoxic effect towards Chang liver cells as well as to induce cell death through apoptosis.

**Keywords:** *Alpinia conchigera*; cytotoxic; genotoxic

### PENGENALAN

Toksikologi meliputi kajian terhadap kesan mudarat akibat fenomena fizikal seperti jenis radiasi, bunyi dan sebagainya. Dalam kehidupan seharian kita, terdapat pelbagai jenis bahan sama ada bahan sintetik atau semulajadi yang boleh mendatangkan kesan toksik terhadap pelbagai sel tubuh. Tambahan lagi, bahan ini juga mempunyai potensi untuk dijadikan sebagai bahan asas untuk merawat penyakit.

Masyarakat dahulu bukan sahaja menggunakan tumbuhan sebagai sumber penting bahan makanan, malah turut dijadikan sebagai sumber perubatan tradisional (Muhamad & Mustafa 2010). Dianggarkan, terdapat lebih kurang 250 000 spesis tumbuhan berbunga di seluruh dunia dan daripada jumlah ini, kira-kira 150 000 spesis ditemui di negara tropika dan hampir 5% spesis telah diuji secara saintifik bagi mengenalpasti komponen aktifnya (Prance 1997). Hampir kebanyakan spesis yang dilaporkan mempunyai potensi perubatan yang tersendiri.

*A. conchigera* merupakan salah satu jenis tumbuhan yang digunakan dalam amalan masyarakat Melayu dan dikenali sebagai lengkuas ranting, lengkuas kecil, lengkuas padang, chengkenam, jerunang dan rumput kelemoyang di kalangan masyarakat Melayu. Spesies ini berasal daripada genus *Alpinia* dan tergolong di dalam famili Zingiberaceae. Tumbuhan herba sering kali ditemui di bahagian timur Bengal serta selatan Semenanjung Malaysia dan Sumatra.

Dalam bidang perubatan, tumbuhan ini telah menunjukkan aktiviti antibakteria dan antifungus terhadap kulit manusia (Muhammad Nazrul et al. 2010). Selain itu, aktiviti antiinflamatori turut ditunjukkan oleh tumbuhan ini (Tram et al. 2007). Penggunaan *A. conchigera* tidak hanya terhad dalam penggunaan perubatan tradisional sahaja, malah turut digunakan di dalam masakan. Menurut Pongpiriyadacha et al. (2008), rizom tumbuhan herba ini sering digunakan sebagai bahan perasa di dalam makanan.

Namun begitu, penggunaan tumbuhan semulajadi sebagai ubat, tanpa mengetahui kesan sampingan jangka masa pendek mahupun jangka masa panjang adalah berisiko untuk diaplikasikan. Maka, kajian ini dijalankan bagi mengkaji tahap keselamatan penggunaan dan kesan secara sitotoksik dan genotoksik ekstrak heksana *A. conchigera* terhadap sel hepar Chang. Langkah ini penting bagi mendapatkan dos dan tempoh rawatan yang berkesan sebelum sesuatu potensi hasilan semulajadi dipasarkan.

## BAHAN DAN KAEDAH

### EKSTRAK HEKSANA *A. conchigera*

Ekstrak heksana *A. conchigera* telah disediakan oleh En. Mohd Isa bin Wasiman dari Pusat Penyelidikan Perubatan Herba (HMRC), Institut Penyelidikan Perubatan (IMR). Tumbuhan herba tersebut didepositkan di herbarium IMR. Larutan ekstrak heksana *A. conchigera* telah disediakan dengan melarutkan 0.01 g ekstrak ke dalam 1 ml DMSO (Fisher Scientific, UK) dan dijadikan stok yang berkepekatan 10 mg/ml (Chandrashekar et al. 2011).

### SEL HEPAR CHANG

Sel hepar Chang diperoleh daripada American Type Culture Collection (ATCC). Bernombor CCL-13<sup>TM</sup> (Rockville, USA) dan dikulturkan di Makmal Kultur Sel Herbal Medicine Research Center (HMRC), Institut Penyelidikan Perubatan (IMR), Kuala Lumpur. Flask kultur T-75 yang mengandungi media pertumbuhan lengkap RPMI-1640 (GIBCO, USA) dan diperkaya dengan 10% FBS dan 1% antibiotik penisilin/streptomisin digunakan untuk pengkulturan. Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) digunakan sebagai kawalan positif bagi ujian MTT dan asai komet beralkali.

Asai MTT telah dijalankan berdasarkan kaedah Mosmann (1983). Sebanyak  $5 \times 10^4$  sel/ml dalam 100  $\mu$ l telah diletakkan ke dalam plat 96 telaga (Nunclon<sup>TM</sup>, VWR International Inc., MD) dan diinkubasi selama 24 jam pada 37°C dengan pengudaraan 5% CO<sub>2</sub>. Sebanyak 100  $\mu$ l larutan ekstrak heksana *A. conchigera* ditambahkan ke dalam telaga dengan kepekatan tertingginya iaitu 500  $\mu$ M. DMSO 1% telah dijadikan kawalan negatif. Selepas 24 jam, 20  $\mu$ l 0.5% (w/v) larutan MTT ditambah ke dalam setiap telaga dalam keadaan gelap kerana larutan MTT sensitif pada cahaya. Selepas penderaman selama 4 jam pada suhu 37°C, 100  $\mu$ l DMSO ditambah untuk melarutkan kristal formazan yang termendak. Pengukuran kadar penyerapan (OD) pada panjang gelombang 570 nm dibaca dengan menggunakan pembaca ELISA (Infinite F200 TECAN, Switzerland). Ujian tripliket dijalankan bagi setiap kepekatan yang berbeza. Serbuk MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) yang digunakan telah dilarutkan dalam larutan salin penimbal fosfat (PBS) pada kepekatan 5 mg/ml.

### ASAI KOMET BERALKALI

Sebanyak  $5 \times 10^4$  sel/ml dalam 2 ml telah diletakkan ke dalam plat kultur 6 telaga dan dieram di dalam inkubator pada suhu 37°C dengan pengudaraan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Rawatan terhadap sel hepar Chang menggunakan larutan ekstrak heksana *A. conchigera* adalah selama 2 jam berdasarkan nilai IC<sub>10</sub> dan juga IC<sub>25</sub> peratus viabiliti sel. Rawatan bagi kawalan positif adalah selama ½ jam manakala bagi kawalan negatif (media tanpa ekstrak) adalah selama 2 jam. Selepas inkubasi selama 24 jam, sel dibasuh dengan PBS dan tripsin digunakan untuk menanggalkan sel. Sel kemudiannya telah dipindahkan ke dalam tiub 1.5 ml dan diempar pada 2500 rpm selama 5 minit. Penyediaan slaid dilakukan dengan menggunakan 0.6% (w/v) agaros (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) bertakat lebur normal (NMA) dan 0.6% agaros bertakat lebur rendah (LMA) yang membeku dicairkan dengan menggunakan ketuhar gelombang mikro. Sebanyak 100  $\mu$ l NMA dipipet ke atas permukaan slaid berfros sebelum diletakkan sisip kaca ke atas titisan NMA tersebut.

NMA dibiarkan membeku pada suhu bilik. Kemudian sisip kaca ditanggalkan perlahan-lahan supaya gel agaros yang membeku tadi tidak rosak. Sebanyak 80  $\mu$ l LMA telah dipipet ke dalam tiub 1.5 ml dan diresuspensi beberapa kali dan seterusnya dipipet ke atas lapisan NMA yang telah membeku di atas permukaan slaid berfros. Sisip kaca diletakkan di atas titisan tersebut serta dibiarkan membeku di atas ais. Larutan penimbal lisis disediakan dengan memasukkan 50 ml larutan penimbal lisis ke dalam coplin jar serta dicampur dengan 1% Triton X-100 (Sigma, USA) iaitu sebanyak 500  $\mu$ l. Setelah LMA membeku, sisip kaca ditanggal serta slaid dimasukkan ke dalam coplin jar selama 1 jam pada suhu 4°C untuk tempoh yang minimum. Selepas itu, slaid diletakkan di dalam tangki elektroforesis

yang mengandungi larutan penimbal elektroforesis (10 N NaOH, 200 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH >12). Slaid tadi dibiarkan selama 20 minit untuk proses relaksasi gegelung DNA.

Selepas tempoh 20 minit, tangki elektroforesis disambungkan kepada sumber kuasa dan elektroforesis dijalankan pada arus 300 mA, 25 V selama 20 minit. Setelah selesai proses tersebut, slaid dikeluarkan dari tangki elektroforesis dan dibilas dengan menitiskan larutan penimbal neutralisasi setitik demi setitik selama 5 minit dan diulang sehingga 3 kali. Langkah ini bertujuan untuk meneutralkan keadaan beralkali yang terhasil daripada proses elektroforesis. Selepas itu, slaid diwarnakan dengan pewarna etidium bromida (EtBr) dengan kepekatan 10 mg/ml. Sebanyak 50 µl larutan pewarnaan EtBr dipipetkan ke atas slaid serta ditutup dengan sisip kaca. Slaid perlu disimpan di dalam bekas bertutup pada suhu 4°C dan diletakkan span atau tisu basah didalamnya untuk mengekalkan kelembapan bekas tersebut. Slaid dibiarkan semalaman untuk membolehkan pewarna tadi bertindak ke atas DNA sebelum pemerhatian di lakukan di bawah mikroskop fluoresen.

Pengiraan dilakukan pada jarak gelombang 515-560 nm, bagi menstabilkan intensiti EtBr yang mewarnakan DNA. Analisis slaid dilakukan dengan menggunakan perisian Komet 5.5. Momen ekor Olive telah dipilih untuk menilai tahap kerosakan DNA sel hepar Chang. Selain itu, pengiraan peratus DNA yang rosak juga dapat dilakukan pada sepuluh kawasan slaid yang dipilih secara rawak di mana skor 0 hingga 4 akan diberikan sebagai mewakili keterukan DNA berdasarkan panjang ekor yang terbentuk. Tetapi, di dalam kajian ini, parameter yang telah dipilih ialah momen ekor Olive dan data dipersembahkan dalam bentuk car

#### PENYEDIAAN LARUTAN PEWARNA AO/PI

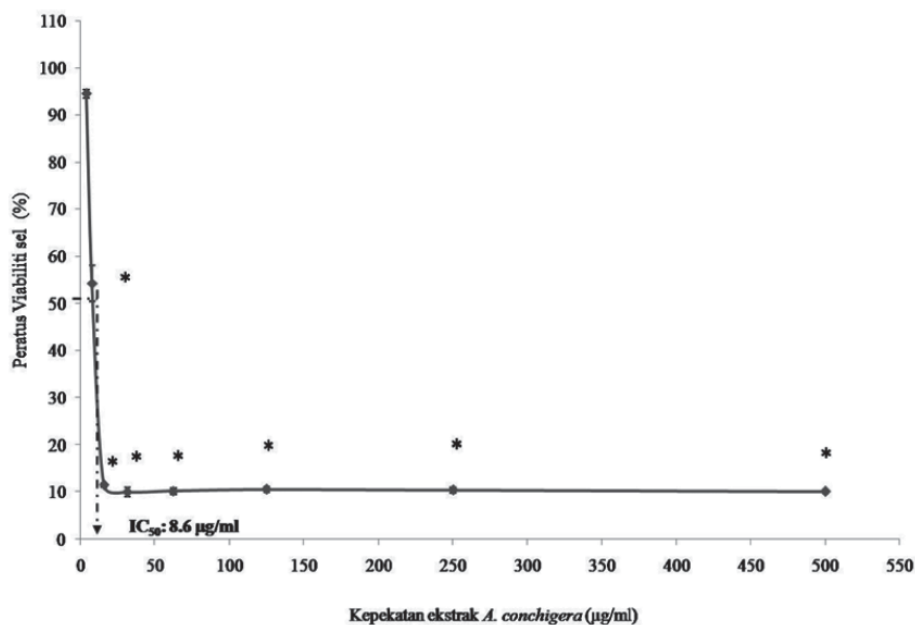
Larutan pewarna AO/PI yang disediakan adalah sebanyak 0.1% iaitu mempunyai kepekatan 10 mg/ml. Sebanyak 0.01 g serbuk akridin jingga (AO) telah dilarutkan dengan 1 ml PBS. Sebelum digunakan, larutan stok dicairkan kepada kepekatan 0.1 µg/ml. Penyediaan larutan propidium iodida (PI) juga dilakukan sama seperti penyediaan larutan AO. Kedua-dua larutan stok kemudiannya disimpan di dalam botol kaca yang disalut dengan kerajang aluminium. Penyediaan kedua-dua larutan ini telah dilakukan di dalam gelap kerana larutan ini bersifat sensitif cahaya.

#### ANALISIS STATISTIK

Penilaian statistik untuk peratus viabiliti sel dihitung menggunakan SPSS versi 19.0 dengan ujian t tidak bersandar dan anggaran  $p < 0.05$  adalah signifikan.

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

Berdasarkan hasil yang diperolehi dalam kajian ini, ekstrak heksana *A. conchigera* yang diuji berupaya menurunkan peratus viabiliti sel hepar Chang pada kepekatan yang berbeza (Rajah 1). Penurunan peratus viabiliti sel pada kepekatan ekstrak heksana *A. conchigera* 500 µg/ml telah dibandingkan dengan viabiliti sel 100% pada kawalan negatif dan nilai IC<sub>50</sub> yang diperolehi adalah 8.6 µg/ml. Hasil ini disokong lagi oleh kajian yang dilakukan oleh Noor Hasima et al. (2010), mendapati terdapat sejenis metabolit aktif iaitu 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate (AEA) yang berasal daripada ekstrak *A. conchigera* yang berupaya



\* = signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.05$ )

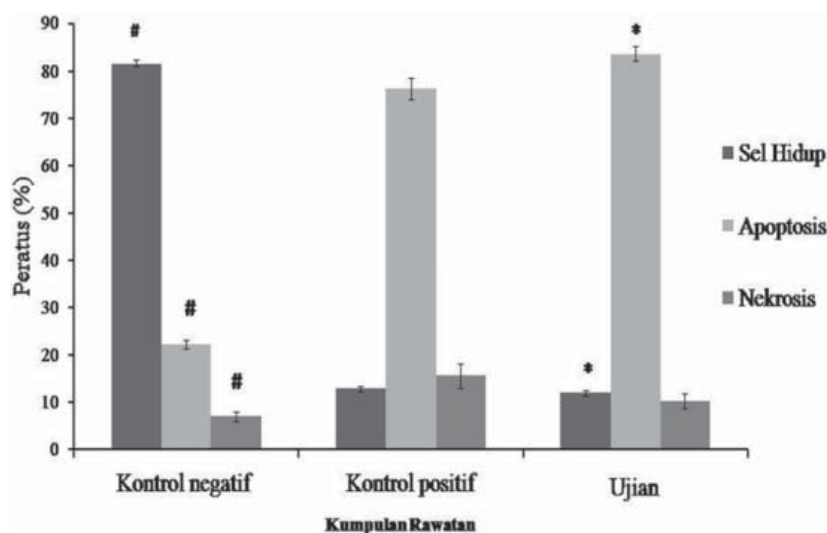
RAJAH 1. Kesan sitotoksik ekstrak heksana *A. conchigera* terhadap sel hepar Chang selama rawatan 24 jam menggunakan asai MTT (purata ± SEM, n=3)

menurunkan peratus viabiliti sel kanser payudara manusia apabila kepekatan metabolit aktif tersebut ditingkatkan. Namun begitu, kajian lanjutan mengenai ketoksikan ekstrak heksana *A. conchigera* perlu dilakukan bagi mengesahkan penemuan ini. Walau bagaimanapun, kajian oleh Khalijah et al. (2010) telah melaporkan terdapat sejenis metabolit aktif tunggal di dalam ekstrak *A. conchigera* telah dikenal pasti iaitu ACA (*1'-S-1'-acetoxychavicol acetate*). Bahan aktif ini boleh memberikan kesan toksik terhadap pelbagai sel tumor manusia iaitu sel adenokarsinoma payudara (MCF-7), karsinoma sel skuamus (HSC-2 dan HSC-4), karsinoma hepatosit (HepG2) dan karsinoma servikal epidermoid (CaSki).

Sesuatu sel yang terdedah dengan bahan asing akan cuba untuk mengadaptasikan dirinya supaya kemandirian berlaku. Apabila pendedahan bahan asing ini tidak dapat disesuaikan, sel akan membuat pemilihan samada untuk baik pulih atau membunuh diri. Sekiranya pemilihan untuk baik pulih, maka sel akan cuba memperbaiki kerosakan yang berlaku ke atasnya seperti memperbaiki bebenang DNA dengan memotong bebenang yang rosak dan membina serta menggantikannya dengan bebenang DNA yang baru. Sekiranya pemilihan sel untuk mati, maka sel yang rosak akan mengalami kematian secara apoptosis atau nekrosis. Sel yang mengalami kematian secara apoptosis akan berwarna hijau serta mempunyai nukleus yang berfragmentasi selain mengalami *blebbing*. Sel yang mengalami kematian secara nekrosis pula akan berwarna merah serta mempunyai nukleus yang normal pada peringkat awal manakala sel normal pula berwarna hijau serta mempunyai nukleus dan membran yang normal (Chan & Bennett 1999).

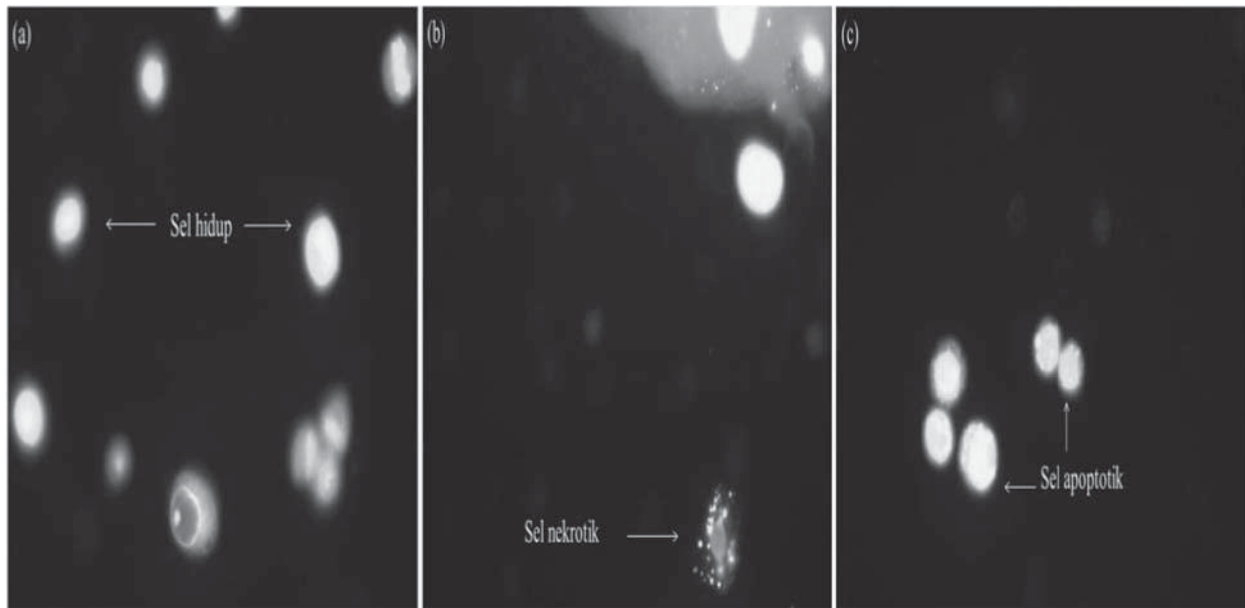
Pewarnaan AO/PI digunakan bagi menentukan mod kematian sel hepar Chang apabila dirawat dengan ekstrak *A. conchigera* selama 24 jam. Morfologi sel ditunjukkan dalam **Rajah 3**. Berdasarkan data yang diperolehi, didapati bahawa mod kematian secara apoptosis merupakan mod kematian utama bagi sel hepar Chang setelah dirawat dengan ekstrak heksana *A. conchigera* (**Rajah 2**). Hasil kajian ini adalah selari dengan kajian yang dilakukan oleh Khalijah et al. (2010) iaitu kematian sel yang disebabkan oleh *1'-S-1'-Acetoxychavicol Acetate* daripada ekstrak *A. conchigera* adalah secara apoptosis. Selain itu, kajian ini turut selari dengan kajian oleh In et al. (2011), metabolit tunggal iaitu AEA yang diasingkan daripada ekstrak rizom *A. conchigera* telah menyebabkan kematian sel adenokarsinoma payudara (MCF-7) secara apoptosis. Kematian sel secara apoptosis ini dimodulasikan melalui kepincangan terhadap tapak jalan faktor nuklear-kappa B (NF-κB) di mana berlakunya pengurangan pengekspresan pelbagai gen sasaran yang dikawalatur oleh κB.

Kesan genotoksik ekstrak ini juga telah dianalisis menggunakan perisian Komet 5.5 bagi menentukan tahap kerosakan DNA sel. Peratus momen ekor Olive digunakan dalam menilai kerosakan DNA dan keputusan ditunjukkan dalam **Rajah 4**. Kerosakan DNA diwakilkan dengan pemberian Skor 0 – 4 seperti yang ditunjukkan dalam **Rajah 5** dan **6**. Skor 0 mewakili sel yang utuh bentuknya serta tiada sebarang ekor komet yang terbentuk. Skor 1 pula menunjukkan sedikit pembentukan ekor diikuti dengan Skor 2 yang memperlihatkan ekor yang lebih panjang daripada skor 1. Pembentukan ekor ini membuatkan sel seolah-olah seperti komet. Sementara itu, pembentukan

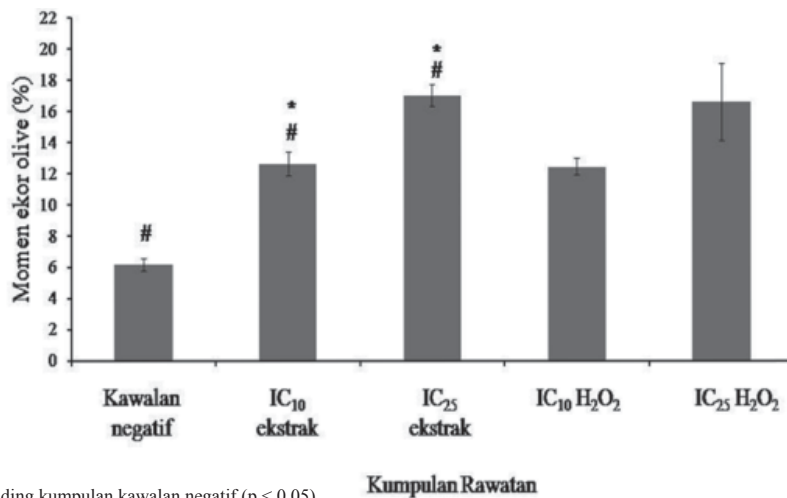


\* = signifikan berbanding kumpulan kontrol negatif ( $p < 0.05$ )  
 # = signifikan berbanding kumpulan kontrol positif ( $p < 0.05$ )

RAJAH 2. Peratusan mod kematian sel hepar Chang selepas dirawat dengan ekstrak heksana *A. conchigera* menggunakan pewarnaan AO/PI (purata ± SEM, n = 3)



RAJAH 3. Morfologi sel hepar Chang tanpa rawatan. Sel normal (a) berwarna hijau serta mempunyai struktur nukleus dan membran yang normal. Sel yang mengalami kematian secara nekrosis (b) berwarna merah dan terdapat gangguan pada nukleus, pembengkakan organel serta kelompok kromatin tidak sekata. Sel yang mengalami apoptotik awal (c) menunjukkan terdapat kondensasi kromatin yang sekata serta fragmentasi pada sarung nukleus. (40X pembesaran)



\* = signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif ( $p < 0.05$ )  
 # = signifikan berbanding kumpulan kawalan positif ( $p < 0.05$ )

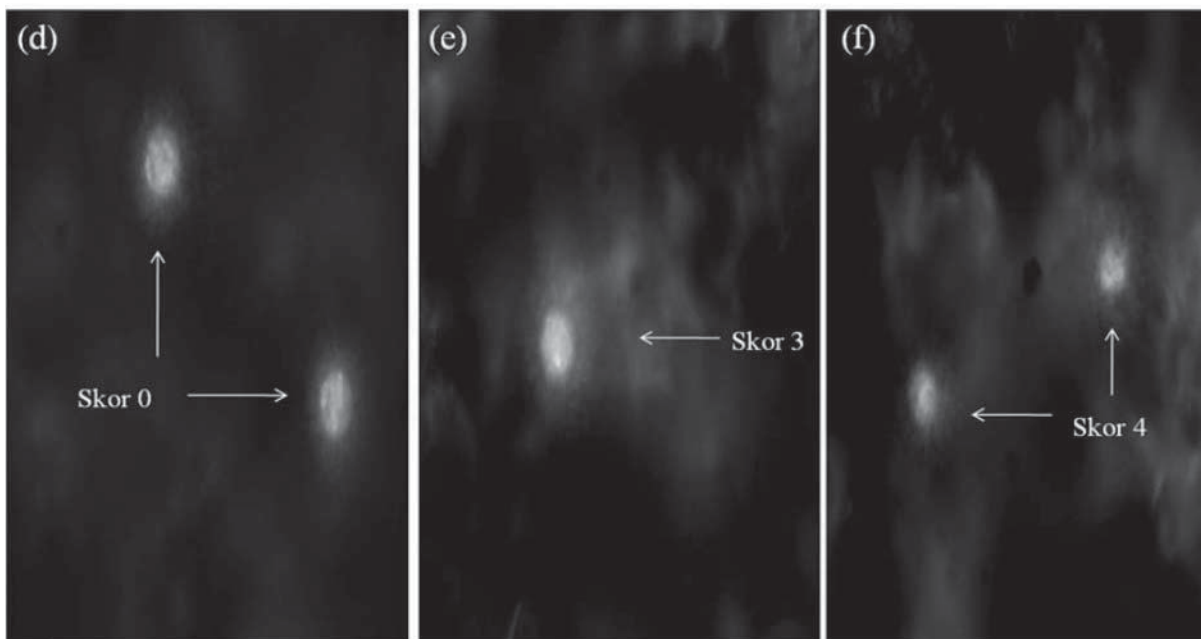
RAJAH 4. Peratusan DNA ekor sel hepar Chang selepas rawatan dengan ekstrak heksana *A. conchigera* menggunakan Asai Komet Beralkali (purata  $\pm$  SEM,  $n = 3$ )

ekor komet yang lebih panjang berlaku pada Skor 3 dan seterusnya Skor 4 mewakili kerosakan paling teruk.

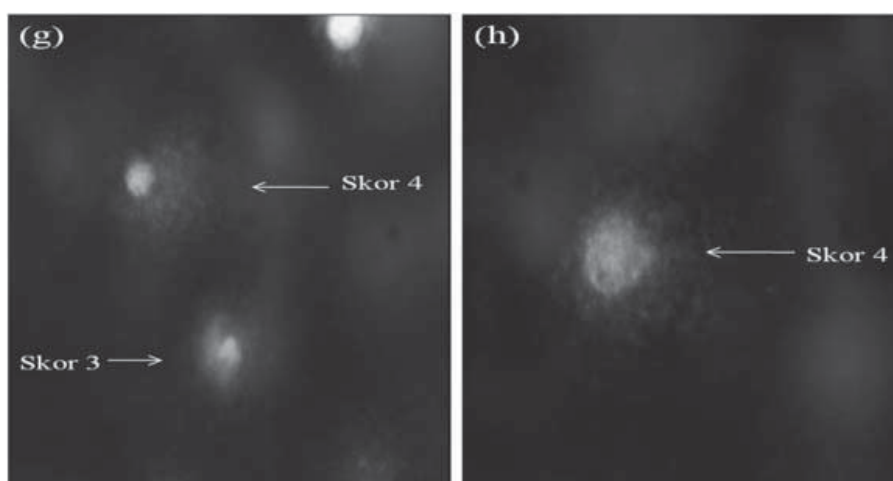
Kerosakan DNA sel hepar Chang akibat rawatan kawalan positif iaitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menyebabkan terhasilnya ekor komet yang lebih panjang berbanding kawalan negatif. Rawatan kawalan positif menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan menyerang tapak vital selular sel hepar Chang seperti DNA, membran sel, lipid dan juga protein (Zhang et al. 2010). Kadar kerosakan DNA sel hepar Chang yang disebabkan oleh ekstrak heksana *A. conchigera* adalah lebih teruk berbanding kawalan negatif dan hampir sama dengan

kawalan positif. Ini dapat ditentukan apabila ujian analisis statistik telah dijalankan dan didapati terdapat perbezaan aras bererti antara kumpulan kawalan negatif dan ujian. Berdasarkan data yang diperolehi di dalam kajian ini, didapati bahawa ekstrak heksana *A. conchigera* boleh menyebabkan kerosakan DNA sel hepar Chang.

Kajian ini juga telah menunjukkan terdapat perbezaan secara signifikan bagi keputusan asai MTT, asai komet beralkali serta penentuan mod kematian sel di dalam pewarnaan AO/PI. Ini menunjukkan terdapatnya metabolit aktif yang tertentu di dalam ekstrak heksana *A. conchigera*



RAJAH 5. Morfologi DNA sel hepar Chang selepas dirawat dengan kawalan negatif selama 2 jam (d), dan kawalan positif: IC<sub>10</sub> (e) dan IC<sub>25</sub> (f) selama ½ jam. (40X pembesaran)



RAJAH 6. Morfologi DNA sel hepar Chang selepas dirawat dengan IC<sub>10</sub> (g) dan IC<sub>25</sub> (h) ekstrak heksana *A. conchigera* selama 2 jam. (40X pembesaran)

yang boleh menyebabkan kesan toksik terhadap sel hepar Chang. Oleh sebab ekstrak heksana *A. conchigera* merupakan projek yang baru dibangunkan oleh IMR, maka tiada lagi kajian yang dilakukan untuk mengenalpasti ketoksikan yang disebabkan olehnya.

Walau bagaimanapun, terdapat kajian yang telah dilakukan oleh Tram et al. (2007) untuk mengkaji kandungan ekstrak rizom *A. conchigera*. Di dalam kajian tersebut, rizom *A. conchigera* yang telah dikeringkan dieskrak dengan menggunakan pelarut metanol. Kemudian, ekstrak metanol yang terhasil diasingkan serta dipecahkan lagi menjadi ekstrak heksana ataupun *n*-heksana iaitu merupakan isomernya yang tidak bercabang. Ekstrak

heksana ini bersifat tidak polar dan boleh melarutkan metabolit aktif yang juga bersifat tidak polar. Terdapat tiga metabolit aktif yang telah dapat dikenalpasti di dalam ekstrak *n*-heksana tersebut iaitu  $\beta$ -sitosterol, *stigmasterol* dan *cardamomin*.

Di dalam kajian tersebut, ujian untuk mengesan aktiviti antimikrob telah dilakukan menggunakan metabolit aktif yang terdapat di dalam ekstrak *n*-heksana *A. conchigera*. Berdasarkan data yang diperoleh, didapati bahawa *cardamomin* menunjukkan aktiviti antimikrob yang lebih aktif terhadap *Bacillus subtilis* berbanding metabolit aktif yang lain. Selain itu, penilaian terhadap aktiviti pemusnahan radikal bebas juga telah dilakukan

menggunakan ekstrak *n*-heksana, metanol dan etil asetat *A. conchigera*.

Didapati bahawa, ekstrak metanol dan etil asetat *A. conchigera* mempunyai aktiviti dalam pemusnahan radikal bebas sekaligus mempunyai potensi antioksidan. Sementara itu, ekstrak heksana *A. conchigera* tidak menunjukkan sebarang aktiviti pemusnahan radikal bebas atau antioksidan. Berdasarkan kajian tersebut, dapat dibuktikan bahawa terdapatnya metabolit aktif tertentu yang terkandung di dalam ekstrak heksana *A. conchigera*. Gabungan metabolit aktif inilah yang telah mendatangkan kesan toksik terhadap sel hepar Chang apabila ia dirawat dengan ekstrak heksana *A. conchigera*. Selain kehadiran sebatian bersifat sitotoksik dan genotoksik, molekul perlekatan sel epitelium iaitu sejenis glikoprotein yang diekspreskan pada lapisan epitelium juga berkemungkinan terlibat dalam kematian sel yang mana sistem ini terlibat dalam metabolisme kitar sel dan sel proliferasi (Trzpis et al. 2007) dan seterusnya membawa kepada kematian sel. Wopen et al. (2014) juga menyatakan bahawa sistem ini berguna dalam terapi kanser terutamanya sebagai penanda prognosis bagi malignan epitelium.

#### KESIMPULAN

Kajian ini dijalankan untuk menilai risiko keselamatan penggunaan *A. conchigera* dan menurut hasil yang diperoleh di dalam kajian ini, didapati bahawa tahap keselamatan penggunaan *A. conchigera* adalah rendah. Dalam kajian ini juga, terdapat beberapa limitasi, antaranya adalah penentuan bahan aktif yang hadir dalam spesies tumbuhan ini dan kemungkinan kesan toksisiti tumbuhan ini ke atas sel kanser yang lain adalah berbeza. Selain itu, masih banyak faktor lain yang perlu dipertimbangkan sebelum kesimpulan muktamad boleh dibuat mengenainya. Antara faktor lain yang perlu diambil kira ialah jumlah dos yang diambil, bioavailabiliti, tempoh masa pendedahan samada jangka masa panjang atau jangka masa pendek, kesan ke atas pelbagai sel tubuh yang berlainan serta cara pengambilannya. Oleh itu, kajian lanjut hendaklah dilakukan bagi mengesahkan penemuan ini seterusnya menghasilkan fakta baru yang berguna bagi kegunaan manusia sejagat.

#### PENGHARGAAN

Ucapan jutaan terima kasih diucapkan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) kerana telah menyediakan pelbagai kemudahan bagi melancarkan kajian ini. Seterusnya ucapan terima kasih juga kepada semua kakitangan makmal yang terlibat secara langsung atau tidak langsung. Tidak dilupakan juga ucapan terima kasih kepada semua kakitangan di Pusat Penyelidikan Perubatan Herba, Institut Penyelidikan Perubatan, Kuala Lumpur yang telah terlibat dalam kajian ini.

#### RUJUKAN

- Barboudi, A., Doulias, P.T., Nousis, L., Tenopoulou, M. & Galaris, D. 2002. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: Bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (5): 691-702.
- Chan, S.W. & Bennett, M.R. 2000. *In Vitro Detection of Apoptosis in Isolated Vascular Cells*. Totowa: Humana Press.
- Chandrashekar, G., Joshi, M. & Byregowda, S.M. 2011. Cytotoxic activity of *Tragia involucrate*. Linn. extracts. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 3(2): 67-69.
- Fire, F.L. 2009. *The Common Sense Approach to Hazardous Materials*. Ed. ke-3. USA: PennWell Corporation.
- In, L.L.A., Azmi, M.N., Ibrahim, H., Awang, K. & Nagoor, N.H. 2011. 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate: A novel phenylpropanoid from *Alpinia conchigera* enhances the apoptotic effects of paclitaxel in MCF-7 cells through NF- $\kappa$ B inactivation. *Anti Cancer Drugs* 10: 1097.
- Khalijah Awang, Mohamad Nurul Azmi, Aun, L.I.L., Ahmad Nazif Aziz, Halijah Ibrahim & Noor Hasima Nagoor. 2010. The Apoptotic Effect of 1'-S-1'-Acetoxychavicol Acetate from *Alpinia Conchigera* on Human Cancer Cells. *Molecules* 15: 8048-8059.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Muhamad Zakaria & Mustafa Ali Mohd. 2010. *Traditional Malay Medicinal Plants*. Kuala Lumpur: Institut Terjemahan Negara Malaysia Berhad.
- Noor Hasima, Aun, L.I.L., Mohamad Nurul Azmi, Ahmad Nazif Aziz, Thirthagiri, E., Halijah Ibrahim & Khalijah Awang. 2010. 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate: A new chemotherapeutic natural compound against MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine* 17: 935-939.
- Prance, G.T. 1997. Floristic inventory of the tropics: Where do we stand? In *Annals of the Missouri Botanical Garden* 64: 659-684.
- Tram, L.H., Giang, P.M. & Son, P.T. 2007. Further study on chemical constituents and biological activities of *Alpinia conchigera* Griff. (Zingiberaceae). *Journal of Chemistry* 45(2): 260-264.
- Trzpis, M., Pamela, M.J.M., Lou, M.F.H.D. & Martin, C.H. 2007. Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhesion molecule. *The American Journal of Pathology* 171(2): 386-395.
- Wang, G., Gong, Y., Anderson, J., Sun, D., Minuk, G., Roberts, M.S. & Burczynski, F.J. 2005. Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology* 42(4): 871-879.
- Wopen, H., Pietzner, K., Richter, R., Fotopoulou, C., Joens, T., Braicu, E.I., Mellstedt, H., Mahner, S., Lindhofer, H., Darb-Esfahani, S., Denker, C. & Sehouli, J. 2014. Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer. *Journal of Gynecology Oncology* 25(3): 221-228.
- Zhang, R., Kang, K.A., Piao, M.J., Kim, K.C., Kim, A.D., Chae, S., Park, J.S., Youn, U.I. & Hyun J.W. 2010. Cytoprotective effect of the fruits *Lycium Chinese Miller* against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 299-306.

Ahmad Rohi Ghazali  
Fazrina Hamzah  
Wan Marahaini Wan Razali  
Program Sains Bioperubatan  
Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan  
Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

Norizah Awang  
Pusat Penyelidikan Perubatan Herba, Institut Penyelidikan  
Perubatan (IMR), Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala  
Lumpur

Pengarang untuk dihubungi; email: rohi@fsk.ukm.my

Diserahkan: Mei 2014

Diterima untuk penerbitan: November 2014