

Jumlah Fenol, Aktiviti Antioksidan dan Ketoksikan Ekstrak Bendalir Lampau Genting (SFE) Buah *Ziziphus mauritiana*

(Total Phenol, Antioxidant Activity and Toxicity of Supercritical Fluid (SFE) Extract of *Ziziphus mauritiana* Fruit)

ARNIDA HANI TEH^{1,2*}, MUHIYUDDIN MD NASIR¹, SAIDATUL HUSNI SAIDIN³ & HAFEEDZA ABDUL RAHMAN^{1,2}

¹Department of Food Sciences, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Innovation Center for Confectionary Technology (MANIS), Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

³Herbal Product Development Programme, Natural Products Division, Forest Research Institute Malaysia (FRIM), 52109 Kepong, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Diserahkan: 25 Februari 2022/Diterima: 18 April 2022

ABSTRAK

Kajian ini menentukan jumlah fenol, antioksidan dan ketoksikan buah *Ziziphus mauritiana* yang diekstrak menggunakan pengekstrakan bendalir lampau genting (SFE). Ekstrak dianalisis untuk jumlah kandungan fenol (TPC) dan aktiviti antioksidan berdasarkan aktiviti penyingkiran radikal bebas, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Kajian ketoksikan akut dilakukan pada tikus Sprague Dawley (24 jantan, 24 betina), dibahagikan kepada 4 kumpulan; diberikan 0 (kawalan), 1, 2.5 dan 5 g ekstrak/kg berat badan. Kajian kesitotoksikan dilakukan menggunakan ujian MTT pada titisan sel V79-4 dan kajian kegenotoksikan dilakukan menggunakan Ujian Mikronukleus (MNA) dengan pewarnaan akridin jingga (AO). Ekstrak menghasilkan TPC sebanyak 539.18 mg setaraan asid galik (GAE)/100 g dan penyingkiran radikal bebas DPPH sebanyak 16.65%. Dalam kajian ketoksikan akut, semua tikus selamat tanpa bukti manifestasi klinikal atau ketoksikan. Kajian kesitotoksikan ekstrak menunjukkan kesan kesitotoksikan (IC_{50} 0.48 mg/mL). Kajian kegenotoksikan menunjukkan bahawa ekstrak tidak mempunyai kesan kegenotoksikan pada tikus yang diuji. Secara keseluruhan, ekstrak bertindak dengan cara yang berbeza, *in vivo* dan *in vitro*. Sebagai kesimpulan, ekstrak adalah sumber fenol yang baik namun tidak menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi. Ia tidak toksik dan tidak menyebabkan kegenotoksikan terhadap haiwan yang dikaji pada kepekatan sehingga 5 g ekstrak/kg berat badan. Walau bagaimanapun, ekstrak didapati sitotoksi terhadap titisan sel V79-4 yang dikaji.

Kata kunci: Antioksidan; kegenotoksikan; kesitotoksikan; ketoksikan akut; pengekstrakan bendalir lampau genting; *Ziziphus mauritiana*

ABSTRACT

This study determined the total phenolics, antioxidant and toxicity of *Ziziphus mauritiana* fruit extracted using supercritical fluid extraction (SFE). The extract was analysed for the total phenolic content (TPC) and antioxidant activity based on radical scavenging activity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Acute toxicity studies were done in Sprague Dawley rats (24 males, 24 females), divided into 4 groups; receiving 0 (control), 1, 2.5 and 5 g extract/kg body weight. Cytotoxicity studies were done using MTT assay on V79-4 cell lines, and genotoxicity studies were done using Micronucleus Assay (MNA) with acridine orange (AO) staining. The extract produced TPC of 539.18 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g and DPPH scavenging of 16.65 %. In the acute toxicity studies, all rats survived with no evidence of clinical or toxic manifestation. Cytotoxicity studies showed that the extract demonstrated a cytotoxic effect (IC_{50} 0.48 mg/mL). Genotoxicity studies showed that the extract had no genotoxic effect on the tested rats. Overall, the extract behaves in different manner, *in vivo* and *in vitro*. As a conclusion, the extract is a good source of phenolics, however, does not show high antioxidant activity. It is non-toxic and not causing genotoxicity towards the studied animals at the concentration up to 5 g extract/kg body weight. However, the extract is found to be cytotoxic towards the V79-4 cell lines studied.

Keywords: Acute toxicity; antioxidant; cytotoxicity; genotoxicity; supercritical fluid extraction; *Ziziphus mauritiana*

PENGENALAN

Ziziphus mauritiana (dikenali sebagai bidara), daripada keluarga Rhamnaceae berasal dari wilayah Indo-Malaya dan sering tumbuh di kawasan tropika dan sub-tropika seperti India, Nigeria dan China (Islam & Simmons 2006; Khairuddin & Noor Azlin 2013; Pareek et al. 2009). Buahnya bulat atau bujur, dengan kulit luar licin berkilat dan isi putih rangup. Buah *Z. mauritiana* merupakan sumber karbohidrat, protein dan mikronutrien, seperti kalsium, kalium, natrium, fosforus, kuprum, besi, vitamin C dan zink yang baik (Nyanga et al. 2013). Daripada segi potensi manfaat kesihatan, *Z. mauritiana* menunjukkan ciri antidiabetik (Marwat et al. 2014; Saidu et al. 2017), antikanser (Bhatia et al. 2011), anti-alergi, anti-radang (Talmale et al. 2015), sedatif dan hipnosis (San et al. 2013).

Kajian ini dijalankan untuk menentukan aspek penting buah ini iaitu kandungan fenolnya, aktiviti antioksidan, ketoksikan akut, kesitotoksikan dan kegenotoksikan dengan menggunakan kaedah pengekstrakan mesra alam; pengekstrakan bendalir lampau genting (SFE). SFE merupakan kaedah pengekstrakan yang cepat, selektif dan mudah. Proses pengekstrakan ini menggunakan karbon dioksida iaitu pelarut yang menjimatkan, tidak toksik dan lebih mesra alam (Machado et al. 2015). Ketersediaan data mengenai ketoksikan buah *Z. mauritiana* adalah terhad dan tidak pernah dilakukan dengan SFE.

Kajian ketoksikan akut telah dijalankan ke atas model haiwan untuk menilai pendedahan akut ekstrak SFE buah *Z. mauritiana*. Selanjutnya, kajian kesitotoksikan dan kegenotoksikan telah dijalankan untuk menentukan kesan pada peringkat sel dan kestabilan DNA. Hasil kajian ini dapat membantu menentukan keselamatan ekstrak buah ini untuk digunakan dan potensinya sebagai sumber makanan untuk kesihatan manusia.

BAHAN DAN KAEDAH

BAHAN

Sampel buah *Z. mauritiana* pada peringkat kematangan komersial diperoleh daripada petani tempatan (Saliran Mampan Sdn. Bhd.) di Raub, Pahang, Malaysia. Sampel dibersihkan dan biji dibuang sebelum dipotong, kemudian dikisar dengan pengisar (Waring, Amerika Syarikat) tanpa air, dan dikeringkan dalam ketuhar (Mimmert, Jerman) pada 50 °C.

PENGEKSTRAKAN SFE

Sebanyak 220 g sampel dimuatkan ke dalam ruang pengekstrakan SFE (THAR, USA). Sampel direndam dalam karbon dioksida lampau genting (SC-CO₂)

selama 30 minit dan diekstrak selama 120 minit. Proses pengekstrakan dilakukan pada tekanan 100 bar, dengan 10% etanol dan suhu dikekalkan pada 50 °C (Saidin et al. 2014). Kadar aliran SC-CO₂ (g/min) kekal malar pada 30 g/min. Ekstrak dikumpulkan dari ruang pengumpulan dan kemudiannya dimasukkan ke dalam pengewap putaran (*rotary evaporator*) (Eyela, Jepun) sehingga semua etanol dapat disingkirkan. Ekstrak kemudiannya dianalisis untuk jumlah kandungan fenol (TPC), aktiviti antioksidan, kajian ketoksikan akut, kesitotoksikan dan kegenotoksikan.

PENENTUAN JUMLAH KANDUNGAN FENOL (TPC)

TPC ditentukan berdasarkan Singleton dan Rossi (1965), dengan pengubahsuaian kepada sistem plat mikro (Nasir et al. 2021). Sebanyak 1 mg ekstrak dengan 1.0 mL metanol yang diasidkan (80% metanol mengandungi 1.0% asid hidroklorik dan selebihnya air suling), digoncang pada 200 rpm selama 2 jam. Campuran kemudiannya diempar (1000 × g, 15 min) dan supernatan digunakan untuk penentuan TPC dan DPPH. Sebanyak 50 µL supernatan dicampur dengan 100 µL reagen Folin-Ciocalteu dalam plat mikro 96 perigi dan dibiarkan pada suhu bilik selama 5 minit. Kemudian, 100 µL larutan natrium bikarbonat (60.0 mg/mL) ditambah dan dibiarkan pada suhu bilik selama 90 minit. Absorbans diukur pada 725 nm (Azman et al. 2019) menggunakan spektrofotometer (Fluostar Omega, BMG Labtech, Jerman). Pengiraan adalah berdasarkan lengkung piawai asid galik (Othman et al. 2020; Zayapor et al. 2021). Keputusan dinyatakan sebagai setaraan asid galik (GAE) mg/100 g sampel.

PENENTUAN AKTIVITI PENYINGKIRAN RADIKAL BEBAS (DPPH)

Aktiviti penyingkiran radikal bebas DPPH ditentukan berdasarkan Blois (1958). Sebanyak 200 µL supernatan ditambah kepada 200 µL DPPH (1 mM dalam larutan etanol) dan 600 µL etanol dalam botol ambar 5 mL. Campuran digoncang menggunakan vorteks pada 2800 rpm dan dibiarkan pada suhu bilik selama 10 minit. Absorbans diukur secara spektrofotometri (Fluostar Omega, BMG Labtech, Jerman) pada 520 nm (Shair et al. 2020). Aktiviti penyingkiran radikal bebas dinyatakan dalam % perencatan.

KAJIAN KETOKSIKAN AKUT

Kajian ini adalah mengikut piawaian ujian OECD No. 420 (OECD 2001) dengan kelulusan (FST/2018/ARNIDAHANI/28-NOV./971-DEC.2018-JAN.-2020)

daripada Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC). Tikus Sprague Dawley (berumur 8-12 minggu, berat 200 - 300 g) digunakan untuk kajian ini. Semua tikus diaklimatisasi selama 5 hari. Sebanyak 48 tikus Sprague Dawley dibahagikan kepada empat kumpulan: diberikan 0 (kawalan), 1, 2.5 dan 5 g ekstrak/kg berat badan melalui gavaj oral dos tunggal. Setiap kumpulan terdiri daripada 6 ekor jantan dan 6 ekor betina. Selepas itu, tikus diperhatikan untuk morbiditi dan mortaliti pada selang 30 minit selama empat jam selepas diberikan dos dan pada 24 jam. Tikus kemudian dipantau selama 14 hari. Berat badan, mortaliti, gejala klinikal, gejala tingkah laku, dan tanda-tanda ketoksikan diperhatikan. Suhu bilik dikekalkan pada 24 °C, dengan kitaran 12 jam cahaya dan 12 jam gelap. Pelet standard (Gold Coin Holdings Sdn. Bhd. (Malaysia)) dan air paip diberi secara *ad libitum*. Pada akhir kajian, semua tikus dimatikan menggunakan kebuk CO₂. Organ dikumpulkan, ditimbang dan diperiksa secara visual untuk sebarang perubahan. Darah dikumpulkan melalui tusukan jantung dan vena kava posterior, kemudian dianalisis untuk parameter biokimia dan penanda fungsi buah pinggang (ALP, ALT, AST, albumin, jumlah protein, jumlah trigliserida, jumlah kolesterol, kreatinin dan urea).

KAJIAN KEGENOTOKSIKAN

Kesan ekstrak terhadap pembentukan mikronukleus ditentukan berdasarkan Thomas (2007). Sebanyak 30 µL darah (daripada kajian ketoksikan akut) dipipet ke atas slaid. Filem darah disediakan dengan melalukan slip penutup kaca di sepanjang slaid. Slaid dikeringkan di udara selama 10 minit, kemudian direndam dalam metanol selama 10 minit. Slaid disimpan pada suhu bilik sebelum pewarnaan. Teknik pewarnaan pendarfluor AO digunakan untuk menilai frekuensi mikronukleus dalam sel eritrosit. Larutan stok AO disediakan dalam salin penimbil fosfat (PBS) (20 mg/mL). Slaid diwarnakan dan ditutup dengan slip penutup semasa masih basah dan diperhatikan di bawah mikroskop pendarfluor (Nikon Eclipse E600, Jepun). Jumlah bilangan eritrosit normokromatik (NCE), eritrosit polikromatik (PCE) dan eritrosit polikromatik mikronukleus (MN-PCE) per 2000 eritrosit bagi setiap slaid diperhatikan.

KAJIAN KESITOTOKSIKAN

Kajian ini dilakukan untuk menilai potensi kesitotoksikan ekstrak menggunakan ujian MTT. Titisan sel yang digunakan adalah titisan sel normal V79-4 (ATCC). Titisan sel ini terdedah kepada ekstrak pada kepekatan yang berbeza. Sebanyak 2 mg/mL ekstrak dicairkan

kepada 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL dan 0.063 mg/mL menggunakan media kultur lengkap (*Eagle's Minimum Essential Medium*, EMEM). Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 37 °C (5 % CO₂, 100 % kelembapan relatif), kemudian ditambah dengan larutan MTT (5 mg/mL) dan diinkubasi selama 4 jam. Absorbans diukur menggunakan spektrofotometer (Bio-Rad xMark, Amerika Syarikat) pada 570 nm. Keputusan dinyatakan sebagai kebolehhidupan sel (%) dan nilai kesitotoksikan dinyatakan dalam kepekatan yang merencat 50% kebolehhidupan sel (IC₅₀, mg/mL).

ANALISIS STATISTIK

Data dianalisis menggunakan perisian statistik, SPSS versi 22.0 untuk Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Nilai dinyatakan sebagai min ± sisihan piawai (SD). Analisis varians sehala (ANOVA) dan perbandingan post hoc Tukey dengan keyakinan 95% telah dilakukan dan perbezaan signifikan ditetapkan pada p<0.05.

HASIL DAN PERBINCANGAN

TPC DAN AKTIVITI ANTIOKSIDAN

Ekstrak menghasilkan TPC sebanyak 539.18 mg GAE/100g dan perencatan radikal bebas DPPH sebanyak 16.65%. Keputusan yang diperoleh dalam kajian ini didapati setanding dengan keputusan yang diperoleh oleh Koley et al. (2011) dan Rao et al. (2016) dalam buah *Z. mauritiana* di India. Koley et al. (2011) melaporkan TPC antara 172 hingga 328.6 mg GAE/100 g sampel dan kapasiti antioksidan menggunakan kaedah DPPH, antara 15.18 hingga 29.69%. Kajian tersebut membuat kesimpulan bahawa kehadiran jumlah kandungan fenol yang tinggi menunjukkan bahawa buah ini merupakan sumber antioksidan yang signifikan dan boleh memberi manfaat kesihatan. Selain itu, kapasiti antioksidannya juga didapati setanding dengan buah-buahan lain yang kaya dengan antosianin seperti plum dan strawberi. Manakala Rao et al. (2016) mendapati buah *Z. mauritiana* di India mengandungi kandungan fenol sebanyak 356.6 mg/100 g. Walau bagaimanapun, tidak dinyatakan sama ada keputusan yang dilaporkan adalah dalam GAE atau setaraan piawai lain.

Kajian oleh Ikram et al. (2009) melaporkan kapasiti TPC dan antioksidan buah *Z. mauritiana* jauh lebih tinggi (sebatian fenol 1322 mg GAE/100 g sampel, kapasiti antioksidan 57.66 ± 8.26%) daripada yang diperhatikan dalam kajian ini. Faktor yang menyumbang kepada perbezaan yang diperhatikan mungkin disebabkan oleh

faktor sampel dan kaedah pengukuran. Sampel dalam kajian mereka adalah yang tumbuh secara liar dan dikeringkan secara pengeringan sejuk beku, manakala sampel yang digunakan dalam kajian ini adalah ditanam di ladang dan dikeringkan dalam ketuhar. Bagi pengukuran aktiviti antioksidan pula, kajian mereka menggunakan kaedah pelunturan β -karotena.

KETOKSIKAN AKUT

Semua tikus selamat semasa tempoh kajian tanpa bukti manifestasi klinikal atau toksik. Tidak terdapat perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada berat badan antara kumpulan rawatan dan kawalan. Juga didapati tidak terdapat perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) terhadap berat tikus jantan dan betina antara kumpulan rawatan kawalan. Tiada perubahan signifikan ($p > 0.05$) dalam berat hati, buah pinggang, limpa, perut, usus kecil dan usus besar jika dibandingkan antara kumpulan (Jadual 1). Begitu juga, apabila data dianalisis dengan membezakan kumpulan tikus jantan dan betina.

Bagi parameter biokimia dan penanda fungsi buah pinggang, tiada perubahan signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan dalam semua pengukuran jika dibandingkan antara kawalan dan kumpulan rawatan (Jadual 2). Tiada perubahan signifikan ($p > 0.05$) juga diperhatikan jika dibandingkan dengan kumpulan pembezaan tikus jantan dan betina, kecuali perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) dalam ALP antara kumpulan jantan dan betina (Jadual 3).

Bagi kajian ketoksikan akut, boleh disimpulkan bahawa secara keseluruhan, berat badan meningkat secara beransur-ansur sepanjang tempoh kajian pada tikus jantan dan betina daripada semua kumpulan. Ini dilihat sebagai pemerhatian yang positif. Oleh kerana

tiada perubahan ketara dalam tingkah laku, berat badan dan berat organ, boleh disimpulkan bahawa pemberian dos tunggal ekstrak tidak menjejaskan pertumbuhan dan fungsi tikus dalam dos (sehingga 5 g/kg berat badan) yang dikaji. Pemeriksaan kasar organ dalaman tidak menunjukkan keabnormalan patologi jika dibandingkan dengan kumpulan kawalan. Selain itu, dapat diperhatikan bahawa tiada bukti manifestasi klinikal atau toksik pada tikus semasa tempoh kajian. Hasil kajian ini selari dengan kajian lepas yang lain oleh Suriyavadhana et al. (2011) mengenai ketoksikan akut dan sub-akut ekstrak etanol buah *Z. mauritiana*.

Tiada perubahan signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan dalam semua parameter biokimia dan penanda fungsi hati. Walau bagaimanapun, terdapat perbezaan yang signifikan bagi ALP (Jadual 3) jika dibandingkan dengan kumpulan jantan dan betina ($p < 0.05$). Namun begitu, tahap ALP bergantung kepada umur dan jantina (Lowe et al. 2017) dan kajian lepas juga menunjukkan korelasi yang positif antara tahap ALP dan berat (Khan et al. 2015) dengan tikus jantan dalam kajian ini adalah lebih berat berbanding betina. Paras urea dan kreatinin juga tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dalam kumpulan rawatan jika dibandingkan dengan kumpulan kawalan. Keputusan ini menunjukkan bahawa ekstrak tidak mengubah fungsi buah pinggang dan hati. Kumpulan yang dirawat dengan ekstrak menunjukkan sedikit trend penurunan paras trigliserida, tetapi ia tidak signifikan. Ini menunjukkan bahawa ada kemungkinan bahawa ekstrak tidak mempunyai kesan ke atas metabolisme lipid dan karbohidrat dalam tikus yang dikaji. Keputusan yang sama diperhatikan dalam kajian Suriyavadhana et al. (2011).

JADUAL 1. Kesan ekstrak SFE buah *Z. mauritiana* terhadap berat organ

Kumpulan	Hati (g)	Buah pinggang (g)	Limpa (g)	Perut (g)	Usus kecil (g)	Usus besar (g)
Kawalan	10.83 \pm 2.51	1.88 \pm 0.47	0.48 \pm 0.14	1.33 \pm 0.23	1.30 \pm 0.38	5.64 \pm 0.93
1 g ekstrak/kg	10.80 \pm 2.59	1.98 \pm 0.50	0.52 \pm 0.14	1.46 \pm 0.32	1.36 \pm 0.30	5.90 \pm 1.04
2.5 ekstrak/kg	10.97 \pm 2.30	1.99 \pm 0.49	0.47 \pm 0.16	1.43 \pm 0.32	1.33 \pm 0.31	5.70 \pm 0.92
5.0 ekstrak/kg	10.57 \pm 1.91	1.90 \pm 0.39	0.50 \pm 0.12	1.35 \pm 0.16	1.22 \pm 0.35	5.61 \pm 0.89

Nilai dinyatakan sebagai min \pm sisihan piawai (SD) untuk 12 haiwan setiap kumpulan. Tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan antara kumpulan

JADUAL 2. Kesan ekstrak SFE buah *Z. mauritiana* terhadap parameter biokimia dan penanda fungsi buah pinggang

Kumpulan				
Pengukuran	Kawalan	1 g ekstrak/kg	2.5 ekstrak/kg	5.0 ekstrak/kg
Albumin (g/L)	41.78 ± 5.99	40.52 ± 4.61	40.14 ± 3.89	42.03 ± 4.37
Jumlah Protein (g/L)	74.58 ± 8.34	73.38 ± 7.90	71.20 ± 7.38	74.24 ± 7.01
Trigliserida (mmol/L)	2.58 ± 0.61	2.62 ± 0.76	2.40 ± 0.63	2.35 ± 0.47
Kolesterol (mmol/L)	1.99 ± 0.35	2.08 ± 0.20	1.89 ± 0.21	2.01 ± 0.23
Kreatinin (µmol/L)	57.75 ± 8.02	55.08 ± 5.53	55.58 ± 5.98	55.58 ± 6.95
Urea (mmol/L)	7.82 ± 1.52	7.61 ± 1.06	7.56 ± 1.15	7.72 ± 1.09
ALP (U/L)	118.75 ± 49.82	123.92 ± 52.08	123.17 ± 52.56	123.00 ± 51.86
ALT (U/L)	40.33 ± 5.63	42.42 ± 6.42	40.92 ± 8.30	44.92 ± 6.86
AST (U/L)	81.67 ± 7.54	85.08 ± 9.71	79.25 ± 14.45	86.83 ± 7.70

Nilai dinyatakan sebagai min ± sisihan piawai (SD) untuk 12 haiwan setiap kumpulan. Tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan antara kumpulan

JADUAL 3. Kesan ekstrak SFE buah *Z. mauritiana* terhadap enzim penanda hati ALP dengan membezakan kumpulan jantan dan betina

Kumpulan	ALP* (U/L)
Jantan	
Kawalan	165.50 ± 12.14
1 g ekstrak/kg	173.00 ± 13.13
2.5 ekstrak/kg	173.00 ± 9.57
5.0 ekstrak/kg	171.50 ± 14.82
Betina	
Kawalan	72.00 ± 8.20
1 g ekstrak/kg	74.83 ± 3.71
2.5 ekstrak/kg	73.33 ± 5.16
5.0 ekstrak/kg	74.50 ± 7.18

Nilai dinyatakan sebagai min ± sisihan piawai (SD). Terdapat perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) diperhatikan antara kumpulan jantan dan betina. Data membezakan kumpulan jantan dan betina bagi pengukuran lain tidak ditunjukkan kerana tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$)

KEGENOTOKSIKAN

Berdasarkan Jadual 4, tidak terdapat perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada frekuensi NCE, PCE, MN-PCE serta nisbah PCE: NCE setiap 2000 eritrosit antara kumpulan kawalan dan rawatan. Dalam kajian kegenotoksikan ini, didapati tidak terdapat perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada semua ukuran antara kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan. Terdapat trend penurunan dalam bilangan MN-PCE antara kumpulan kawalan dan rawatan, namun ia tidak signifikan ($P > 0.05$). Peningkatan frekuensi atau bilangan MN-PCE yang tinggi menunjukkan kerosakan kromosom atau kerosakan DNA (Fenech 2000; Krishna & Hayashi 2000). Selain itu, tiada pembentukan mikronukleus yang signifikan diperhatikan dalam kumpulan kawalan dan rawatan. Peningkatan frekuensi atau bilangan mikronukleus dalam limfosit darah periferol boleh meramalkan risiko kanser pada manusia (Bonassi et al. 2007). Terdapat trend menurun sedikit bagi nisbah PCE: NCE yang boleh diperhatikan antara kumpulan kawalan

dan rawatan. Walau bagaimanapun, perbezaannya tidak signifikan ($P > 0.05$). Penurunan nisbah PCE:NCE dalam MNA dianggap sebagai tanda ketoksikan sumsum tulang yang disebabkan oleh mutagen (Suzuki et al. 1989). Dalam sumsum tulang normal, nisbah PCE:NCE biasanya sekitar 1:1 (Schmid 1976). Apabila proliferasi normal sel sumsum tulang dipengaruhi oleh agen toksik, terdapat penurunan dalam nisbah PCE:NCE. Ini menunjukkan ketoksikan sumsum tulang dan depresi sel (Shahrim et al. 2006).

Secara keseluruhannya, didapati bahawa ekstrak tidak mempunyai kesan kegenotoksikan yang signifikan ke atas tikus yang dikaji. Kajian oleh Ramar et al. (2020) mengenai potensi kegenotoksikan ekstrak metanol daun *Z. mauritiana* menunjukkan ekstrak tersebut tidak menyebabkan perbezaan signifikan dalam bilangan MN-PCE pada dos yang dikaji (Ramar et al. 2020). Selain itu, pemeriksaan kegenotoksikan ekstrak buah *Ziziphus mistol* menunjukkan bahawa ekstrak tersebut tidak mempunyai kesan kegenotoksikan (Cardozo et al. 2011).

JADUAL 4. Nisbah NCE, PCE, MN-PCE dan PCE:NCE untuk setiap 2000 eritrosit, untuk kumpulan kawalan dan rawatan

Kumpulan	NCE	PCE	MN-PCE	PCE:NCE
Kawalan	1152.0 ± 11.31	823.5 ± 27.58	24.5 ± 16.26	0.715 ± 0.031
1 g ekstrak/kg	1238.5 ± 58.68	747.5 ± 64.35	14.0 ± 5.66	0.606 ± 0.081
2.5 ekstrak/kg	1209.5 ± 43.13	778.0 ± 36.77	12.5 ± 6.36	0.644 ± 0.053
5.0 ekstrak/kg	1215.0 ± 52.32	774.0 ± 49.50	11.0 ± 2.82	0.639 ± 0.068

Nilai dinyatakan sebagai min ± sisihan piawai (SD). Tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan antara kumpulan

KESITOTOKSIKAN

Berdasarkan Rajah 1, didapati bahawa ekstrak menghalang kebolehidupan titisan sel V79-4 pada 50% atau lebih pada kepekatan yang diuji selepas 24 jam pendedahan dengan IC_{50} sebanyak 0.48 mg/mL. Oleh itu, ekstrak menunjukkan kesan kesitotoksikan di bawah keadaan yang diuji.

Kajian kesitotoksikan ini menunjukkan kesan sitotoksik ekstrak pada titisan sel normal V79-4 di bawah keadaan yang diuji. Walau bagaimanapun, data awal (tidak diterbitkan) menunjukkan rawatan dengan ekstrak air tidak menunjukkan kesan kesitotoksikan di bawah keadaan ujian yang sama. Faktor yang memainkan peranan di sini mungkin disebabkan oleh faktor kaedah pengekstrakan dan pelarut yang berbeza. Ekstrak daripada pelarut bukan berketub atau berketub pertengahan

menunjukkan kesan kesitotoksikan yang lebih kuat jika dibandingkan dengan pelarut berketub yang lebih tinggi (Elbatrawy et al. 2015). Dalam kajian ini, ketubatan pelarut air yang digunakan dalam ekstrak air adalah lebih tinggi jika dibandingkan dengan ketubatan etanol yang digunakan dalam SFE. Tambahan pula, percanggahan dalam kesan kesitotoksikan antara ekstrak air dan etanol juga diperhatikan dalam kajian lain. Sebagai contoh, kajian Lu et al. (2016) mendapati bahawa ekstrak air dan ekstrak etanol menghasilkan kesan kesitotoksikan yang bercanggah pada sel pembunuh semula jadi (NK). Secara umumnya, pelarut yang berbeza mengekstrak sebatian yang berbeza, dengan tahap ketoksikan yang berbeza.

Selain itu, etanol merupakan pelarut yang baik untuk mengekstrak metabolit berketub dan bukan

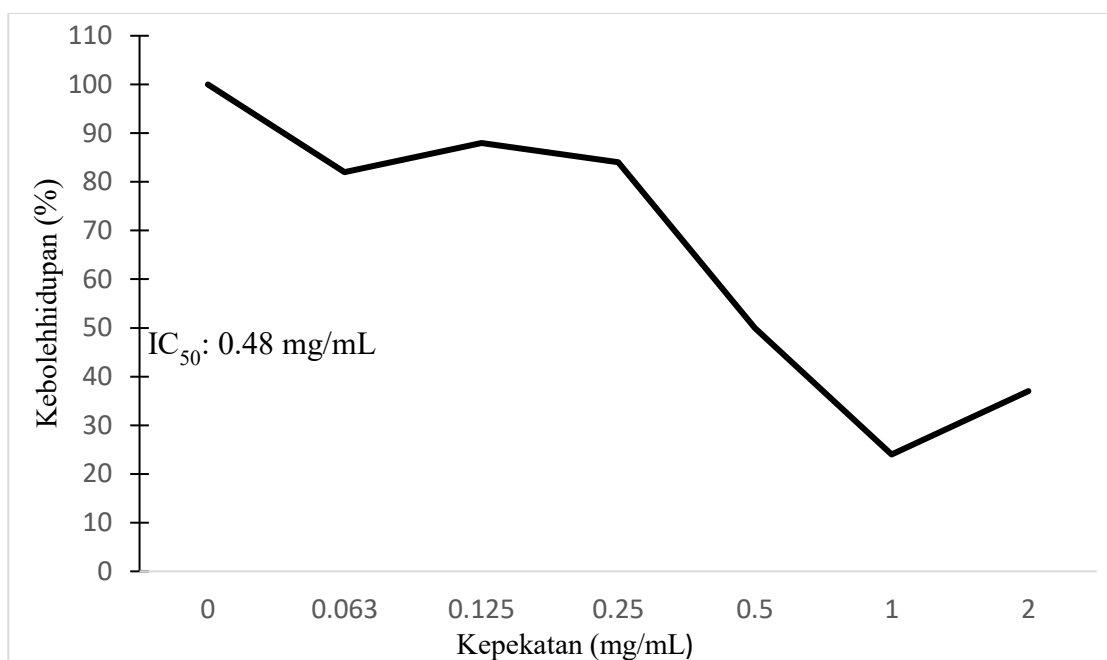
berkutub, termasuk asid lemak, polipeptida dan asid amino. Manakala ekstrak yang dihasilkan melalui pengekstrakan air selalunya kaya dengan karbohidrat dan protein (Beattie et al. 2011). Sehubungan itu, metabolit seperti poliasetilena yang terdapat dalam buah-buahan boleh meningkatkan kesan ketoksikan pada sel kanser (Kwiecinski et al. 2011). Oleh itu, ekstrak SFE berkemungkinan mempunyai lebih banyak kandungan metabolit daripada ekstrak air. Ini boleh menyebabkan kesan ketoksikan ekstrak SFE pada sel normal yang dikaji. Sebaliknya, ekstrak air yang rendah kandungan metabolitnya tidak menunjukkan kesan ketoksikan pada sel yang dikaji.

Jika dibandingkan dengan kajian lain yang menggunakan titisan sel normal, kajian Perumal et al. (2012) menunjukkan bahawa ekstrak daun dan batang *Z. mauritiana* tidak menghasilkan kesan ketoksikan pada titisan sel normal Vero. Dalam kajian mereka, sampel diekstrak menggunakan pelarut metanol. Ujian kesitotoksikan yang digunakan adalah sama seperti kajian ini, iaitu ujian MTT, tetapi menggunakan kepekatan yang lebih rendah iaitu 6.25 - 100 µg/mL. Satu lagi kajian oleh Al-Saeedi et al. (2017) juga menunjukkan keputusan yang sama dengan kajian ini, tetapi kaedah

yang digunakan adalah berbeza iaitu ujian *brine shrimp lethality*. Kajian tersebut mengkaji beberapa jenis ekstrak buah dan daun *Z. mauritiana*, termasuk ekstrak metanol dan air. Keputusan kajian tersebut menunjukkan nilai LC_{50} lebih rendah daripada 1000 µg/mL, dengan LC_{50} untuk ekstrak air adalah lebih tinggi daripada ekstrak metanol.

Secara keseluruhannya, kajian ini mendapati bahawa ekstrak SFE buah *Z. mauritiana* berkelakuan berbeza, *in vivo* dan *in vitro*. Ia didapati ketoksikan kepada sel normal yang dikaji, manakala tidak toksik dalam kajian ketoksikan akut dan geno ketoksikan yang dijalankan. Ini mungkin kerana dalam kajian kesitotoksikan, ekstrak didedahkan terus kepada titisan sel. Manakala bagi kajian ketoksikan akut, ekstrak diberikan dalam dos tunggal secara oral dan tidak terdedah secara langsung kepada sel, dengan ekstrak melalui proses penyerapan, pengedaran, metabolisme dan perkumuhan.

Berdasarkan keputusan yang diperoleh, ekstrak mungkin berpotensi untuk dikaji lebih lanjut sebagai agen ketoksikan terhadap sel kanser. Kajian lepas menunjukkan ekstrak daun (Owolarafe et al. 2020), kulit batang dan biji (Akanda & Hasan 2021) *Z. mauritiana* menunjukkan kesan kesitotoksikan.



RAJAH 1. Kebolehidupan titisan sel V79-4 pada kepekatan berbeza ekstrak SFE buah *Z. mauritiana*

KESIMPULAN

Ekstrak SFE buah *Z. mauritiana* didapati mempunyai nilai fenol dan antioksidan yang setanding dengan kajian terdahulu terhadap buah *Z. mauritiana*, dengan kandungan fenol yang baik namun tidak menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi. Kajian ketoksikan akut tidak menunjukkan kesan toksik ke atas haiwan yang dikaji. Keputusan menunjukkan bahawa ekstrak tidak mempunyai kesan negatif terhadap berat, pengambilan makanan dan air, berat organ dan parameter biokimia dalam haiwan yang dikaji. Manakala kajian kesitotoksikan menunjukkan bahawa ekstrak menunjukkan kesan kesitotoksikan pada titisan sel normal V79-4 dalam keadaan yang diuji. Kajian kegenotoksikan mendapati bahawa ekstrak tidak mempunyai kesan kegenotoksikan ke atas haiwan yang dikaji. Walau bagaimanapun, kajian yang lebih teliti perlu dilakukan untuk merungkai potensi keseluruhan ekstrak buah *Z. mauritiana*.

PENGHARGAAN

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) kerana menyediakan pembiayaan penyelidikan untuk menyokong projek ini di bawah geran bernombor GUP-2017-100.

RUJUKAN

- Akanda, M.K.M. & Hasan, A.H.M.N. 2021. Characterization of pharmacological properties of methanolic seed and stem bark extracts of *Ziziphus mauritiana* (BAU Kul) using *in-vitro* and *in-vivo* animal (Swiss albino male mice) model. *Clinical Phytoscience* 7: 8. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00246-0>
- Al-Saeedi, A.H., Al-Ghafri, M.T.H. & Hossain, M.A. 2017. Brine shrimp toxicity of various polarities leaves and fruits crude fractions of *Ziziphus jujuba* native to Oman and their antimicrobial potency. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 5(December 2016): 122-126.
- Azman, N.F.I.N., Azlan, A., Khoo, H.E. & Razman, M.R. 2019. Antioxidant properties of fresh and frozen peels of citrus species. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 7(2): 331-339.
- Beattie, K.D., Ulrich, R., Grice, I.D., Uddin, S.J., Blake, T.B., Wood, K.A., Steele, J., Iu, F., May, T.W. & Tiralongo, E. 2011. Ethanolic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth *in vitro*. *Mycologia* 103(3): 458-465.
- Bhatia, A., Mishra, T. & Khullar, M. 2011. Anticancer potential of aqueous ethanol seed extract of *Ziziphus mauritiana* against cancer cell lines and Ehrlich ascites carcinoma. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 765029.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulka-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H. & Fenech, M. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28(3): 625-631.
- Cardozo, M.L., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Zampini, I.C. & Isla, M.I. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activity characterization and genotoxicity evaluation of *Ziziphus mistol* ripe berries, exotic Argentinean fruit. *Food Research International* 44(7): 2063-2071.
- Elbatrawy, E.N., Ghonimy, E.A.A., Alassar, M.M. & Wu, F.S. 2015. Medicinal mushroom extracts possess differential antioxidant activity and cytotoxicity to cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17(5): 471-479.
- Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455(1-2): 81-95.
- Ikram, E.H.K., Eng, K.H., Jalil, A.M.M., Ismail, A., Idris, S., Azlan, A., Nazri, H.S.M., Diton, N.A.M. & Mokhtar, R.A.M. 2009. Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(5): 388-393.
- Islam, M.B. & Simmons, M.P. 2006. A thorny dilemma: Testing alternative intrageneric classifications within *Ziziphus* (Rhamnaceae). *Systematic Botany* 31(4): 826-842.
- Khairuddin, K. & Noor Azlin, Y. 2013. *Ziziphus mauritiana*: Tasty little fruits. <https://www.frim.gov.my/colour-of-frim/ziziphus-mauritiana-tasty-little-fruits/wppaspec/oc1/cv0/ab35/pt113>. Diakses pada 27 Februari 2021.
- Khan, A.R., Awan, F.R., Najam, S.S., Islam, M., Siddique, T. & Zain, M. 2015. Elevated serum level of human alkaline phosphatase in obesity. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 65(11): 1182-1185.
- Koley, T.K., Kaur, C., Nagal, S., Walia, S., Jaggi, S. & Sarika. 2011. Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). *Arabian Journal of Chemistry* 9: S1044-S1052.
- Krishna, G. & Hayashi, M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455(1-2): 155-166.
- Kviecinski, M.R., Benelli, P., Felipe, K.B., Correia, J.F.G., Pich, C.T., Ferreira, S.R.S. & Pedrosa, R.C. 2011. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. *Journal of Supercritical Fluids* 56(3): 243-248.
- Lowe, D., Sanvictores, T. & John, S. 2017. *Alkaline Phosphatase*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Lu, C.C., Hsu, Y.J., Chang, C.J., Lin, C.S., Martel, J., Ojcius, D.M., Ko, Y.F., Lai, H.C. & Young, J.D. 2016. Immunomodulatory properties of medicinal mushrooms: Differential effects of water and ethanol extracts on NK cell-mediated cytotoxicity. *Innate Immunity* 22(7): 522-533.

- Machado, B.A.S., De Abreu Barreto, G., Costa, A.S., Costa, S.S., Silva, R.P.D., Da Silva, D.F., Brandao, H.N., Da Rocha, J.L.C., Nunes, S.B., Umsza-Guez, M.A. & Padilha, F.F. 2015. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS ONE* 10(8): 1-26.
- Marwat, S.K., Rehman, F., Khan, E.A., Khakwani, A.A., Ullah, I., Khan, K.U. & Khan, I.U. 2014. Useful ethnophytomedicinal recipes of angiosperms used against diabetes in South East Asian Countries (India, Pakistan & Sri Lanka). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 27(5): 1333-1358.
- Nasir, W.N.H.W., Ibrahim, N.N.A., Hao, W.K., Sajak, A.A.B., Sofian-Seng, N., Mustapha, W.A.W. & Rahman, H.A. 2021. Effects of different drying methods and solvents on biological activities of *Curcuma aeruginosa* leaves extract. *Sains Malaysiana* 50(8): 2207-2218.
- Nyanga, L.K., Gadaga, T.H., Nout, M.J.R., Smid, E.J., Boekhout, T. & Zwietering, M.H. 2013. Nutritive value of masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits from Zambezi Valley in Zimbabwe. *Food Chemistry* 138(1): 168-172.
- OECD. 2001. *OECD Guideline for Testing of Chemicals*. Guideline 420: Acute Oral Toxicity, Fixed Dose Procedure(17th December): hlm. 1-14.
- Othman, Z.S., Maskat, M.Y. & Hassan, N.H. 2020. Optimization of cinnamaldehyde extraction and antioxidant activity of Ceylon cinnamon extract. *Sains Malaysiana* 49(5): 995-1002.
- Owolarafe, T.A., Salawu, K., Ihegboro, G.O., Ononamadu, C.J., Alhassan, A.J. & Wudil, A.M. 2020. Investigation of cytotoxicity potential of different extracts of *Ziziphus mauritiana* (Lam) leaf *Allium cepa* model. *Toxicology Reports* 7(June): 816-821.
- Pareek, S., Kitinoja, L., Kaushik, R.A. & Paliwa, R. 2009. Postharvest physiology and storage of ber. *Stewart Postharvest Review* 5(5): 1-10.
- Perumal, S., Mahmud, R., Piaru, S.P., Cai, L.W. & Ramanathan, S. 2012. Potential antiradical activity and cytotoxicity assessment of *Ziziphus mauritiana* and *syzygium polyanthum*. *International Journal of Pharmacology* 8(6): 535-541.
- Ramar, M.K., Dhayanandamoorthy, Y., Ramachandran, S.S. & Kandasamy, R. 2020. HPLC-ESI-QqQ based standardization, mutagenic and genotoxic potential of methanol extract of *Ziziphus mauritiana* Lam leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 246(September 2019): 112216.
- Rao, T.V.R., Baraiya, N.S., Vyas, P.B. & Patel, D.M. 2016. Composite coating of alginate-olive oil enriched with antioxidants enhances postharvest quality and shelf life of Ber fruit (*Ziziphus mauritiana* Lamk. Var. Gola). *Journal of Food Science and Technology* 53(1): 748-756.
- Saidin, S.H., Ali, N.A.M., Jamil, M., Kar, P., Yong, A.A. & Patah, M.F.Z. 2014. Natural fragrance extract production using supercritical carbon dioxide. *Proceeding of the 30th Annual Seminar of the Malaysian Natural Products Society. Moving Translational Research in Natural Products Forward*. hlm. 129-134.
- Saidu, Y., Muhammad, S., Yahaya, A., Onu, A., Mohammed, I. & Muhammad, L. 2017. *In vitro* screening for protein tyrosine phosphatase 1B and dipeptidyl peptidase IV inhibitors from Nigerian medicinal plants. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 6(2): 154-157.
- San, A.M.M., Thongpraditchote, S., Sithisarn, P. & Gritsanapan, W. 2013. Total phenolics and total flavonoids contents and hypnotic effect in mice of *Ziziphus mauritiana* Lam. seed extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 835854.
- Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In *Chemical Mutagens*, edited by Hollaender, A. Boston, MA: Springer. hlm. 31-53.
- Shahrim, Z., Puteri J Noor, M.B., Noral'ashikin, Y., Muhammad, H., Rohana, A.B. & Zakiah, I. 2006. The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract. *Tropical Biomedicine* 23(2): 214-219.
- Shair, R.M., Maskat, M.Y. & Rosmin Kasran, M.K.A. 2020. Protective effect of cocoa extract on ethanol induced liver injury in Sprague-dawley rats. *Sains Malaysiana* 49(1): 93-101.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
- Suriyavadhana, M., Pakutharivu, T. & Anglais, A.E. 2011. Evaluation of acute and sub acute toxicity of ethanol extracts of *Entada pursaetha*, *Toddalia aculeata*, and *Ziziphus mauritiana*. *World J Life Sci. and Medical Research* 1(2): 43-47.
- Suzuki, Y., Nagae, Y., Li, J., Sakaba, H., Mozawa, K., Takahashi, A. & Shimizu, H. 1989. The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis* 4(6): 420-424.
- Talmale, S., Bhujade, A. & Patil, M. 2015. Anti-allergic and anti-inflammatory properties of *Ziziphus mauritiana* root bark. *Food Function* 6(9): 2975-2983.
- Thomas, P. 2007. Changes in buccal biomarker in relation to ageing and Alzheimer's Disease. PhD Thesis. School of Molecular Biomedical Science, University of Adelaide: Adelaide, South Australia, Australia (Tidak diterbitkan).
- Zayapor, M.N., Abdullah, A. & Mustapha, W.A.W. 2021. Influence of sugar concentration and sugar type on the polyphenol content and antioxidant activity in spiced syrup preparation. *Italian Journal of Food Science* 33(1): 96-105.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: arnida@ukm.edu.my