


**KAJIAN PROTEOMIK 2D-GEL TERHADAP
EKSPRESI PROTEIN HEPAR DALAM TIKUS
YANG DIARUH HEPATOKARSINOGENESIS
DAN DIRAWAT DENGAN FRAKSI KAYA
TOKOTRIENOL SAWIT**



**NUR SYAZANA SYAHIRA
BINTI MOHD NORMAN**

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

	UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07	No. Semakan: 02	Tarikh Kuat Kuasa: 27/01/2026
	BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI SELEPAS PEMBETULAN FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION SUBMISSION		

F. KELULUSAN DEKAN/PENGARAH / APPROVAL FROM DEAN/DIRECTOR

Tandatangan: <i>Signature</i>		Tarikh: 25/1/26 <i>Date</i>
Nama dan Cap Rasmi: <i>Name and Official Stamp</i>	PROFESSOR DATO' DR MARINA MAT BAKI MD (UKM), MS ORL-HNS (UKM), PhD (UCL) Dekan Fakulti Perubatan Pakar Perunding Kanan ORL-HNS Universiti Kebangsaan Malaysia	


G. PERAKUAN TESIS/ DISERTASI SARJANA / DOKTOR FALSAFAH (CERTIFICATION OF MASTER'S / DOCTORAL THESIS / DISSERTATION)

Nama penuh pengarang <i>(Author's Full Name)</i>	NUR SYAZANA SYAHIRA BINTI MOHD NORMAN		
No. Pendaftaran Pelajar <i>(Student's Registration No.)</i>	P116172	Sesi Akademik <i>(Academic Session)</i>	Sem 1 / 20252026
Tajuk Tesis / Disertasi <i>(Thesis / Dissertation Title)</i>	KAJIAN PROTEOMIK 2D-GEL TERHADAP EKSPRESI PROTEIN HEPAR DALAM TIKUS YANG DIRUH HEPATOKARSINOGENESIS DAN DIRAWAT DENGAN FRAKSI KAYA TOKOTRIENOL SAWIT		

Semua tesis/disertasi dan penerbitan berkaitan hasil penyelidikan pelajar adalah tertakluk kepada Dasar Harta Intelek Universiti Kebangsaan Malaysia.
All theses/ dissertations and publications relating to the research work of a student are subject to the Intellectual Property Policy of Universiti Kebangsaan Malaysia.

Saya mengaku bahawa tahap akses tesis/disertasi ini sebagai (*Tandakan ✓ dalam kotak bagi maklumat yang berkaitan; tandakan satu (1) kotak di bawah sahaja):
I hereby declare the level of access for this thesis/dissertation as follows (tick ✓ the relevant box below; tick only one option).

Pilihan Tahap Akses <i>Access Level Selection</i>		Tafsiran Tahap Akses Tesis/Disertasi <i>Definition of Thesis/Dissertation Access Level</i>
<input type="checkbox"/>	RAHSIA <i>(CONFIDENTIAL)</i>	Mengandungi maklumat rahsia sepertimana yang diperuntukan bawah Akta Rahsia Rasmi 1972. <i>Contains classified information as stipulated under the Official Secrets Act 1972.</i>
<input type="checkbox"/>	TERHAD <i>(RESTRICTED)</i>	Mengandungi maklumat yang hanya boleh diakses oleh pihak yang mempunyai kebenaran atau keperluan tertentu untuk mengetahuinya yang ditentukan oleh organisasi/ badan di mana penyelidikan dijalankan. <i>Contains information that may only be accessed by parties with specific authorization</i>

	UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07	No. Semakan: 02	Tarikh Kuat Kuasa: 27/01/2026
	BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI SELEPAS PEMBETULAN FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION SUBMISSION		

		<i>or a defined need to know, as determined by the organization or body where the research is conducted.</i>
<input checked="" type="checkbox"/>	AKSES TERBUKA (OPEN ACCESS)	<p>Tesis/disertasi versi akhir dalam format PDF yang boleh diakses secara percuma secara dalam talian dan bebas dari isu hak cipta dan pelesenan <i>The final version of the thesis/dissertation in PDF format that is freely accessible online and free from copyright and licensing issues.</i></p> <p>Kementerian Pendidikan Tinggi melalui surat bertarikh 27 Mac 2025 memutuskan bahawa kebenaran akses tesis / disertasi dalam borang serahan akses terbuka ditentukan oleh penyelia (bukan pelajar). <i>The Ministry of Higher Education, through a letter dated 27 March 2025, has decided that permission for thesis / dissertation access in the open access submission form shall be determined by the supervisor (not the student).</i></p>
<input type="checkbox"/>	EMBARGO	<p>Tempoh masa di mana akses kepada tesis/disertasi disekat (ditutup) selama dua (2) tahun atas sebab-sebab tertentu sebagai contoh kerahsiaan atau hak cipta. Tesis/disertasi akan berstatus akses terbuka selepas tamat tempoh <i>embargo</i>. <i>The period during which access to the thesis/dissertation is restricted for two (2) years due to specific reasons, such as confidentiality or copyright. The thesis/dissertation will be granted open-access status upon the expiry of the embargo period.</i></p>

PENGESAHAN PELAJAR (STUDENT VERIFICATION)	PENGESAHAN PENYELIA (SUPERVISOR VERIFICATION)
 TANDATANGAN PELAJAR (STUDENT'S SIGNATURE)	 TANDATANGAN PENYELIA / Pengerusi JK SISWAZAH (SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON SUPERVISION COMMITTEE SIGNATURE)
Nama Pelajar (Student name): NUR SYAZANA SYAHIRA BINTI MOHD NORMAN No. Pendaftaran Pelajar (Student's Registration No.): P116172 Tarikh: 19/05/2026 (Date)	Nama Penyelia / Pengerusi JK Siswazah : PROF. MADYA DR. AZMAN BIN ABDULLAH <i>(Supervisor's / Chairperson Supervision Committee Name)</i> Tarikh: 19/05/2026 (Date)

KAJIAN PROTEOMIK 2D-GEL TERHADAP EKSPRESI PROTEIN HEPAR
DALAM TIKUS YANG DIARUH HEPATOKARSINOGENESIS
DAN DIRAWAT DENGAN FRAKSI KAYA
TOKOTRIENOL SAWIT

NUR SYAZANA SYAHIRA BINTI MOHD NORMAN

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH
IJAZAH SARJANA SAINS PERUBATAN

FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2026

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

20 Mei 2026

NUR SYAZANA SYAHIRA
BINTI MOHD NORMAN
P116172

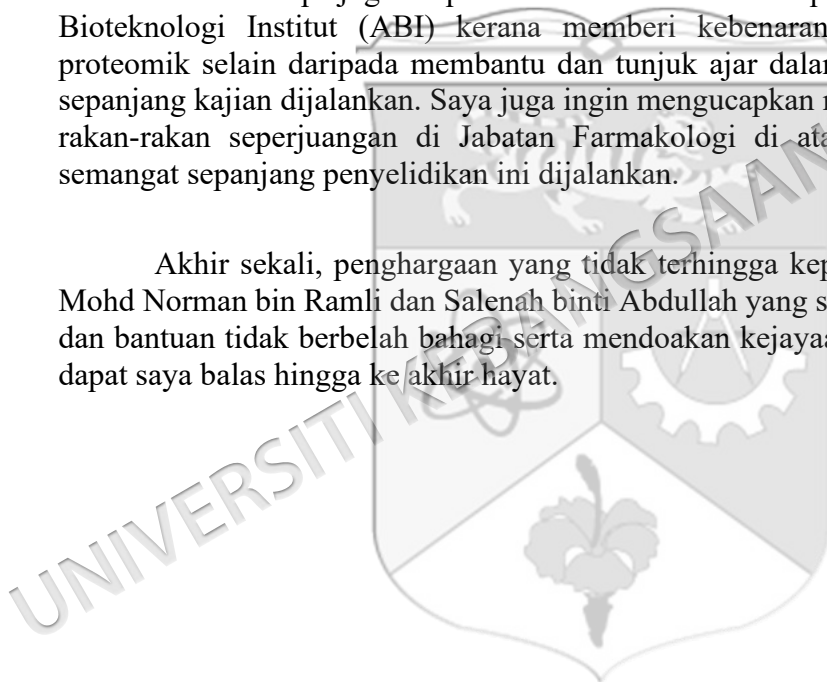


PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang. Saya bersyukur kehadiran ilahi kerana dengan izin, limpahan rahmat dan kurnia-Nya, kajian ini dapat disempurnakan. Jutaan terima kasih dirakamkan kepada penyelia utama Prof. Madya Dr Azman bin Abdullah atas segala bantuan, bimbingan, teguran dan nasihat yang begitu berguna sepanjang kajian ini serta penyelia bersama Prof. Dr Nur Azlina binti Mohd Fahami yang banyak membantu mengukuhkan lagi kajian ini. Terima kasih juga diucapkan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) dan Kementerian Pendidikan Tinggi (MOHE) atas pembiayaan penyelidikan melalui geran FRGS (FRGS/1/2020/SKK0/UKM/02/14).

Ucapan ribuan terima kasih juga ditujukan kepada semua Penolong Pegawai Sains Perubatan (PPSP) Jabatan Farmakologi atas segala bantuan dan tunjuk ajar yang diberikan. Tidak lupa juga ucapan terima kasih dihulurkan pada Pegawai Sains di Agro Bioteknologi Institut (ABI) kerana memberi kebenaran menggunakan peralatan proteomik selain daripada membantu dan tunjuk ajar dalam penyelidikan proteomik sepanjang kajian dijalankan. Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan seperjuangan di Jabatan Farmakologi di atas bantuan dan dorongan semangat sepanjang penyelidikan ini dijalankan.

Akhir sekali, penghargaan yang tidak terhingga kepada kedua ibu bapa saya, Mohd Norman bin Ramli dan Salenah binti Abdullah yang sentiasa memberi sokongan dan bantuan tidak berbelah bahagi serta mendoakan kejayaan saya. Jasa mereka tidak dapat saya balas hingga ke akhir hayat.



ABSTRAK

Kanser hepar adalah salah satu penyumbang kadar morbiditi dan mortaliti yang tinggi di peringkat global, dan pelbagai bahan semula jadi telah dikaji yang berpotensi sebagai rawatan kanser hepar. Tokotrienol kaya dengan sifat antioksidan dan berpotensi memiliki sifat antikanser yang signifikan. Penyediaan tokotrienol yang paling lazim adalah fraksi kaya tokotrienol yang diperolehi daripada minyak sawit (TRF). Kajian ini bertujuan untuk mengkaji perubahan ekspresi protein fraksi sitosolik hepar tikus yang diaruh karsinogenesis dan dirawat dengan dos TRF yang berbeza menggunakan kaedah 2D-gel elektroforesis. Sebanyak 42 ekor tikus jantan Wistar dibahagikan kepada 7 kumpulan iaitu kumpulan kawalan, kumpulan yang diberi TRF sahaja (500 mg/kg), kumpulan tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis yang tidak diberi sebarang rawatan (HCC), kumpulan tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis dan disuplementasi dengan pelbagai dos TRF (HCC + TRF 125 mg/kg, HCC + TRF 250 mg/kg, HCC + TRF 500 mg/kg), dan kumpulan tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis dan disuplementasi dengan 100mg/kg butilhidroksianisol (BHA) (HCC + BHA 100 mg/kg). Hepatokarsinogenesis (HCC) diaruh melalui pemberian dietilnitrosamina (DEN) dan 2-asetilaminofluorena (2AAF). TRF dan BHA diberikan pada peringkat awal pemberian 2AAF sehingga minggu ke-12 menggunakan kaedah paksaan oral. Pada minggu ke-12, tikus-tikus dibunuh dan hepar mereka diasingkan. Fraksi sitosolik telah disediakan daripada homogenat tisu hepar. Elektroforesis gel dua dimensi (2DE) bersama spektrometri jisim penyahjerapan/pengionan laser berbantu matriks-masa penerbangan/masa penerbangan (MALDI-TOF/TOF) digunakan dalam kajian ini bagi menentukan perubahan dalam ekspresi global protein dan mengenal pasti identiti protein yang berubah ekspresinya dalam fraksi sitosolik hepar tikus. Kesan rawatan TRF terhadap ekspresi protein adalah bergantung dos. Kumpulan HCC + TRF 500 mg/kg menunjukkan bilangan tertinggi bintik protein yang diekspresikan secara signifikan, diikuti oleh kumpulan HCC + BHA 100mg/kg, kumpulan HCC + TRF 250mg/kg, kumpulan HCC + TRF 125mg/kg, kumpulan TRF 500mg/kg dan akhir sekali kumpulan HCC, berbanding kumpulan kawalan. Sebanyak 23 protein yang diekspresikan secara berbeza dan signifikan, dengan perubahan minimum 2 kali ganda selepas rawatan, berbanding kumpulan kawalan. Namun, daripada 23 protein tersebut, hanya 8 bintik protein sahaja yang berjaya dikenalpasti menggunakan spektrometri jisim. Bintik protein yang telah dikenal pasti adalah glutamat dehidrogenase 1 (DHE3), subunit alfa protein flavin pemindah elektron (ETF_A), ornitin karbamoiltransferase (OTC), argininosuksinate sintase (ASSY), adenosina kinase (ADK), protein tekanan 70 (GRP75), S-adenosilmetionin (METK1) dan aldehyd dehidrogenase 2 (ALDH2), dan mereka memainkan peranan penting dalam mekanisme hepatoprotektif melalui pelbagai laluan metabolik dan pertahanan sel. Kesimpulannya, suplementasi TRF mempunyai kesan hepatoprotektif dalam tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis. Penggunaan kaedah yang lebih sensitif seperti kromatografi cecair spektrometri jisim (LCMS) diperlukan untuk mengenalpasti bintik-bintik yang tidak dapat dikenal pasti melalui MALDI-TOF/TOF.

2D-GEL PROTEOMIC ANALYSIS OF LIVER PROTEIN EXPRESSION IN RATS WITH INDUCED HEPATOCARCINOGENESIS TREATED WITH PALM-DERIVED TOCOTRIENOL-RICH FRACTION

ABSTRACT

Liver cancer is one of the major contributors to high morbidity and mortality rates globally, and various natural compounds have been studied for their potential as treatments for liver cancer. Tocotrienols are rich in antioxidant properties and may possess significant anticancer effects. The most common form of tocotrienol preparation is the tocotrienol-rich fraction derived from palm oil (TRF). This study aimed to investigate changes in protein expression in the cytosolic fraction of rat liver induced with carcinogenesis and treated with different doses of TRF, using the 2D-gel electrophoresis method. A total of 42 male Wistar rats were divided into seven groups: a control group, a group receiving TRF only (500 mg/kg), a hepatocarcinogenesis-induced group without any treatment (HCC), groups induced with hepatocarcinogenesis and supplemented with various doses of TRF (HCC + TRF 125 mg/kg, HCC + TRF 250 mg/kg, HCC + TRF 500 mg/kg), and a group induced with hepatocarcinogenesis and supplemented with 100 mg/kg butylated hydroxyanisole (BHA) (HCC + BHA 100 mg/kg). Hepatocarcinogenesis (HCC) was induced through the administration of diethylnitrosamine (DEN) and 2-acetylaminofluorene (2AAF). TRF and BHA were administered orally by force-feeding starting from the initiation of 2AAF treatment until week 12. At week 12, the rats were sacrificed and their livers were isolated. The cytosolic fraction was prepared from liver tissue homogenates. Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) was used to determine global changes in protein expression and to identify proteins with altered expression in the cytosolic fraction of rat liver. The effect of TRF treatment on protein expression was dose-dependent. The HCC + TRF 500 mg/kg group showed the highest number of significantly expressed protein spots, followed by the HCC + BHA 100 mg/kg group, HCC + TRF 250 mg/kg, HCC + TRF 125 mg/kg, TRF 500 mg/kg, and lastly the HCC group, compared to the control group. A total of 23 proteins were found to be differentially and significantly expressed, with at least a two-fold change following treatment compared to the control group. However, of these 23 proteins, only 8 protein spots were successfully identified using mass spectrometry. The identified proteins were glutamate dehydrogenase 1 (DHE3), electron transfer flavoprotein alpha subunit (ETF α), ornithine carbamoyltransferase (OTC), argininosuccinate synthase (ASSY), adenosine kinase (ADK), stress protein 70 (GRP75), and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). These proteins play important roles in hepatoprotective mechanisms through various metabolic and cellular defense pathways. In conclusion, TRF supplementation exerts a hepatoprotective effect in rats with induced hepatocarcinogenesis. More sensitive techniques such as LC-MS are required to identify protein spots that could not be identified using MALDI-TOF/TOF.

KANDUNGAN

		Halaman
PENGAKUAN		i
PENGHARGAAN		ii
ABSTRAK		iii
ABSTRACT		iv
KANDUNGAN		v
SENARAI JADUAL		ix
SENARAI ILUSTRASI		x
SENARAI SINGKATAN		xii
BAB I	Pengenalan	
1.1	PENDAHULUAN	1
1.2	JUSTIFIKASI KAJIAN	4
1.3	PERSOALAN KAJIAN	5
1.4	OBJEKTIF KAJIAN	5
	1.4.1 Objektif Umum	5
	1.4.2 Objektif Khusus	6
1.5	HIPOTESIS KAJIAN	6
BAB II	Kajian Literasi	
2.1	HEPAR	7
	2.1.1 Struktur dan fungsi hepar	7
	2.1.2 Kerosakan pada Hepar	8
	2.1.3 Kanser Hepar	9
	2.1.4 Patofisiologi Kanser Hepar	11
	2.1.5 Mekanisma Kanser Hepar	12
	2.1.6 Model kanser hepar	13
2.2	RAWATAN KANSER HEPAR	13
2.3	TOKOTRIENOL	14
	2.3.1 Deskripsi dan Struktur	14
	2.3.2 Potensi Terapeutik	15
	2.3.3 Tokotrienol sebagai Pelindung Hepar	17
	2.3.4 Tokotrienol sebagai Rawatan Kanser	18
	2.3.5 Mekanisma Antikanser oleh Tokotrienol	20

2.4	PROTEOMIK	21
2.4.1	Gel Elektroforesis Dua-Dimensi dan Spektrometer Jisim	22
2.4.2	2D-Gel Elektroforesis dalam Rawatan Kanser	24
3.1	BAHAN DAN KAEDAH	
3.1	PENGENDALIAN HAIWAN	26
3.2	PROSEDUR PENGARUHAN KANSER	26
3.2.1	Alat Radas	26
3.2.2	Reagen	27
3.2.3	Model Hepatokarsinogenesis	28
3.3	RAWATAN TIKUS	28
3.3.1	Alat Radas	28
3.3.2	Reagen	28
3.4	PROTOKOL RAWATAN HAIWAN	29
3.5	PERSAMPELAN DARAH DAN ORGAN	31
3.5.1	Alat Radas	31
3.5.2	Reagen	31
3.5.3	Persampelan Darah	31
3.5.4	Persampelan Organ Hepar	32
3.6	ANALISIS HISTOLOGI HEPAR	33
3.6.1	Pemprosesan Tisu Hepar	33
3.6.2	Pembenaman Tisu Hepar	37
3.6.3	Penyediaan Slaid Tisu Hepar	37
3.6.4	Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin	38
3.7	PENGEKSTRAKAN PROTEIN	42
3.7.1	Penentuan Kepekatan Protein Menggunakan Asai Asid Bichonconinik	43
3.8	PENENTUAN EKSPRESI PROTEIN MENGGUNAKAN KAEDAH PROTEOMIK	43
3.8.1	Penentuan Ekspresi Protein Menggunakan Teknik 2DE	43
3.8.2	Pengenalpastian Protein dengan Spektrometer Jisim MALDI TOF (MS)	49
3.8.3	Bioinformatik dan Analisis Kefungsian	52
3.9	ANALISIS STATISTIK	52
4.1	HASIL KAJIAN	
4.1	KAJIAN HISTOLOGI TISU HEPAR	53
4.2	ARAS ENZIM FUNGSI HEPAR	56

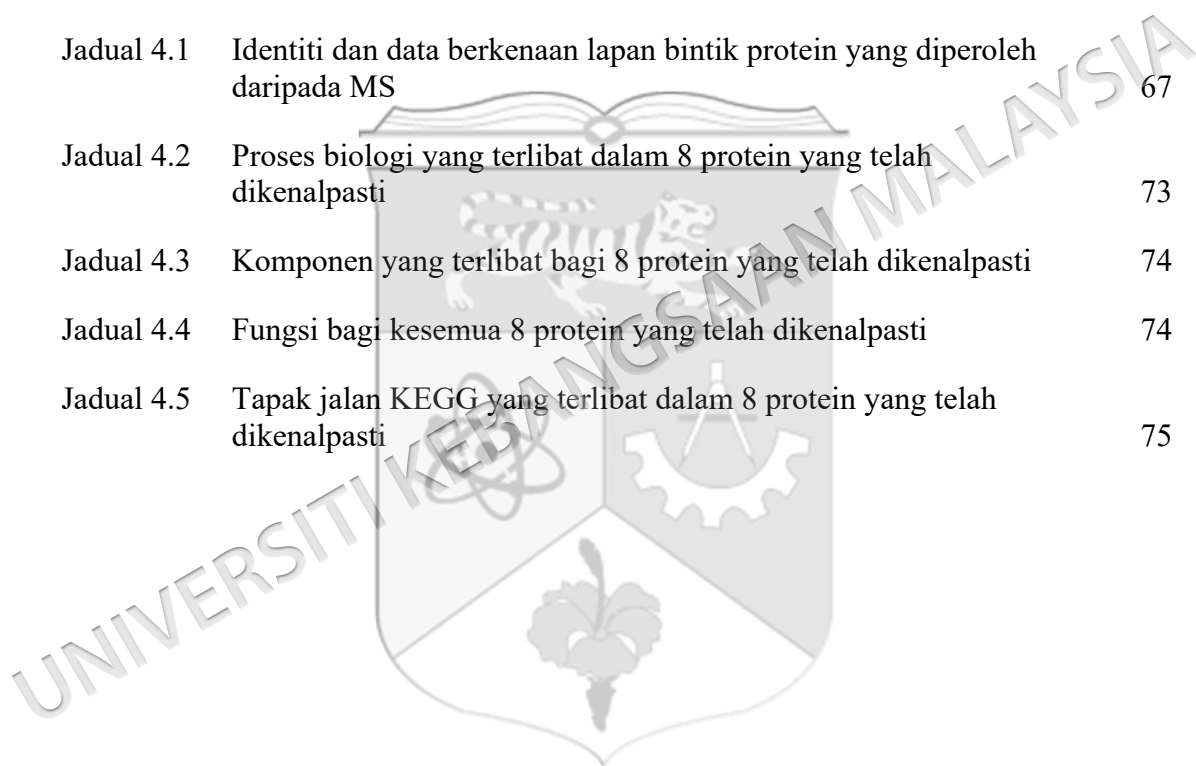
4.2.1	Purata Nisbah Aktiviti Enzim Alanina Aminotransferase Serum (ALT)	56
4.2.2	Purata Nisbah Aktiviti Enzim Aspartate Aminotransferase Serum (AST)	57
4.3	PROFIL GLOBAL PROTEIN-PROTEIN HEPAR YANG DAPAT DIASINGKAN MELALUI KAEDAH ELEKTROFORESIS GEL DUA DIMENSI (2D-GEL) BAGI SEMUA KUMPULAN TIKUS KAJIAN	58
4.4	PERBANDINGAN JUMLAH BINTIK PROTEIN YANG DIEKSPRESIKAN SECARA SIGNIFIKAN ANTARA PROFIL PROTEIN 2D-GEL RUJUKAN (KUMPULAN KAWALAN NORMAL) DAN PROFIL PROTEIN 2D-GEL PELBAGAI KUMPULAN RAWATAN	59
4.5	PROFIL PROTEIN RUJUKAN BERDASARKAN ANALISIS GABUNGAN KUMPULAN RAWATAN TERHADAP KUMPULAN KAWALAN	64
4.6	PENGENALPASTIAN IDENTITI PROTEIN YANG MENUNJUKKAN PERBEZAAN EKSPRESI YANG SIGNIFIKAN	65
4.7	INTERAKSI ANTARA PROTEIN	70
4.7.1	Analisis Pengayaan Fungsi Protein	71
 BAB V PERBINCANGAN		
5.1	KAJIAN HISTOLOGI TERHADAP PERUBAHAN TISU HEPAR	76
5.2	KESAN SUPLEMENTASI FRAKSI KAYA TOKOTRIENOL TERHADAP ARAS ENZIM FUNGSI HEPAR	78
5.3	PERBANDINGAN PROFIL PROTEIN UNTUK SETIAP KUMPULAN	80
5.4	PERBANDINGAN JUMLAH BINTIK YANG DIEKSPRESIKAN SECARA SIGNIFIKAN ANTARA PROFIL BINTIK PROTEIN RUJUKAN (KUMPULAN KAWALAN) DAN PROFIL PROTEIN KUMPULAN RAWATAN	81
5.5	IDENTIFIKASI PROTEIN YANG MENUNJUKKAN PERBEZAAN EKSPRESI DAN PERANAN PROTEIN	83
5.6	ANALISIS PROTEIN-PROTEIN INTERAKSI	92
 BAB VI KESIMPULAN DAN CADANGAN		
6.1	KESIMPULAN KAJIAN	97
6.2	KETERBATASAN KAJIAN	98

6.3	CADANGAN KAJIAN	99
RUJUKAN		100
Lampiran A	SIJIL KELULUSAN DARI JAWATANKUASA ETIKA PENGUNAAN HAIWAN (UKMAEC)	109
Lampiran B	PEMBENTANGAN BERKAITAN KAJIAN	110
Lampiran C	PEMBENTANGAN BERKAITAN KAJIAN	111
Lampiran D	PERBEZAAN EKSPRESI SETIAP BINTIK PROTEIN YANG SIGNIFIKAN	112



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 3.1	Langkah pemprosesan tisu	36
Jadual 3.2	Proses pewarnaan hemotoksisilin dan eosin (H&E)	40
Jadual 3.3	Protokol bagi voltan untuk elektroforesis satu dimensi	45
Jadual 3.4	Isipadu larutan diperlukan untuk menyediakan 2D gel	46
Jadual 3.5	Protokol bekalan tenaga elektrik bagi elektroforesis dua dimensi	47
Jadual 4.1	Identiti dan data berkenaan lapan bintik protein yang diperoleh daripada MS	67
Jadual 4.2	Proses biologi yang terlibat dalam 8 protein yang telah dikenalpasti	73
Jadual 4.3	Komponen yang terlibat bagi 8 protein yang telah dikenalpasti	74
Jadual 4.4	Fungsi bagi kesemua 8 protein yang telah dikenalpasti	74
Jadual 4.5	Tapak jalan KEGG yang terlibat dalam 8 protein yang telah dikenalpasti	75



SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Struktur organ hepar	8
Rajah 2.2	Struktur tokoferol	15
Rajah 2.3	Struktur tokotrienol	15
Rajah 3.1	Reka bentuk kajian	30
Rajah 3.2	Skematik reka bentuk eksperimen untuk pengaruh rawatan kanser hepar secara in vivo	30
Rajah 3.3	Pemotongan tisu hepar	34
Rajah 4.1	Fotomikrograf tisu hepar yang diwarnakan dengan pewarnaan H&E dari kumpulan kawalan (a), kumpulan TRF kawalan (b), kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan (c), kumpulan hepatokarsinogenesis+TRF 125mg/kg (d), kumpulan hepatokarsinogenesis+TRF 250mg/kg (e), kumpulan hepatokarsinogenesis+TRF 500mg/kg (f) dan kumpulan hepatokarsinogenesis+BHA 100mg/kg (g). Anak panah menunjukkan hepatosit sel, manakala anak panah nukleus sel.	55
Rajah 4.2	Purata nisbah aktiviti enzim alanina aminotransferase serum (ALT) antara kumpulan kajian	56
Rajah 4.3	Purata nisbah aktiviti enzim aspartate aminotransferase (AST) serum antara kumpulan kajian	57
Rajah 4.4	Bintik protein yang diekspresikan secara signifikan (≥ 2 kali ganda dan $p \leq 0.05$) setiap kumpulan rawatan berbanding kumpulan rujukan (kawalan). TRF 500mg/kg vs kumpulan kawalan (a), hepatokarsinogenesis vs kumpulan kawalan (b), hepatokarsinogenesis + TRF 125mg/kg vs kumpulan kawalan (c), hepatokarsinogenesis + TRF 250mg/kg vs kumpulan kawalan (d), hepatokarsinogenesis + TRF 500mg/kg vs kumpulan kawalan (e), hepatokarsinogenesis + BHA 100mg/kg vs kumpulan kawalan (g).	63
Rajah 4.5	Perbandingan bilangan bintik yang diekspresi secara signifikan antara kumpulan-kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan (perubahan ≥ 2 kali ganda dan $p \leq 0.05$).	64
Rajah 4.6	Gel dua dimensi rujukan hasil daripada gabungan semua gel daripada semua kumpulan rawatan. Sebanyak 23 bintik protein	

- diekspresikan secara signifikan setelah perbandingan dilakukan dengan gel kumpulan kawalan. Julat pI (titik isoelektrik) diwakili oleh paksi-x manakala piawai berat molekul (kDa) diwakili oleh paksi-y. 65
- Rajah 4.7 Bulatan merah menunjukkan bintik protein yang diekspresikan secara signifikan yang dapat dikenalpasti melalui kaedah spektrometer jisim. Julat pI (titik isoelektrik) diwakili oleh paksi-x manakala piawai berat molekul (kDa) diwakili oleh paksi-y. 66
- Rajah 4.8 Perbezaan ekspresi setiap lapan protein yang telah dikenalpasti melalui spektrometri jisim untuk setiap kumpulan 69
- Rajah 4.9 Interaksi protein-protein dengan menggunakan perisian STRING 70
- Rajah 4.10 Menunjukkan pengayaan proses biologi (Ontologi Gen) bagi 8 protein yang telah dikenalpasti 72

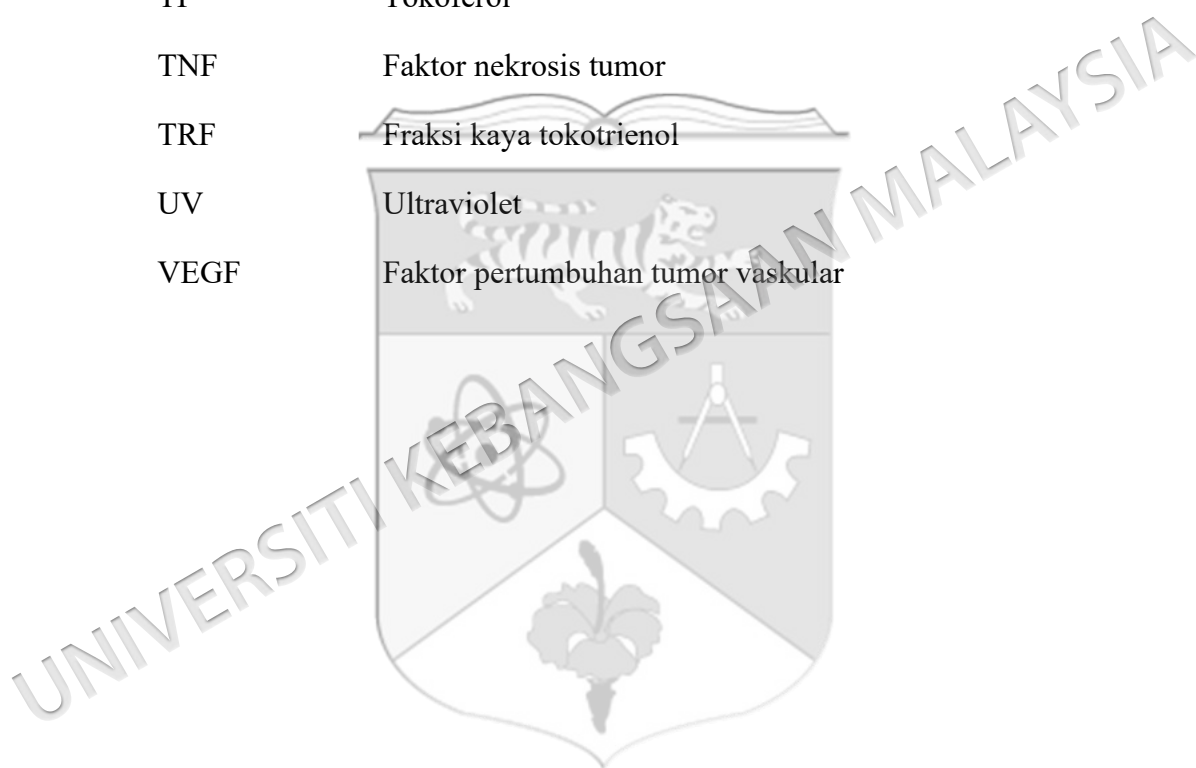


SENARAI SINGKATAN

2AAF	2-asetilaminofluorena
2DE	2 Dimensi elektroforesis
ACN	Asetoniril
AD	Penyakit Alzheimer
ADK	Adenosin kinase
AKT	Protein Kinase B
ALDH2	Aldehid dehidrogenase 2
ALP	Alkalin fosfat serum
ALT	Alanin Aminotransferase
APAP	Asetaminofen
APS	Ammonia persulfat
ARE	Elemen tidak balas Antioksidan
AST	Aspartate Aminotransferase Serum
ASSY	Argininosuksinat Sintase
BHA	Butilasi hidroksianol
COX	Siklooksigenase
DNA	Asid Deoksiribonukleik
DEN	Dietilnitrosamina
DHE3	Glutamat Dehidrogenase 1
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriks ekstraselular
EGF	Faktor pertumbuhan epidermis
ErbB2	Sel reseptor tirosin kinase 2
ERK	Fosforilasi kinase terkawal isyarat ekstrasel
ETFA	Subunit alfa Protein Flavon Pindah Elektron

FFA	Asid lemak bebas
Foxo3a	<i>forkhead box O3a</i>
GPX4	Glutathione peroksidase
GRP75	Protein tekanan 70
GSK-3 β	Kinase-3 beta penghasil glikogen
GSTs	Glutation S-transferase
H&E	Hematoksilin dan Eosin
HCC	Hepatokarsinoma sel
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase
HO1	Heme Oksigenase-1
HSC	Sel stelat hepato
IAA	Asid indol-3-asetik
IL	Interleukin
JNK	Kinase N-terminal c-Jun
LC-MS/MS	Kromatografi cecair spektrometri jisim
MAPK	Kinase protein yang diaktifkan oleh mitogen
METK1	S-adenosilmetionin
MiRNA	MikroRNA
MS	Spektrometer jisim
mTOR	Sasaran mekanistik rapamisin
NaCl	Natrium klorida
NFLD	Penyakit hepar berlemak bukan alkohol
NF- κ B	Faktor nukleus kappa B
NRF2	Faktor nuklear eritroid-2
NQO1	Kinon oksidoreduktase 1
OTC	Ornitin Karbamoiltransferase

PCD	Program kematian sel
PGE2	Prostaglandin E2
WHO	Organisasi kesihatan dunia
RNS	Reaktif nitrogen spesies
ROS	Reaktif oksigen spesies
SOD	Superoksida dismutase
T3	Tokotrienol
TP	Tokoferol
TNF	Faktor nekrosis tumor
TRF	Fraksi kaya tokotrienol
UV	Ultraviolet
VEGF	Faktor pertumbuhan tumor vaskular



BAB I

PENGENALAN

1.1 PENDAHULUAN

Hepatokarsinoma sel (HCC) atau juga dikenali sebagai kanser hepar terhasil daripada sel hepatosit yang bersifat malignan dan merupakan salah satu faktor utama kematian di seluruh dunia. Berdasarkan kajian oleh (Rumgay et al. 2022), kanser hepar merupakan kanser keenam yang paling kerap didiagnosis dan punca ketiga tertinggi kematian akibat kanser pada tahun 2020 (Goh et al. 2015) (Raihan et al. 2018).

Terdapat banyak kajian yang mencadangkan bahawa penyakit kanser boleh dikawal dengan mengubah gaya hidup dan pemakanan. Kaedah ini dilaporkan berupaya mengawal mekanisme biologi utama seperti tekanan oksidatif, keradangan kronik, ketidakseimbangan metabolik, serta laluan isyarat sel yang terlibat dalam karsinogenesis. Berdasarkan kajian terdahulu, vitamin E berpotensi dalam merawat pelbagai jenis penyakit seperti penyakit Alzheimer (Gugliandolo et al. 2017), penyakit kanser (Donnelly et al. 2022), penyakit hepar berlemak bukan alkohol (NFLD) (Hadi et al. 2018). Vitamin E terdiri daripada lapan sebatian larut lemak yang dibahagikan kepada dua iaitu tokoferol (TP) dan tokotrienol (T3). Buah kelapa sawit dan biji annatto merupakan sumber yang kaya dengan tokotrienol dan merupakan salah satu sumber semula jadi vitamin E (Abu-Fayyad et al. 2017).

Proliferasi sel merupakan proses biologi di mana sel membahagi untuk meningkatkan bilangan sel, dan apabila proses ini berlaku secara tidak terkawal akibat perubahan genetik, lalu menyumbang kepada pembentukan dan perkembangan sel kanser. Apoptosis merupakan satu proses kematian sel terancang yang dimediasi oleh beberapa laluan isyarat, iaitu laluan intrinsik dan ekstrinsik, yang dicetuskan oleh

pelbagai faktor termasuk tekanan selular, kerosakan DNA, serta pengawasan imun (Carneiro et al. 2020). Proses ini mempunyai kepentingan yang signifikan dalam terapi kanser kerana berperanan dalam penghapusan sel-sel kanser secara terkawal.

Terdapat banyak kajian telah menunjukkan T3 berpotensi untuk merencat proliferasi sel kanser payudara (Idriss et al. 2020), kanser prostat (Wang et al. 2022), paru-paru (Rajasinghe et al. 2019), dan kanser hepar. Selari dengan dapatan tersebut, δ -tokotrienol, iaitu sebatian semula jadi yang berasal daripada vitamin E, turut dilaporkan mempunyai aktiviti antitumor terhadap garis sel karsinoma hepatoselular manusia, melalui pengaktifan proses autofagi yang membawa kepada kematian sel kanser (Montagnani Marelli et al. 2024).

Ujian awal yang melibatkan pengujian minyak kelapa sawit yang kaya dengan fraksi tokotrienol dan alfa tokoferol terhadap proliferasi sel kanser payudara pada galur positif MDA-MB-435, yang mengandungi reseptor estrogen, adalah eksperimen pertama yang membuktikan bahawa fraksi tokotrienol bertanggungjawab untuk merencat proliferasi sel kanser. Penyelidikan seterusnya telah mengesahkan peranan tokotrienol sebagai agen antikanser, menunjukkan keberkesanannya dalam menghalang perkembangan kanser pada pelbagai peringkat penting (Lodu et al. 2019).

Tokotrienol terdiri daripada empat isomer utama iaitu alpha (α), beta (β), delta (δ) dan gamma (γ) yang mempunyai sifat biologi yang berbeza, disebabkan oleh bilangan dan kedudukan kumpulan metil pada cincin kromanol. Walaupun isomer-isomer tersebut mempunyai struktur asas kimia yang sama, perbezaan kecil yang terdapat dalam struktur kimia memberikan kesan yang berbeza terhadap aktiviti biologi. α -T3 mempunyai sifat neuroprotektif (Liu et al. 2024), δ -T3 pula berkesan dalam melawan sel kanser pankreas (Husain et al. 2017), dan sel kanser prostat (Husain et al. 2017). Manakala γ -T3 pula terbukti dalam merencat sel kanser perut (Zhu et al. 2024). Oleh itu, perbezaan struktur kimia antara isomer-isomer tokotrienol dipercayai memainkan peranan penting dalam menentukan potensi terapeutik dan mekanisme tindakan masing-masing.

Tokotrienol menunjukkan aktiviti anti-tumor pada pelbagai peringkat laluan isyarat sel termasuk menurunkan reseptor permukaan sel reseptor tirosin kinase 2 (ErbB2), mengurangkan fosforilasi kinase terkawal isyarat ekstrasel (ERK), protein kinase B (AKT), dan sasaran mekanistik rapamisin (mTOR) fosforilasi terbalik kinase-3 beta penghasil glikogen (GSK-3 β) menyebabkan peningkatan didalam pengawalaturan dan pengeksportan nuklear *forkhead box O3a* (Foxo3a) dan meningkatkan pengekspressan c-Jun, serta melalui sitotoksikiti sel secara langsung. Tokotrienol memberikan kesan serentak pada pelbagai tapak jalan proliferasi sel dan apoptotik dengan mengawal isyarat tapak jalan faktor nukleus kappa B (NF- κ B). Tokotrienol menghalang proliferasi sel kanser pankreas melalui kesan langsung ke atas 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase (HMG-CoA), ErbB2, AKT, ERK, NF- κ B, Foxo3a, c-Jun, p-GSK-3 β , mTOR, dan RSK atau melalui modulasi rangkaian isyarat hulu atau hilir (Shin-Kang et al. 2011).

Kajian terdahulu membuktikan bahawa tokotrienol menghalang pertumbuhan sel kanser payudara dengan merencat aktiviti mitogenik oleh faktor pertumbuhan epidermis (EGF) di dalam sel normal dan neoplastik epitelium sel mamari. Pengaktifan aktiviti tirosin kinase oleh reseptor EGF telah menyebabkan pengumpulan dan fosforilasi beberapa substrat intraselular yang turut mengaktifkan isyarat tapak jalan onkogen tikus (RAS)/ kinase serina (RAF)/ kinase yang mengaktifkan ERK (MEK)/ kinase terkawal isyarat ekstrasel (ERK), juga dikenali sebagai tapak jalan kinase protein yang diaktifkan oleh mitogen (MAPK). Tapak jalan MAPK berperanan dalam mengawal atur proliferasi dan transformasi sel (Sylvester et al. 2011).

Selain itu, kajian terdahulu telah membuktikan bahawa tokotrienol mengaktifkan pengekspressan NAD(P)H, kinon oksidoreduktase 1 (NQO1), heme oksigenase-1 (HO1) dan glutathion S-transferase (GSTs). Enzim-enzim ini berperanan penting dalam melindungi hepar daripada bahan yang bersifat karsinogen. Rawatan T3 menunjukkan peningkatan aras protein dan ekspresi gen NQO1 secara signifikan di dalam hepar mencit. NQO1 berfungsi dalam mekanisme pertahanan selular terhadap tekanan oksidatif stres dan perkembangan pelbagai jenis tumor seperti paru-paru, hepar, kolon pankreas dan payudara (Atia et al. 2016). HO1 juga berperanan dalam merencat tekanan oksidatif melalui penguraian lebihan "heme" (Azman Abdullah et al. 2017).

Manakala protein GSTs pula terlibat dalam detoksifikasi bahan-bahan karsinogen seterusnya melindungi sel hepar daripada bahan yang bersifat karsinogen (Atia et al. 2018).

Kebanyakan kajian terdahulu telah membuktikan hubungkait antara tokotrienol dan peningkatan pengekspresan protein faktor nuklear eritroid-2 (Nrf2). Terdapat kekurangan kajian yang dijalankan ke atas hubung kait antara penggunaan tokotrienol dan pengaktifan tapak jalan Nrf2 di dalam organ hepar secara *in vivo*. Berdasarkan kajian lepas, tokotrienol mempunyai ciri ciri antikanser, serta pelindung hepar dan menjadi lebih menarik untuk mengkaji TRF daripada kelapa sawit berkebolehan dalam mempengaruhi isyarat Nrf2/protein berkaitan ECH mirip Kelch 1 (Keap 1) terutama di dalam hepar. Ini akan menjadi lebih menarik untuk menyiasat peningkatan pengekspresan Protein pelindung hepar Nrf2 dapat membantu dalam menghalang perkembangan kanser hepar pada tikus dengan menggunakan kaedah proteomik berasaskan gel 2-dimensi.

Di dalam kajian ini, kaedah elektroforesis dua dimensi (2-DE) proteomik telah dipilih kerana kaedah ini berpotensi dalam mengenalpasti lebih banyak protein pelindung hepar daripada ujian imunoblot konvensional dalam mengenal pasti protein yang terlibat dalam perlindungan hepar oleh TRF. Tiada kajian telah dilakukan dalam mengkaji kesan tokotrienol ke atas pengekspresan protein hepar dengan menggunakan kaedah proteomik berasaskan gel 2-dimensi. Jika berlakunya peningkatan pengekspressan protein hepar yang bersifat hepatoprotektif, ini membuktikan bahawa TRF bertindak sebagai pelindung hepar atau sebagai pencegah kemoterapi. Oleh itu, TRF boleh dikenali sebagai agen pencegahan kemoterapi untuk mencegah kanser hepar.

1.2 JUSTIFIKASI KAJIAN

Tokotrienol (T3) telah dikenalpasti mempunyai potensi sebagai agen antikanser berdasarkan sifat-sifatnya yang mampu mengubah beberapa laluan molekul yang terlibat dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel kanser. Walau bagaimanapun, kajian terdahulu mengenai suplemen tokotrienol dan ekspresi protein berkaitan Nrf2 kebanyakannya dilakukan dalam sel bukan hepar. Terdapat kekurangan maklumat mengenai bagaimana TRF mempengaruhi laluan isyarat Nrf2/Keap1 di dalam hati.

Peningkatan ekspresi protein Nrf2 dalam hepar berpotensi menghalang hepatokarsinogenesis yang diinduksi secara kimia dalam model tikus. Namun, peranan tokotrienol dalam kimoprevensi hepatokarsinogenesis hepar masih belum difahami sepenuhnya. Setakat ini, tiada kajian komprehensif yang telah dijalankan untuk menyelidik kesan TRF terhadap ekspresi protein global dalam hepar menggunakan pendekatan proteomik berasaskan gel 2D. Di samping itu, kesan pelbagai dos TRF terhadap hepar tikus yang dimodelkan dengan hepatokarsinogenesis belum dikaji menggunakan teknik proteomik 2D. Oleh itu, untuk memahami mekanisme kimoprevensi TRF, adalah penting untuk mengenal pasti protein dalam hepar yang ekspresinya dipengaruhi oleh pendedahan kepada TRF, dengan menggunakan model tikus kanser hepar dan pendekatan proteomik berasaskan gel 2D.

1.3 PERSOALAN KAJIAN

Adakah terdapat kesan bergantung dos pada ekspresi protein global dalam hepar tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis dan dirawat dengan pelbagai dos TRF yang berbeza?

1.4 OBJEKTIF KAJIAN

1.4.1 Objektif Umum

Untuk mencirikan dan membandingkan perubahan dalam pengekspresan protein global pada hepar tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis dan dirawat dengan pelbagai dos TRF yang berbeza menggunakan kaedah proteomik 2-DE.

1.4.2 Objektif Khusus

- a. Untuk mencirikan dan membezakan pengekspresan protein hepar selepas aruhan hepatokarsinogenesis dan rawatan dengan pelbagai dos TRF menggunakan model tikus dan kaedah proteomik 2-DE.
- b. Untuk menentukan tapakjalan mekanisme TRF dalam hepar tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis dan dirawat dengan pelbagai dos TRF, menggunakan kaedah proteomik 2-DE.
- c. Untuk mengenalpasti kesan pemberian pelbagai dos tokotrienol yang berbeza terhadap pengekspresan protein yang dikawal atur oleh faktor transkripsi Nrf2 dan protein yang dikawal atur oleh faktor transkripsi lain dalam hepar tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis.

1.5 HIPOTESIS KAJIAN

- a. Rawatan dengan pelbagai dos TRF akan menyebabkan perubahan signifikan dalam pengekspresan protein hepar pada tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis, berbanding kumpulan kawalan, dan perubahan ini adalah bergantung kepada dos.
- b. Rawatan dengan pelbagai dos TRF akan memodulasi tapakjalan mekanisme tertentu dalam hepar tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis, yang dapat dikenal pasti melalui perubahan signifikan dalam profil pengekspresan protein menggunakan analisis proteomik 2-DE, dan kesan ini adalah bergantung kepada dos.
- c. Pemberian pelbagai dos TRF akan meningkatkan pengekspresan protein yang dikawal atur oleh faktor transkripsi Nrf2 serta mempengaruhi protein yang dikawal atur oleh faktor transkripsi lain dalam hepar tikus yang diaruh hepatokarsinogenesis, dengan kesan yang berbeza mengikut dos.

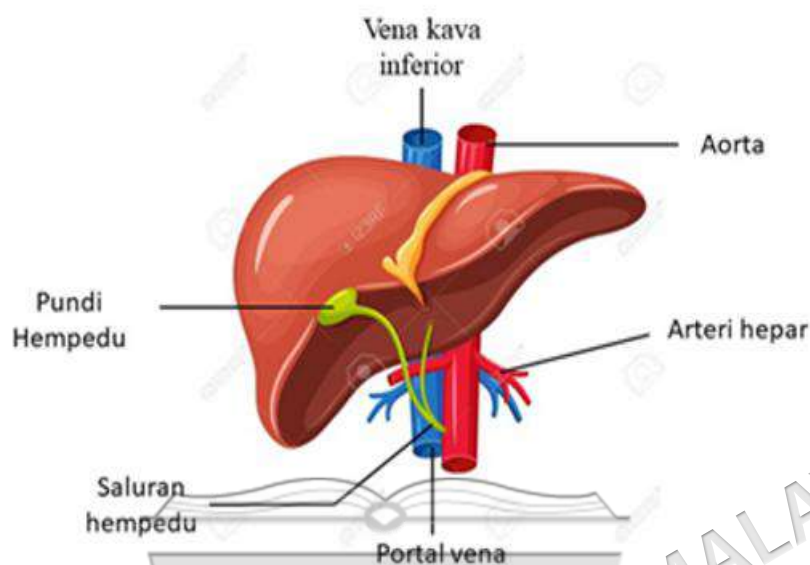
BAB II

KAJIAN LITERASI

2.1 HEPAR

2.1.1 Struktur dan fungsi hepar

Hepar mempunyai empat lobus, iaitu lobus kanan, kiri, kaudat dan kuadrat. Lobus kanan dan kiri merupakan lobus yang terbesar manakala saiz lobus kaudat dan kuadrat adalah lebih kecil dan terletak di bahagian belakang (Ozougwu 2017) (Li et al. 2014). Lobul hepar terdiri daripada sel parenkima terutamanya hepatosit, sel bukan parenkima seperti kolangiosit, sel endothelial sinusoid, sel Kpuffer, sel stelat dan sel imun. Hepatosit dan kolangiosit merupakan dua jenis sel epitelium yang berbeza yang terhasil daripada hepatoblas ketika proses organogenesis. Hepatosit merupakan populasi sel epitelial yang utama yang berperanan penting dalam menjalani fungsi hepar (Sun et al. 2020). Gambaran struktur organ hepar termasuk system vaskular dan saluran hempedu ditunjukkan dalam rajah 2.1 yang menjadi asas kepada fungsi fisiologi dan patologi hepar.



Rajah 2.1 Struktur organ hepar

Hepar merupakan organ yang terletak di antara diafragma dan saluran pencernaan, merupakan organ terbesar di dalam badan yang memainkan peranan penting sebagai pusat metabolisme nutrien dan penyingkiran metabolit buangan. Hepar juga berperanan penting dalam mengekalkan keseimbangan sistematik tubuh badan seperti pengurusan metabolisme asid hempedu dan kolesterol, membersihkan bahan-bahan buangan dalaman dan luaran, mensintesis dan menyimpan glukosa, metabolisme lipid hormon serta merembeskan protein plasma (Berasain et al. 2023; Montagnani Marelli et al. 2019). Hepar ialah organ utama yang bertanggungjawab dalam proses detoksifikasi dadah dan xenobiotik serta berfungsi sebagai organ utama dalam metabolisme asid amino (Li et al. 2014).

2.1.2 Kerosakan pada Hepar

Kecederaan hepar berlaku akibat gangguan metabolit dan pendedahan kepada xenobiotik, yang seterusnya boleh menyebabkan perubahan kepada struktur sel hepar (hepatosit) dan fungsi hepar. Kerosakan hepar yang berpanjangan, akan mengaktifkan sel stelat hepar berperanan dalam sintesis dan pemendapan komponen matriks ekstrasel,

terutamanya kolagen. Penghasilan tisu kolagen yang berlebihan akan membawa kepada pembentukan parut tisu dan lalu mencetuskan fibrosis hepar. Jika proses fibrosis berlaku secara berterusan, ia akan berkembang menjadi sirosis (Xiong et al. 2025). Sirosis hati kronik merupakan salah satu faktor utama yang menyumbang kepada perkembangan karsinoma hepatoselular (HCC). Menurut kajian yang dijalankan oleh (Amin et al. 2025) bahawa 80%-90% pesakit HCC mempunyai sirosis yang kronik. Kecederaan hepatosit yang berpanjangan mengakibatkan pengaktifan sel Kupffer, yang berfungsi dalam pengesanan patogen dan isyarat bahaya, serta mengawal keseimbangan tindak balas keradangan dan pemulihan semasa proses penyembuhan luka hepar (Trefts et al. 2017).

2.1.3 Kanser Hepar

Secara global, kanser hepar adalah jenis kanser keenam paling umum dengan anggaran 850,000 kes baru setiap tahun. Selain itu, ia merupakan penyebab kedua tertinggi dengan kira-kira 800,000 kematian setiap tahun. Menurut laporan epidemiologi 85-90% daripada semua kanser hepar primer adalah karsinoma hepatoselular (HCC). HCC biasanya berlaku kepada pesakit fibrosis hepar atau sirosis akibat penyakit hepar kronik, terutamanya disebabkan oleh jangkitan virus hepatitis B (HBV) dan hepatitis C (HCV) serta penggunaan alkohol secara berlebihan. HBV adalah virus DNA yang boleh menyebabkan mutagenesis. Berdasarkan kajian terdahulu, sebanyak 85% punca berlakunya HCC adalah disebabkan oleh sirosis (Piñero et al. 2020).

Patogenesis HCC adalah suatu proses yang rumit dan melibatkan pelbagai kegagalan molekul, termasuk kegagalan fungsi dalam kitaran sel, perubahan dalam metilasi DNA, ketidakstabilan kromosom, imunomodulasi, peralihan dari epitelium ke mesenkima, peningkatan sel stem HCC, serta kegagalan fungsi mikroRNA (miRNA).

Walaupun mekanisme penyakit ini berbeza-beza bergantung kepada etiologi yang mendasari, urutan yang biasa berlaku adalah kecederaan hepar, diikuti oleh keradangan kronik, fibrosis, sirosis, dan akhirnya HCC. Tindak balas keradangan akut akan pulih setelah punca penyebabnya dihilangkan, sementara keradangan kronik yang tidak ditangani boleh menyebabkan fibrosis dan seterusnya sirosis. Sebahagian besar kes HCC (80–90%) disebabkan oleh sirosis (Chidambaranathan-Reghupaty et al. 2021).

Secara fisiologi dalam pemulihan tisu, selepas kecederaan jangka pendek, miofibroblas dengan cepat dihapuskan melalui apoptosis. Walau bagaimanapun, di bawah kecederaan kronik, pengaktifan sel stelat hepar (HSC) yang berterusan membawa kepada gangguan keseimbangan antara pemendapan dan degradasi matriks ekstraselular (ECM), seterusnya mencetuskan fibrosis hati secara progresif. Tambahan pula, dalam fibrosis lanjutan, bilangan HSC yang diaktifkan meningkat dan miofibroblas menyebabkan kontraksi menggalakkan pengecutan sinusoid hepatik, lalu mengganggu aliran darah dan pertukaran nutrien serta menyebabkan kegagalan fungsi hepar (Roehlen et al. 2020).

Penyakit hepar berlemak bukan alkohol (NAFLD) dikenal pasti sebagai salah satu faktor risiko utama yang menyumbang kepada perkembangan karsinoma hepatoselular (HCC). Kelaziman penyakit hepar berlemak bukan alkohol (NAFLD) semakin meningkat dengan pesat di seluruh dunia. Penyakit NAFLD pada peringkat global dianggarkan sekitar 25%, dengan kadar yang berbeza dari 13% di Afrika hingga 42% di Asia Tenggara. NAFLD merangkumi pelbagai bentuk penyakit, termasuk hepar berlemak bukan alkohol (NAFL) atau steatosis sederhana, yang biasanya berada di tahap awal atau kurang serius, serta steatohepatitis bukan alkohol (NASH), yang berpotensi berkembang menjadi sirosis dan seterusnya HCC. Penyakit ini dipacu oleh sindrom metabolik dan berkait rapat dengan obesiti, rintangan insulin, dan hiperlipidemia. Obesiti dan rintangan insulin menyebabkan keradangan kronik, perubahan dalam metabolisme lipid, serta keadaan pro-karsinogenik yang menyokong perkembangan HCC (Huang et al. 2021).

Steatosis, salah satu tanda utama NAFLD, adalah akibat perubahan dalam metabolisme lipid yang menggabungkan pengumpulan asid lemak bebas (FFA) yang berasal dari tisu adiposa dalam hepatosit, peningkatan lipogenesis hepatik yang

dikaitkan dengan penurunan β -oksidasi asid lemak, dan penurunan dalam pengeluaran trigliserida hepatic. Pengumpulan lipid menyumbang kepada pengumpulan metabolit lipotoksik, tekanan oksidatif di samping perubahan mitokondria, lisosom, dan tekanan retikulum endoplasma. NAFLD menyebabkan kecederaan hepatoselular dan kematian sel melalui pengaktifan kinase N-terminal c-Jun (JNK). Penghasilan sitokin yang tidak terkawal membawa kepada pengaktifan dan proliferasi myofibroblas, termasuk sel stelat hepatic (HSC). Keradangan yang berterusan yang dikaitkan dengan pengumpulan spesies oksigen reaktif serta pengaktifan JNK1 melalui penghasilan FFA dan peningkatan laluan IGF yang sekunder kepada hiperinsulinemia menggalakkan proliferasi sel dan perencatan apoptosis yang menggalakkan berlakunya HCC (Nahon et al. 2020).

Alkohol dikenali sebagai salah satu bahan karsinogen oleh agensi antarabangsa untuk penyelidikan kanser. Penggunaan alkohol secara berlebihan dikaitkan dengan peningkatan risiko pelbagai jenis kanser termasuk HCC, sebanyak 3-10 kali ganda dan secara tidak langsung telah menyumbang sebanyak 30% kes HCC di seluruh dunia (Hyun et al. 2021).

2.1.4 Patofisiologi Kanser Hepar

Kajian terdahulu membuktikan bahawa pengumpulan mutasi dan perubahan genetik yang berlaku dalam hepatosit preneoplastik yang menyebabkan malignan dan perkembangan HCC. Pendedahan terhadap bahan toksik dan pengaruh tindak balas imun didalam hepar menyebabkan berlakunya keradangan melalui pengaktifan sel Kupffer yang membawa kepada nekrosis. Proses pengulangan sel nekrosis hepar dan regenerasi dengan peningkatan penggantian sel, membuatkan sel hepar lebih sensitif terhadap kesan buruk mutagenik agen. Perubahan genetik dan epigenetik membentuk kepada pembentukan nodul, fokus displastik dan HCC (Aravalli et al. 2014).

Reaktif oksigen spesies (ROS) dan reaktif nitrogen spesies (RNS) berperanan penting dalam patogenesis dan perkembangan HCC dengan pengaktifan transkripsi dan sitokin. ROS juga turut menyumbng kepada kerosakan DNA oksidatif lalu menyebabkan berlakunya hepatokarsinogenesis (Aravalli et al. 2014). Tekanan oksidatif secara langsung mengawal pembiakan sel kanser, dan metastasis HCC. Ia juga turut berperanan dalam penurunan tahap enzim antioksidan termasuk superoksida

dismutase (SOD), glutathion reduktase, dan glutathion peroksidase. Tekanan oksidatif juga turut mengganggu mekanisme autofagi dan mengaktifkan Nrf2 yang menyebabkan pecambahan dan peningkatan sel HCC (Mooli et al. 2022).

2.1.5 Mekanisma Kanser Hepar

Ferroptosis adalah satu bentuk kematian sel novel yang berbeza daripada apoptosis, nekrosis dan autofagi, di mana proses ini bergantung kepada pengumpulan besi intrasellular dan ROS. Perubahan dalam metabolisme mitokondria, seperti tindak balas tekanan mitokondria, pengaturan semula metabolik dan abnormaliti proteosomal mitokondria, sangat berkait dengan perkembangan dan metastasis HCC. Peranan utama mitokondria adalah untuk membekalkan tenaga kepada sel melalui fosforilasi oksidatif (OXPHOS). Kecacatan dalam mitokondria juga akan menyebabkan gangguan fungsi mitokondria dan peningkatan pengeluaran ROS. Ferroptosis menunjukkan kesan yang signifikan terhadap pembentukan HCC. Dua molekul utama dalam dalam laluan ferroptosis adalah glutamat dan glutathione peroksidase 4 (Guo et al. 2023).

Penyakit hepar yang disebabkan oleh pengambilan alkohol secara berlebihan merupakan faktor utama berlakunya HCC. Etanol tulen tidak menyebabkan keradangan dan kerosakan hepar secara langsung. Namun, hasil katabolisma alkohol menyebabkan pengumpulan asetildehid dan radikal bebas lalu mempengaruhi tekanan oksidatif, kematian sel apoptotik, nekrosis dan nekroptosis. Penghasilan ROS adalah hasil daripada perembesan keradangan sitokin yang disebabkan oleh tapak jalan keradangan. Kerosakan DNA yang disebabkan oleh ROS, kelemahan genom hepatosit dan merencat limfosit T turut menyumbang kepada perkembangan HCC (Ogunwobi et al. 2019).

Faktor nekrosis tumor (TNF) merupakan salah satu pro-tumorigenik dalam hepatokarsinogenesis. TNF mengaktifkan kedua-dua tapak jalan NF- κ B dan JNK. Pengaktifan NF- κ B secara tidak terkawal merupakan salah satu punca berlakunya keradangan kronik dan seterusnya akan menggalakkan proses pembentukan tumor hepar berlaku (Yang et al. 2019). Tambahan pula, peningkatan ekspresi modulator spesies oksigen reaktif 1 (ROMO1) dalam HCC juga turut meningkatkan ROS yang seterusnya meningkatkan penghasilan HCC secara invasif (Czauderna et al. 2019).

Sel stelat hepar (HSC) berperanan secara langsung dan tidak langsung di dalam perkembangan HCC. Selain bertanggungjawab dalam perkembangan fibrosis, ia juga secara tidak langsung telah menyokong pertumbuhan tumor hepar melalui perembesan faktor angiogenik, iaitu faktor pertumbuhan endotelium vaskular (VEGF) dan angiopoietin-1 (Dhar et al. 2020).

2.1.6 Model kanser hepar

Prosedur pengaruhan kanser bertujuan dalam menghasilkan pembentukan tumor. Model kanser hepar haiwan telah dihasilkan dengan memberikan bahan bersifat karsinogen seperti dietilnitrosamina (DEN) dua-asetilaminofluorena (2AAF) secara interaperitoneum dan oral paksaan. Terdapat beberapa kajian terdahulu yang menjalankan pengaruhan kanser hepar (Arul et al. 2013) (Sadeeshkumar et al. 2016). Kajian terdahulu telah menggunakan DEN selama dua kali sebulan dengan kepekatan 150mg/kg dan diikuti 2AAF (20mg/kg) sebanyak 4 kali seminggu selama 3 minggu bagi tujuan menggalakkan lagi proses hepatokarsinogenesis. Hepatokarsinogenesis dapat diperhatikan dengan peningkatan enzim hepar yang menjadi penanda biokimia bagi kerosakan hepar (De Luján Alvarez et al. 2002) (Vera et al. 2015). Tempoh rawatan selama 12 minggu dijalankan keatas kajian ini bagi mengkaji kesan pengambilan TRF dengan lebih jelas.

2.2 RAWATAN KANSER HEPAR

Kajian mengenai rawatan kanser hepar masih giat dijalankan, selari dengan peningkatan kes dan cabaran pengurusan pesakit pada peringkat lanjut. Antara pendekatan farmakologi yang dikaji termasuk penggunaan gabungan ubat-ubatan, seperti atezolizumab dengan bevacizumab serta durvalumab dengan tremelimumab. Strategi ini bertujuan untuk mensasarkan laluan biologi kompleks kanser hepar, menghalang pertumbuhan dan penyebaran tumor (Yoo et al. 2024).

Terdapat beberapa kajian terdahulu yang melaporkan bahawa bahan-bahan yang kaya dengan antioksidan seperti curcumin, resveratrol dan silymarin menunjukkan potensi sebagai agen antikanser melalui pengawalan tekanan oksidatif, perencatan angiogenesis serta penginduksian apoptosis (Zheng et al. 2022). Selain antioksidan semula jadi, bahan antioksidan sintetik juga didapati mempengaruhi proses jalur selular

tertentu, termasuk laluan kematian sel yang dimediasi oleh protein kinase 1 berinteraksi reseptor (RIPK1). Laluan ini berperanan sebagai pengawal atur penting dalam homeostasis sel dan tindak balas terhadap kerosakan sel (Delanghe et al. 2021).

2.3 TOKOTRIENOL

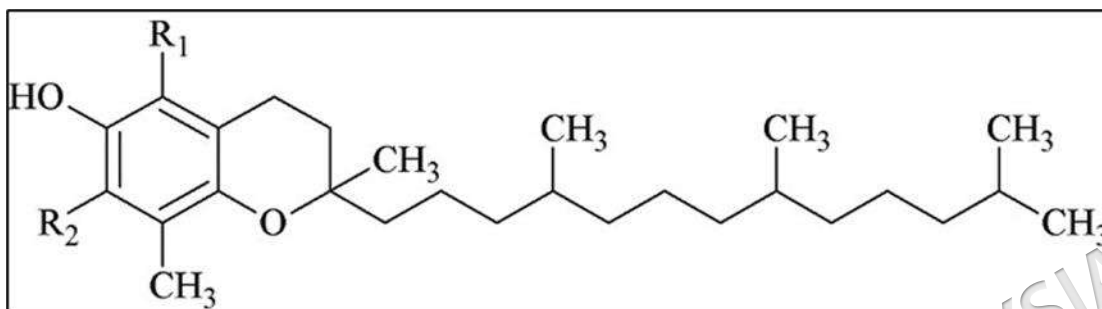
2.3.1 Deskripsi dan Struktur

Vitamin E adalah bahan yang larut lemak yang berasal daripada tumbuhan yang struktur molekulnya terdiri daripada cincin kromanol dengan rantai sisi yang terletak di kedudukan C2'. Vitamin E merujuk kepada kumpulan lapan sebatian yang berbeza iaitu α -, β -, γ -, dan δ - tokoferol (TP) serta empat tokotrienol (T3) yang sepadan. Empat tokoferol mempunyai rantai sisi fitil yang tepu, manakala T3 mempunyai rantai sisi isoprenil di C3' dan C7' mempunyai konfigurasi trans. Isofom yang berbeza dengan bilangan dan kedudukan kumpulan metil pada kedudukan C5', C7' dan C8' cincin kromanol, manakala isofom β - dan γ - mempunyai dua dan isofom δ mempunyai satu kumpulan metil (Niki et al. 2019).

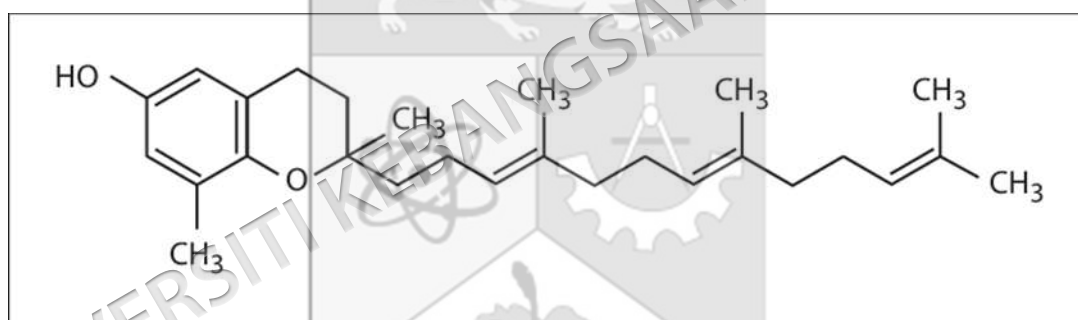
Vitamin E disintesis secara eksklusif oleh semua organisma fotosintetik seperti alga, dan sianobakteria. Sumber utama tokotrienol ialah gandum, barli, dan padi. Pati ekstrak minyak sawit pula mentah mengandungi sehingga 800 mg/kg tokotrienol dan juga merupakan sumber utama tokotrienol. Pengekstrakan daripada mesokarp buah sawit, endosperma, dan minyak kernel mengandungi sehingga 30% tokoferol dan 70% tokotrienol yang terdiri daripada α -, β -, γ -, dan δ - sebagai unsur utama. Berbeza dengan tokoferol, tokotrienol mempunyai rantaian sisi isoprenoid yang mengandungi tiga ikatan berganda pada kedudukan tertentu, sebagaimana yang diperincikan dalam Rajah 2.2 (struktur tokoferol) dan Rajah 2.3 (struktur tokotrienol) menjadikannya lebih tidak tepu dan meningkatkan mobiliti dalam dwilapisan lipid membran. Tokotrienol (T3) juga terdiri daripada 50% asid lemak tepu, 40% asid lemak tidak tepu, dan 10% asid lemak poli tidak tepu yang bebas daripada asid lemak trans (Ranasinghe et al. 2022).

Tokotrienol dan tokoferol (TP) merupakan ahli dalam keluarga tokokromanol, dan kedua-duanya berkongsi struktur asas yang sama, iaitu cincin kromanol dengan satu kumpulan hidroksil (-OH) yang berperanan dalam aktiviti antioksidan. Walau

bagaimanapun, kedua-dua kumpulan ini berbeza dari segi rantai samping hidrofobik. Tokoferol mempunyai rantai samping fitil yang tepu, manakala tokotrienol pula mempunyai rantai samping isoprenoid yang tidak tepu dengan tiga ikatan rangkap, seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.3 (Szewczyk et al. 2021).



Rajah 2.2 Struktur tokoferol



Rajah 2.3 Struktur tokotrienol

2.3.2 Potensi Terapeutik

T3 mempunyai sifat-sifat pelindung saraf, antioksidan, antikanser dan pengurangan kolesterol yang kuat seiring berbeza daripada sifat tokoferol. Jumlah mikromolar T3 menghalang aktiviti enzim HMG-CoA reduktas enzim hepar yang bertanggungjawab untuk mensintesis kolesterol. Rantainya T3 membolehkan penetrasi yang lebih berkesan ke dalam tisu lapisan lemak yang tepu seperti otak dan hepar (Ahsan et al. 2014).

Berdasarkan kajian terdahulu, δ -tokotrienol mempunyai kadar aktiviti biologi dan farmakologi yang tinggi berbanding γ -tokotrienol, α -tokotrienol dan β -tokotrienol.

Tokoferol didapati tidak menurunkan kadar kolesterol serum dalam haiwan dan manusia, malah α -tokoferol mengurangkan kesan γ -tocotrienol terhadap aktiviti reduktase ko-enzim A β -hidroksi- β -metilglutaril hepatic. Beberapa kajian terdahulu telah membuktikan bahawa tokotrienol mempunyai sifat farmakologi dalam merawat penyakit kardiovaskular, kanser, diabetes, gastrik, osteoporosis, artritis dan ulser peptik kepada manusia. Selain itu, tokotrienol juga boleh berkebolehan dalam merendahkan bacaan kolesterol dalam badan hipokolesterolemik, bertindak sebagai anti-keradangan, antioksidan, perlindungan neuro (Qureshi 2022).

Beberapa kajian telah menunjukkan kesan kebaikan suplemen vitamin E terhadap keradangan, isyarat tapak jalan, dan fungsi imun dalam manusia serta pengaruhnya terhadap patologi yang berkaitan dengan penyakit Alzheimer (AD). Selain itu, kajian dalam model AD murin telah mengenal pasti kaitan antara kekurangan vitamin E dan peningkatan ekspresi gen yang berkaitan dengan perkembangan AD termasuk yang terlibat dalam pengawalan apoptosis, penghantaran neuro, dan metabolisme A β . Vitamin E telah membuktikan bahawa dapat memberikan kesan perlindungan terhadap protein tau yang terfosforilasi secara berlebihan. Kehadiran T3 dan TP dapat mengurangkan aktiviti enzim siklooksigenase (COX) yang berperanan pengaruh kepada keradangan neuro dan tekanan oksidatif. Perembesan metabolisme A β dikurangkan melalui perencatan enzim *secretase* (Browne et al. 2019).

Selain itu, vitamin E juga digunakan secara meluas dalam bidang dermatologi untuk kesan antioksidan dan perlindungan radiasi ultraviolet (UV), yang memberikan perlindungan terhadap cahaya matahari dan melambatkan proses penuaan kulit. Satu kajian yang dilakukan pada kulit gluteal manusia menunjukkan bahawa rawatan awal dengan agen topikal vitamin E yang baru diformulasikan (10% tokoferol dan 0.3% tokotrienol) menghasilkan perlindungan foto yang lebih baik terhadap radiasi UVB minimum. Vitamin E juga menunjukkan kesan anti-penuaan melalui kemampuannya untuk meningkatkan penghasilan kolagen dan mencegah degradasi kolagen. Selain itu, suplemen dengan TRF sawit (500 μ g/mL) juga ditunjukkan dapat merencat pengeluaran melanin yang berlebihan dalam melanosit kulit manusia primer dalam vitro (Pedrelli et al. 2012)

2.3.3 Tokotrienol sebagai Pelindung Hepar

Dalam sindrom metabolik, pengambilan asid lemak bebas (FFA) yang berlebihan di dalam hepar menyebabkan tekanan oksidatif, lalu menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) yang boleh merosakkan hepar. Oleh itu, antioksidan adalah pendekatan yang sesuai sebagai terapi tambahan kepada perubahan gaya hidup dalam merawat penyakit hepar berlemak tanpa alkohol (NAFLD). Institut Kesihatan dan Penjagaan Cemerlang Kebangsaan (NICE) dan Persatuan Amerika untuk Kajian Penyakit Hepar (AASLD) dalam garis panduan mereka mencadangkan penggunaan vitamin E pada pesakit NAFLD dalam kalangan orang dewasa.

Kajian menggunakan sel HepG2 yang dirawat dengan δ - dan γ -tokotrienol menunjukkan penekanan gen yang terlibat dalam homeostasis lipid termasuk HMCR dan APOB100, sekali gus mengurangkan biosintesis trigliserida (TG), kolesterol total (TC), dan lipoprotein berketumpatan sangat rendah (VLDL). Tokotrienol juga mempunyai kesan yang kuat dalam mengurangkan adipositi serta pembentukan sel lemak. Ia diandaikan bahawa γ -tokotrienol boleh mengurangkan adipogenesis kerana proses ini berkongsi tapak jalan yang sama seperti dalam pembentukan tumor. Kajian tersebut mendapati bahawa γ -tokotrienol mencegah adipogenesis dalam sel hASCs yang sedang membeza dalam cara yang bergantung kepada isomer dan dos. Dalam beberapa garis sel adiposit, γ - dan δ -tokotrienol dilaporkan mempunyai ciri anti-obesiti melalui isyarat tapak jalan mitokondria yang dimediasi oleh Bax atau AMPK. AMPK adalah modulator untuk tapak jalan lipid dan kolesterol, menjadikannya sasaran terapeutik yang terbaik untuk merawat NAFLD (Al-Baiaty et al. 2021).

Alfa tokoferol (TP) atau alfa tokotrienol (T3) juga turut menunjukkan kesan positif kebergantungan dos terhadap kecederaan hepar yang disebabkan oleh pendedahan kepada asetaminofen (APAP) dan hidrogen peroksida dengan menghentikan radikal bebas, menghalang tekanan mitokondria dan menahan tekanan oksidatif. Kesan biokimia ini turut mencetuskan isyarat tindak balas anti-keradangan dan penjana semula hepatosit selepas kecederaan (Tan et al. 2015).

Kedua-dua sifat antioksidan dan modulator gen vitamin E menunjukkan memainkan peranan penting dalam melindungi hepar daripada pelbagai ancaman,

termasuk agen penjana radikal bebas seperti karbon tetraklorida (CCl₄). Vitamin E (sebagai α -TP) adalah nutrien penting yang terlibat dalam melindungi tisu daripada kesan berbahaya tekanan oksidatif dan peningkatan peroksidasi lipid. Fungsi ini sangat penting dalam melindungi hepar semasa pendedahan kepada agen penjana radikal bebas seperti CCl₄. Kecacatan gen antioksidan seperti glutathione peroxidase 4 (GPX4), dan lipotoksisiti adalah tanda patogenik penyakit hepar berlemak bukan alkohol (NAFLD). NAFLD adalah keadaan tekanan oksidatif hepar dan rintangan insulin, yang akhirnya boleh berkembang menjadi steatohepatitis bukan alkohol (NASH) dengan risiko peningkatan sirosis dan hepatokarsinoma. Selain peranan antioksidan larut lemak, vitamin ini telah dibuktikan mempengaruhi ekspresi gen yang berkaitan dengan metabolisme lipid dan bertindak sebagai pelindung kepada pelbagai model sel dan tisu, termasuk sel dan tisu hepar (Bartolini et al. 2022).

Kajian-kajian terdahulu telah menunjukkan bahawa terdapat hubungan antara aktiviti antioksidan vitamin E dan pengaruh beberapa enzim fasa II yang terlibat dalam metabolisme dan detoksifikasi. Pengekspresan enzim-enzim fasa II dikawal atur oleh transkripsi faktor nuklear berkaitan eritroid 2 (Nrf2). Enzim fasa II adalah penting untuk pertahanan selular dengan meningkatkan penyingkiran radikal bebas dan metabolit toksik. Oleh itu, enzim fasa dua memainkan peranan yang penting untuk melindungi daripada berlakunya kanser dan penyakit lain. Pemberian TRF terhadap muncit menunjukkan pengaktifan Nrf2 dalam hepar, yang seterusnya mengaruh kepada pengekspresan gen sitoprotektif yang terlibat dalam metabolisma fasa II dan pertahanan antioksidan (Atia et al. 2021).

2.3.4 Tokotrienol sebagai Rawatan Kanser

Tokotrienol menunjukkan beberapa aktiviti antikanser semulajadi kerana mempunyai sifat anti-keradangan, anti-proliferatif, anti-angiogenik yang terlibat dalam pengawal aturan pelbagai isyarat tapak jalan yang berkaitan dengan kanser. T3 merembeskan aktiviti anti-keradangan dengan merencat siklooksigenase (COX-2), factor teraruh hipoksia-1 (HIF-1), sintesis nitric oksida teraruh (iNOS), prostaglandin E2 (PGE2), dan interleukin (IL)-1, IL-6, dan IL-8 (Sailo et al. 2018).

Program kematian sel (PCD) adalah mekanisme selular yang dipelihara secara evolusi, yang penting semasa perkembangan embrio, morfogenesis tisu, dan untuk penyingkiran sel-sel yang tidak dikehendaki atau rosak dalam badan. Terdapat dua jenis PCD, iaitu, apoptosis (Jenis I) dan autofagi (Jenis II). Selain itu, nekrosis juga dikenali sebagai kematian sel tidak sengaja, juga boleh menjadi satu bentuk PCD, yang dikenali sebagai nekroptosis (Jenis III PCD). Nyahpengawalaturan tapak jalan-tapak jalan sering dijumpai ketika proses perkembangan kanser. Tokotrienol merembeskan gangguan mitokondria melalui pengaruh ketelapan membran luar mitokondria (MOMP) (Tham et al. 2019).

Apoptosis adalah proses kritikal yang digunakan sebagai mekanisme pertahanan semula jadi terhadap permulaan kanser. Tokotrienol adalah salah satu daripada beberapa sebatian semula jadi mempunyai ciri antitumor yang berkesan melalui tapak jalan pengaruh apoptosis. γ -T3 menurunkan ekspresi beberapa produk gen onkogenik dengan menghalang tapak jalan NF- κ B dan juga menyebabkan apoptosis yang ketara dalam sel-sel tumor. Rawatan sel PCa dengan γ -T3 menghasilkan kesan perencatan pertumbuhan dengan mempengaruhi beberapa laluan isyarat dan menunjukkan kesan kepekaan kemo dan anti-invasif γ -T3 terhadap sel-sel kanser prostat (Aggarwal et al. 2019).

TRF terdiri daripada isomer α -TP, α -T3, γ -T3, dan δ -T3 telah membuktikan aktiviti antiproliferatif dalam melawan sel kanser payudara. TRF berkebolehan dalam merencat pertumbuhan sel iaitu MDA-MB-231 dan MCF7 BC dan telah terbukti bahawa γ -, dan δ - T3 merupakan isomer yang paling berkesan dalam perencatan sel. Berdasarkan kajian lepas, γ -T3 telah bertindak sebagai agen anti-kanser yang menunjukkan keberkesanan dalam pelbagai jenis kanser seperti prostat, kolon, hepar dan payudara. Sebagai anti-tumorigenik, γ -T3 juga dilaporkan bertindak melalui pelbagai mekanisme termasuk perencatan laluan NF- κ B, TGF- β , dan P38, pengaktifan kaspase dan induksi apoptosis, pengurangan tahap cyclin D1 dan kinase bergantung kepada cyclin (CDK) 2, 4 dan 6, serta pengurangan pengawalan laluan Ras/Raf/MEK/ERK dan PI3K/AKT/GSK (Idriss et al. 2020).

δ -TT boleh memberikan kesan anti-tumor yang ketara pada sel kanser ovari (OC) dengan mengurangkan ketahanan dan percambahan sel. Penglibatan tapak jalan

apoptosis secara intrinsik dalam aktiviti anti-OC, δ -TT telah dibuktikan oleh perencatan sitotoksiti sebatian yang dimediasi oleh benzyloxycarbonyl-val-ala-asp (OMe)-fluorometilketon (Z-VAD-FMK). Isoform γ telah dilaporkan mencetuskan kegagalan fungsi mitokondria dan apoptosis berkaitan ketidakseimbangan oksidatif dalam sel adeno karsinoma gastrik, serta menjadikan sel kanser kolorektal lebih peka kepada aktiviti proapoptotik ligand penginduksi apoptosis yang berkaitan TNF (TRAIL) melalui pengeluaran ROS yang berlebihan. Begitu juga, δ -TT boleh menyebabkan sitotoksiti yang dimediasi oleh ROS dalam pelbagai model kanser payudara dan prostat, manakala α -tokoferil suksinat, analog Vitamin E yang tidak aktif secara redoks, telah merangsang pelepasan sitokrom c dalam neuroblastoma melalui perubahan homeostasis redoks (Fontana et al. 2021).

T3 menunjukkan keberkesanan menghalang aktiviti sel stem kanser. δ -T3 terbukti menghalang pembentukan sfera tumor sel melanoma manusia. δ -T3 juga berjaya menghalang pengekspresan faktor transkripsi sel stem termasuk gen *nanog* *homeobox* (NANOG), faktor transkripsi oktamer 4 (OCT4), dan faktor transkripsi SOX2 (SOX2), dalam sel kanser pankreas, penanda kesteman permukaan CD44 dalam tumor xenograf sel kanser pankreas. γ -T3 juga turut menghalang tapak jalan mevalonat dan mengaktifkan laluan sintesis seramida de novo (seramida yang disintesis dari awal dalam sel) yang mengurangkan isyarat yang dimediasi STAT-3 dan membawa kepada perencatan sel stem kanser payudara. T3 juga mempunyai sifat anti-angiogenesis, δ -T3 dan γ -T3 merencat tumor angiogenesis dalam xenograft kanser pankreas, kolorektal dan sel kanser hepar beserta tumor pankreas yang berkembang dalam tikus transgenik KPC (Yang et al. 2020).

2.3.5 Mekanisma Antikanser oleh Tokotrienol

T3 juga dilaporkan secara meluas mempunyai sifat antikanser di mana ia mengaruhi perhentian pertumbuhan dan kematian sel terutamanya apoptosis dalam sel kanser payudara, saluran pencernaan, prostat, paru-paru dan tulang. Secara mekanistik, sifat antikanser T3 bergantung kepada jenis isofom dan model sel kanser. Kesan antikanser yang diperantarai T3 melibatkan beberapa tapak jalan dan transduksi seperti pemindah isyarat dan pengaktifan transkripsi 3 (STAT3), dan glikogen sintase kinase 3β , fosfoinositida 3-kinase/Akt, HMG CoA reductase, Ras/Raf/MAPK, dan factor nuclear kappa B (Nfkb). T3 dilaporkan dapat mengaruhi aktiviti stres retikulum endoplasma

(ERS) yang penting dalam menghasilkan aktiviti biologinya seperti neuroproteksi dan antikanser (Pang et al. 2023).

Vitamin E meningkatkan ekspresi perencat kinase bergantung siklin (CDK) dan mengurangkan fosforilasi protein Rb (retinoblastoma). Kesan antiproliferatif T3 juga dianalisis dalam sel kanser prostat. Kajian terdahulu melaporkan bahawa penyediaan TRF memberikan perencatan pertumbuhan yang signifikan terhadap sel kanser prostat melalui penahanan G1. T3 telah ditunjukkan dapat merencat proliferasi dan mengaruh kepada apoptosis dalam sel kanser prostat dengan mempengaruhi ekspresi atau aktiviti pelbagai sasaran, seperti NF- κ B, fosfoinositida-3 kinase (PI3K)/Akt, isyarat pengubah dan pengaktifan transkripsi (STAT), reseptor faktor pertumbuhan transformasi β (TFG β), siklin, serta penghambat kitaran sel p27 dan p21. Oleh itu, T3 dapat merencat pertumbuhan tumor dengan menyekat kitaran sel pada fasa peralihan G1/S, sekurang-kurangnya sebahagiannya, melalui mekanisme epigenetik (Montagnani Marelli et al. 2019).

T3 merencat pengaktifan NF- κ B atau STAT3 dan gen yang dikawalatur dalam sel imun dan kanser, dan jauh lebih baik daripada tokoferol (TP) untuk aktiviti-aktiviti ini. Dalam sel kanser pankreas dan model pra-klinikal kanser pankreas, γ T3 dan δ T3 menghalang fosforilasi NF- κ B dan STAT3, serta mengurangkan gen pro-survival. γ T3 menghapuskan pengkayaan sel stem kanser dalam sel kanser payudara manusia yang rintang terhadap ubat-ubatan melalui perencatan isyarat STAT3 dan pengaktifan tapak jalan sintesis ceramide de novo (Jiang 2019).

2.4 PROTEOMIK

Proteomik merupakan salah satu teknik analisis untuk mengkaji pengekspresan protein, struktur, fungsi dan interaksi dalam sel, tisu, atau organisma tertentu. Komposisi dan kepekatan Protein dianalisis untuk mengenal pasti penanda penyakit atau mekanisme rawatan kerana terdapat perubahan dari sudut patologi dan biologi. Proteomik berasaskan kromatografi cecair-spektrometri jisim tandem (LC-MS/MS) telah diperkembangkan sebagai alternatif kepada proteomik berasaskan gel dan

immunopengesanan yang lebih memakan masa dan memerlukan banyak tenaga. Dalam proteomik, Protein dipisahkan dan dianalisis secara langsung menggunakan LC-MS/MS untuk mengenal pasti, mencirikan dan mengukur protein yang dihasilkan daripada gen tertentu akibat variasi genetik (Duong et al. 2023).

Kaedah proteomik juga membenarkan perincian pelbagai sifat untuk ribuan Protein termasuk taburan tisu, penglokasian subseleksi, pelbagai pengubahsuaian pasca translasi (PTM), serta interaksi protein-protein yang lain. Kaedah ini lebih kehadapan untuk teknik pengayaan, pengionan dan resolusi alatan telah memudahkan dalam proses mengenalpasti, memperincikan dan kuantifikasi PTM, manakala kajian proteomik yang sukar telah memetakan rangkaian yang kaya dengan ribuan interaksi Protein-Protein yang baru (Parker et al. 2020).

2.4.1 Gel Elektroforesis Dua-Dimensi dan Spektrometer Jisim

Elektroforesis gel poliakrilamida dua dimensi (2D-PAGE) merupakan salah satu kaedah yang sering digunakan untuk pemisahan protein dalam campuran biologi yang kompleks. Teknik ini berkebolehan dalam memisahkan protein berdasarkan sifat fitokimia seperti titik isoelektrik dan berat molekul protein. Pada dimensi pertama, protein dipisahkan mengikut titik isoelektrik di sepanjang kecerunan pH menggunakan jalur kecerunan pH terawat kecerunan pH tak alih (IPG). Pada dimensi kedua, protein yang telah ternyahasli dipisahkan mengikut berat molekul menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida SDS (SDS-PAGE). Jalur IPG daripada pemisahan fokus isoelektrik (IEF) dimensi pertama disusun sepanjang bahagian atas gel poliakrilamida dan apabila cas dikenakan, protein akan bergerak dari jalur ke dalam gel dan dipisahkan berdasarkan saiz mereka menggunakan SDS-PAGE (Meleady 2018).

Dimensi pertama dijalankan dalam rod gel poliakrilamida yang dibentuk dalam tiub kaca dan mengandungi amfolit yang membentuk kecerunan pH dalam medan elektrik. Pengenalalan kecerunan pH terawat (IPG) memberikan kesan yang signifikan terhadap penggunaan IEF untuk memisahkan campuran kompleks dalam julat pH yang luas. IPG membolehkan pembentukan kecerunan pH yang stabil dan mampu memfokuskan protein asidik dan alkali pada satu gel. Amfolit dilampirkan pada molekul akrilamida dan dicurahkan ke dalam gel untuk membentuk kecerunan pH

yang tetap. Bagi dimensi kedua, protein-protein yang diekstrak daripada serum sampel dimuatkan kedalam gel berasingan mengikut kumpulan sampel dan Protein tersebut dipisahkan mengikut saiz (Jorin-Novo et al. 2019).

Objektif utama penggunaan kaedah 2D gel elektroforesis adalah untuk mengenalpasti protein baru dan menilai jutaan relatif protein antara sampel melalui kaedah perbandingan. Protein-protein yang terhasil diatas gel diperlihatkan dengan menggunakan larutan Coomassie Blue, gel tersebut direndam selama semalaman. Bintik-bintik protein yang terhasil diatas gel kemudiannya diimbis untuk mengenalpasti intensiti setiap protein. Dalam eksperimen 2D gel, protein diekstrak daripada tiga kumpulan sampel yang berbeza iaitu, kumpulan kawalan, kumpulan rawatan dan kumpulan penyakit kawalan. Protein-protein yang berlabel disusun mengikut susunan yang sama seperti di atas gel. Sampel kumpulan kawalan berfungsi sebagai standard piawaian, membolehkan padanan antara gel. Sampel kumpulan kawalan perlu mempunyai setiap protein yang terdapat dalam semua sampel dalam eksperimen. Protein yang dikehendaki dipotong daripada gel untuk dicerna dan dikenalpasti melalui teknik MALDI-TOFF spektrometer jisim (Jorin-Novo et al. 2019).

Selain itu, elektroforesis gel perbezaan dua dimensi (2D-DIGE) meningkatkan kadar pemprosesan dengan menghapuskan langkah pewarnaan gel yang memakan masa. Dalam 2D-PAGE konvensional, gel dicat secara manual selepas elektroforesis untuk memvisualisasikan titik protein. Dalam 2D-DIGE, gel diapit dan disokong antara dua plat kaca tidak fluoresen dan diambil gambar menggunakan pengimbas laser. 2D-DIGE juga secara ketara meningkatkan bilangan titik protein dengan menggunakan peranti elektroforesis gel format besar, dengan itu mencapai resolusi yang lebih baik dan lebih jelas bagi bintik protein, yang sebaliknya mungkin bertindih antara satu sama lain dalam gel kecil. Satu lagi kelebihan 2D-DIGE adalah tahap sensitiviti yang tinggi, yang membolehkan visual protein yang jarang terdapat dalam sampel yang dilabel dengan pewarna fluoresen ultra-sensitif. Untuk pembangunan penanda bio, data proteomik dibandingkan di antara pelbagai kumpulan sampel, yang direka mengikut ciri klinikal dan patologi. 2D-DIGE format besar telah digunakan untuk membangunkan biomarker tisu prognostik, biomarker rawatan, dan biomarker diagnostik (Kondo 2019).

Perkembangan dalam teknologi spektrometri jisim, bersama dengan ketersediaan pangkalan data urutan DNA dan protein yang luas serta alat perisian untuk pencarian data, telah memungkinkan prosedur spektrometri jisim yang cepat dan sensitif untuk pengenalan protein. Instrumen MALDI-TOF kini agak biasa di makmal biokimia. Prinsip di sebalik penggunaan MALDI-TOF-MS untuk pengenalan protein adalah bahawa pencernaan protein dengan protease tertentu akan menghasilkan campuran peptida yang unik kepada protein tersebut. Pengukuran jisim molekul peptida ini kemudian memberikan set data ciri yang dipanggil cap jari jisim peptida (PMF). Data PMF ini kemudian boleh dibandingkan dengan jisim molekul peptida teori yang akan dihasilkan dengan menggunakan protease yang sama untuk mencerna setiap protein dalam urutan tersebut. Prosedur ini melibatkan pemotongan jalur protein atau bintik dari gel 2D PAGE, penyahwarnaan kepingan gel, pengurangan dan alkilasi protein, pencernaan dengan tripsin, penggunaan spektrometri jisim MALDI-TOF untuk menentukan jisim peptida tripsin dan pencarian pangkalan data dengan data PMF untuk mengenal pasti Protein (Webster et al. 2012).

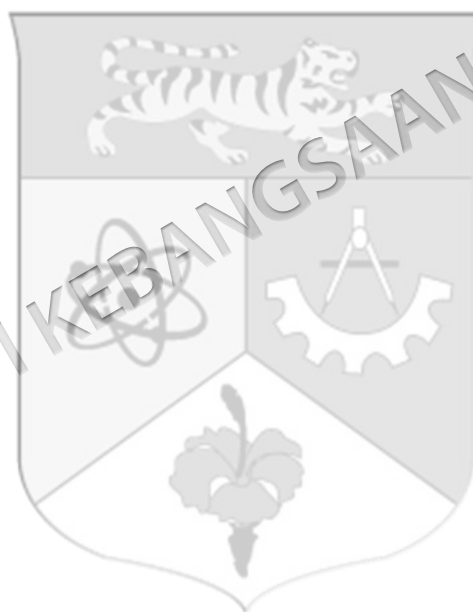
2.4.2 2D-Gel Elektroforesis dalam Rawatan Kanser

Elektroforesis gel dua dimensi (2D-PAGE) bersama dengan MALDI-TOF-MS digunakan untuk menyiasat perkembangan ketahanan kimia dalam barisan sel melanoma. Berdasarkan kajian terdahulu, beberapa protein telah mengalami ekspresi berbeza. Sebagai contoh, dalam kebanyakan varian sel, peningkatan ekspresi isoform protein kejutan haba HSP60 dan HSP70 diperhatikan. Kajian yang sama melaporkan peningkatan ekspresi protein tekanan kecil HSP27. Dilaporkan bahawa apabila sel dirangsang dalam leukemia, HSP27 sering menjadi sasaran fosforilasi. Protein yang sama sering dikaitkan dengan penghambatan apoptosis yang disebabkan oleh pelbagai kemoterapeutik (Agostini et al. 2023).

Analisis 2DGE mendedahkan bahawa ekspresi beberapa protein mitokondria meningkat dalam sel BFTC-905 yang dirawat dengan tangeretin, termasuk rantai D ATP sintase, protein 1 kompleks T, isozim piruvat kinase M1/M2, isomerase triosefosfat (TPI) dan protein teras kompleks ubikuinol-sitokrom-c-reduktase 2. Keputusan mencadangkan bahawa tangeretin mempengaruhi metabolisme tenaga mitokondria yang dikaitkan dengan induksi apoptosis. Tekanan intrasel mungkin mencetuskan

lalu intrinsik apoptosis dalam sel dan organel yang terlibat dalam proses ini termasuk mitokondria dan retikulum endoplasma. Kegagalan fungsi mitokondria diketahui memainkan peranan utama dalam apoptosis. Protein keluarga B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) terganggu, lalu pelepasan sitokrom C berlaku dari mitokondria ke sitosol disebabkan oleh peningkatan potensi membran mitokondria (Lin et al. 2019).

Kajian-kajian ini membantu dalam meningkatkan pemahaman terhadap tindak balas rawatan tokotrienol (T3) terhadap kanser hepar. Walaubagaimanapun, lebih banyak tapak jalan perlu dikenalpasti bagi menghubungkan kesemua protein yang terlibat secara keseluruhan. Teknologi proteomik mampu menyediakan maklumat berkaitan ekspresi protein pada peringkat global. Ini akan memudahkan dan mempercepatkan pengenalpastian protein dan tapak jalan intraselular yang berkaitan.



BAB III

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 PENGENDALIAN HAIWAN

Sejumlah 42 ekor tikus jantan Wistar yang berusia 10-12 minggu seberat 200g diperolehi daripada Unit Sumber Haiwan Makmal, Universiti Kebangsaan Malaysia. Setiap tikus telah ditempatkan dalam sangkar berpengudaraan individu (IVC) yang terletak di Bilik Haiwan Makmal Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia mengikut peraturan dan pengendalian haiwan yang telah diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC) dengan sijil dan nombor kelulusan FAR/FP/2021/AZMANABDULLAH/24-MAR./1162-MAR-2021-OCT-2022.

Kesemua tikus yang diambil dari Unit Sumber Haiwan Makmal menjalani proses adaptasi selama satu minggu bagi proses penyesuaian diri dan diberikan palet makanan tikus (Gold Coin, Malaysia) dan minuman setiap hari secara ad libitum selama 12 minggu.

3.2 PROSEDUR PENGARUHAN KANSER

3.2.1 Alat Radas

- A. Picagari 1cc/ml (Terumo ®)
- B. Jarum 26 G x 1/2" (Terumo ®)
- C. Jarum paksaan oral

3.2.2 Reagen

- a) Larutan dietilnitrosamina (DEN) Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA).
- b) Larutan 2-asetilaminofluorena (2AAF) Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA).

i. Penyediaan larutan dietilnitrosamina (DEN) 60mg/ml

Sebanyak 0.63 ml DEN dilarutkan ke dalam 9.37 ml air suling bagi mendapatkan kepekatan 60 mg/ml.

ii. Penyediaan larutan 2-asetilaminofluorena (2AAF) 45mg/ml

1.2 g 2AAF ditimbang dan dilarutkan di dalam 27 ml DMSO. Kemudian sebanyak 73 ml minyak jagung ditambah ke dalam larutan tersebut.

iii. Penyediaan larutan dimetilsulfoksida (DMSO)

Larutan DMSO telah disukat sebanyak 8.1 ml dan seterusnya di tambah ke dalam 21.9 ml minyak jagung.

iv. Penyediaan 100 ml 0.9% larutan natrium klorida (NaCl)

Sebanyak 0.9 g sodium klorida dilarutkan dalam 100 ml air suling untuk menghasilkan 0.9% larutan natrium klorida.

3.2.3 Model Hepatokarsinogenesis

Sebanyak 42 ekor tikus dibahagikan kepada tujuh kumpulan, dengan setiap kumpulan terdiri daripada enam ekor tikus. Kumpulan 1 dan 2 tidak diaruh dengan hepatokarsinogenesis, manakala kumpulan 3 hingga 7 telah diaruh dengan hepatokarsinogenesis. Menurut protokol yang telah ditetapkan sebelum ini dengan beberapa pengubahsuaian. Kajian ini dimulakan dengan penggunaan larutan dietilnitrosamina (DEN) sebagai agen pengaruh dan larutan 2-asetilaminofluorena (2AAF) sebagai agen penggalak (De Luján Alvarez et al. 2002). Untuk model kajian ini, tikus hepatokarsinogenesis telah diaruh dengan DEN (150mg/kg) diberikan sekali seminggu selama 2 minggu melalui suntikan intraperitoneal. Kemudian selepas seminggu daripada suntikan terakhir DEN, 2AAF diberi secara oral paksaan sebanyak empat kali seminggu selama tiga minggu. Kesemua tikus tersebut dikorbankan setelah 12 minggu selepas kajian dijalankan.

3.3 RAWATAN TIKUS

3.3.1 Alat Radas

- a) Picagari 1 cc/ml (Terumo ®)
- b) Jarum 26 G x 1/2" (Terumo ®)
- c) Jarum paksa oral

3.3.2 Reagen

- a) Air suling
 - b) Fraksi kaya tokotrienol daripada ExcelVite Sdn.Bhd
 - c) Larutan butil hidroksianisol (BHA)
- i. Penyediaan larutan butil hidrosianol (BHA)

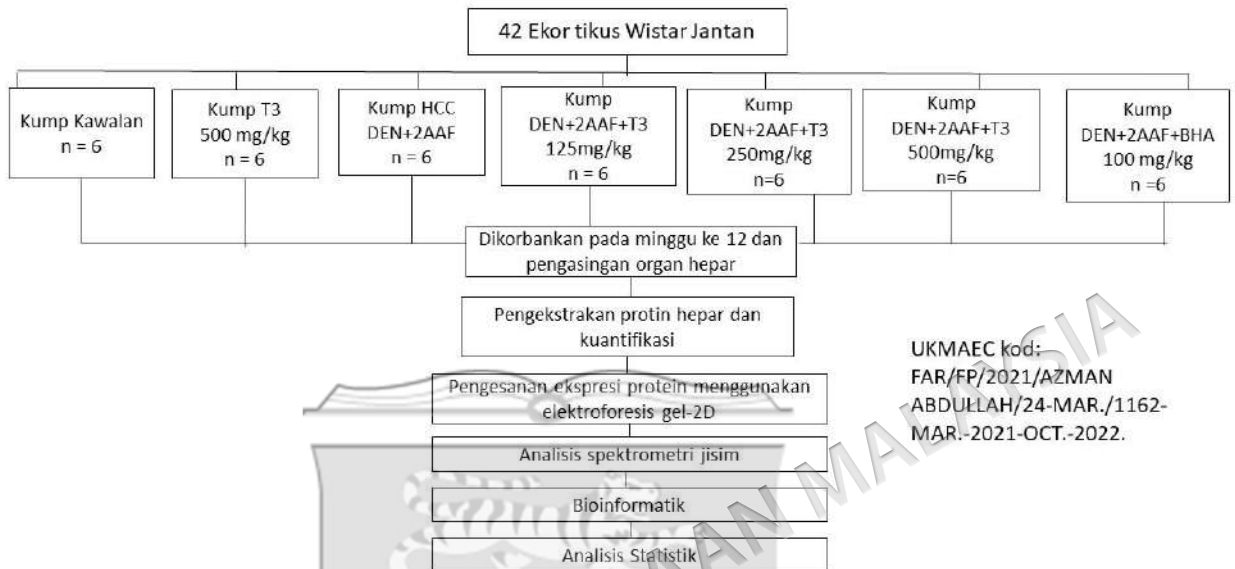
6 g BHA telah ditimbang dan dilarutkan kedalam 100 ml minyak jagung.

3.4 PROTOKOL RAWATAN HAIWAN

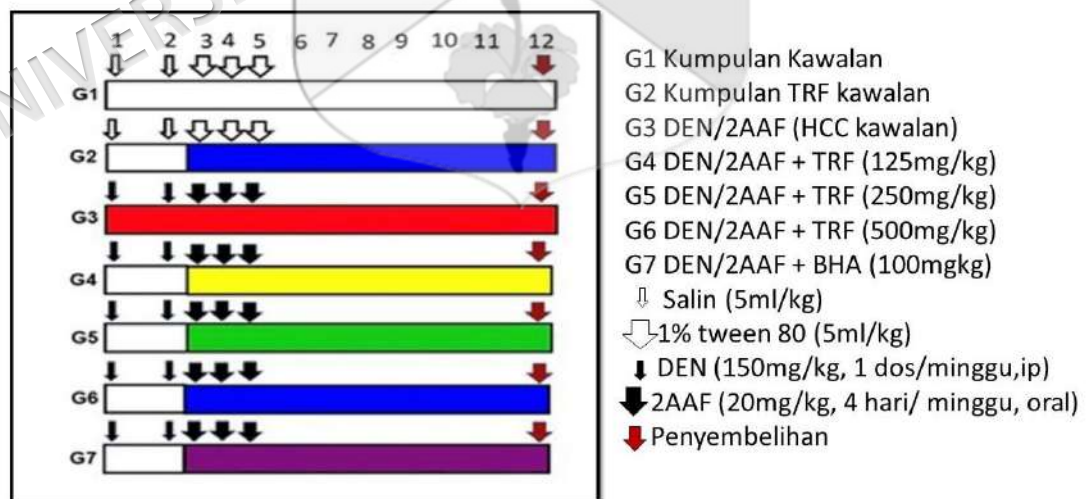
Kajian dimulakan selepas tempoh penyesuaian selama seminggu bagi kesemua tikus tersebut selesai. Tikus-tikus tersebut dibahagikan kepada 7 kumpulan dan setiap kumpulan terdiri daripada 6 ekor tikus. Reka bentuk eksperimen ditunjukkan dalam rajah 3.2. Tikus-tikus tersebut diberikan rawatan mengikut kumpulan. Kumpulan 1 (kawalan) terdiri daripada tikus yang diberikan air suling secara oral paksaan (5 ml/kg) sepanjang tempoh kajian. Kumpulan 2 (TRF kawalan) terdiri daripada tikus yang hanya diberikan TRF 500 mg/kg sahaja sepanjang tempoh rawatan dijalankan. Kumpulan 3 pula, adalah terdiri daripada tikus-tikus yang diaruh dengan DEN dan 2AAF seperti yang dinyatakan di bahagian 3.2.3. Manakala bagi kumpulan tikus rawatan (kumpulan 4 sehingga kumpulan 6), masing-masing diberikan TRF secara oral paksaan sebanyak 125 mg/kg (DEN +2AAF+ TRF dos rendah), 250 mg/kg (DEN+2AAF +TRF dos sederhana) dan 500 mg/kg (DEN+2AAF+TRF dos tinggi), TRF diberikan pada peringkat awal pemberian 2AAF sehingga minggu ke-12. Dos-dos TRF ditentukan berdasarkan kajian terdahulu, di mana TRF pada dos antara 200 hingga 1000 mg/kg telah dilaporkan mengaruhkan ekspresi beberapa gen dan protein fasa II yang bersifat hepatoprotektif (Abdullah et al. 2017). Bagi kumpulan positif kawalan iaitu kumpulan 7 (DEN+2AAF+BHA) turut disertakan di mana tikus tersebut diberikan butil hidroksianol (BHA) secara oral paksaan pada dos 100 mg/kg. Berdasarkan kajian terdahulu yang pernah dijalankan di makmal kami, pemberian BHA (100 mg/kg) kepada tikus telah terbukti mampu untuk mengaruh protein hepatoprotektif didalam hepar menggunakan assai enzim dan kaedah pemblotan western (Atia et al. 2018).

Perencatan perkembangan tumor dianggap sebagai strategi kemoprevensi yang lebih berkesan dalam kanser berbanding perencatan pada peringkat permulaan. Hal ini kerana peringkat permulaan merupakan proses yang singkat dan tidak boleh diterbalikkan, sekaligus memberikan peluang intervensi yang lebih baik. Oleh itu, hepatokarsinogenesis diaruhkan seperti yang diperincikan di bahagian 3.2.3. Tikus kawalan turut diberi air suling sebagai pengganti rawatan dengan jumlah isipadu yang sama. Pada minggu ke-12 kesemua tikus dibius dengan menggunakan ketamil dan xylazil. Persampelan darah diambil melalui kaedah tebuk kardium dan haiwan tersebut dikorbankan dengan dislokasi servikal selepas memberikan ubat bius dengan

dos yang berlebihan. Semua prosedur eksperimen ini telah mendapat kelulusan etika daripada Universiti Kebangsaan Malaysia Animal Ethics Committee (UKMAEC).



Rajah 3.1 Reka bentuk kajian



Rajah 3.2 Skematik reka bentuk eksperimen untuk pengaruh rawatan kanser hepar secara in vivo

3.5 PERSAMPELAN DARAH DAN ORGAN

3.5.1 Alat Radas

- 1) Gunting
- 2) Forsep
- 3) Skapel
- 4) Jarum 26 G x 1/2" (Terumo ®)
- 5) Picagari 1 cc/ml (Terumo ®)
- 6) Pad kertas pasca pembedahan
- 7) Tiub darah (BD Vacutainer, USA)
- 8) Tiub mikro
- 9) Mesin pengempar (Heraeus-Labofuge-400, Jerman)
- 10) Pengacau magnetik (LMS-100, Daihan LabTech Co., Korea)

3.5.2 Reagen

- A. Ketamil (100mg/ml) (Troy Laboratories, Australia)
- B. Xylazil (20mg/ml) (Troy Laboratories, Australia)
- C. Larutan 10% Formalin
- D. Larutan 70% alkohol
- E. NaCl 0.9%
- F.

3.5.3 Persampelan Darah

- i. Penyediaan larutan anestetik

Anestetik disediakan dengan mencampurkan Ketamil berkepekatan 100 mg/ml bersama Xylazil berkepekatan 20mg/ml dengan nisbah 1:1.

- ii. Penyediaan larutan alkohol 70%

Sebanyak 700 ml alkohol tulen dicampurkan bersama 300 ml air suling bagi menghasilkan 1 L alkohol 70%

Semua tikus kajian diberi suntikan dengan anestetik secara intraperitoneum setelah kawasan suntikan disapu alkohol 70%. Setelah tikus pengan, persampelan darah terus dilakukan dengan menggunakan kaedah tebuk kardium. Darah dikumpulkan dalam tiub darah bagi ujian biokimia. Sampel darah kemudiannya diemparkan pada kelajuan 3000 rpm selama 10 minit pada suhu bilik untuk memisahkan serum daripada sel darah padat.

Serum darah seterusnya di pindahkan ke dalam tiub mikro yang berlabel dan disimpan pada suhu -70°C sehingga ujian biokimia dijalankan kelak. Serum ini digunakan dalam ujian biokimia untuk mengukur aras serum alanina aminotransferase (ALT) dan ujian fungsi hepar. Persampelan darah ini hanya dilakukan pada minggu ke-12.

3.5.4 Persampelan Organ Hepar

- i. Penyediaan 1 liter larutan NaCl 0.9%

Sebanyak 9g NaCl dicampurkan ke dalam 1 L air suling. Kemudian, pengacau magnetik digunakan bagi melarutkan campuran tersebut.

- ii. Penyediaan 1 liter formalin 10%

Sebanyak 100 ml larutan formaldehid dicampurkan bersama 900 ml air suling bagi menghasilkan larutan formalin 10%. Kemudian, pengacau magnetik digunakan bagi melarutkan campuran tersebut.

Setelah persampelan darah selesai, tikus yang masih pengan setelah dibius kemudiannya dibunuh dengan menggunakan kaedah dislokasi servikal dan organ hepar diambil. Organ hepar dikeluarkan daripada tikus dan dibilas dengan larutan NaCl 0.9% sejuk untuk membersihkan sisa darah. Seterusnya, hepar dikeringkan di atas tisu dan ditimbang. Lobus terbesar hepar direndam ke dalam larutan formalin 10% untuk analisa histologi melalui pemerhatian mikroskop cahaya. Lobus hepar yang selebihnya dipotong kepada kepingan kecil dan ditimbang mengikut ujian parameter yang ditetapkan untuk dilaksanakan. Kepingan kecil hepar tersebut disimpan dalam kerajang aluminium dan disimpan pada suhu -80°C .

3.6 ANALISIS HISTOLOGI HEPAR

3.6.1 Pemrosesan Tisu Hepar

a. Alat Radas

- i) Kaset
- ii) Ketuhar 60°C (Memmert, Jerman)

b. Reagen

- i. Etanol tulen (Sigma, USA)
- ii. Formaldehid (JT Barrer Inc., USA)
- iii. Toluena (Merck, Jerman)
- iv. Lilin parafin (Leica Biosystem, Jerman)
- v. Air suling

Hepar yang telah direndam di dalam larutan formalin 10% dikeluarkan dan dipotong kecil dianggarkan 10 mm panjang dan ketebalan 5mm. Larutan formalin 10% digunakan di dalam proses histologi bertujuan sebagai pengawet dalam mengekalkan struktur tisu sebelum ujian histologi dijalankan. Pemotongan tisu hepar seperti di dalam rajah 3.3.



Rajah 3.3 Pemetongan tisu hepar

c. Penyediaan Reagen

- i) 200 ml larutan formalin 10%

Sebanyak 20 ml formaldehid dicampurkan bersama 180ml air suling bagi menghasilkan 200 ml larutan formalin 10%.

- ii) 200 ml larutan alkohol 50%

Sebanyak 100 ml larutan etanol tulen dicampurkan bersama 100 ml air suling untuk menghasilkan 200 ml 50% larutan alkohol.

- iii) 200 ml larutan alkohol 70%

Sebanyak 170 ml larutan etanol tulen dicampurkan bersama 30 ml air suling untuk menghasilkan larutan alkohol 70%.

iv) 200 ml larutan alkohol 80%

Sebanyak 160 ml larutan etanol tulen dicampurkan bersama 40 ml air suling bagi menghasilkan larutan alkohol 80%.

v) Larutan alkohol 90%

Sebanyak 180 ml larutan etanol tulen dicampurkan bersama 20 ml air suling bagi menghasilkan larutan alkohol 90%.

Beberapa proses seperti penetapan, penyahhidratan, pencerahan dan pembersihan terlibat di dalam proses pemprosesan tisu hepar. Pemprosesan tisu hepar ini melibatkan proses rendaman tisu di dalam larutan formalin 10%, beberapa siri kepekatan alkohol, toluene dan lilin parafin. Proses penetapan tisu hepar melibatkan rendaman tisu hepar di dalam larutan formalin 10% selama dua hari.

Proses penyahhidratan pula dilakukan dengan merendamkan tisu hepar ke dalam siri kepekatan alkohol menaik (50%, 70%, 80% dan 90%) selama 1 jam bagi setiap satu tukaran. Kemudian, tisu hepar tersebut direndam di dalam larutan alkohol 100% sebanyak dua kali selama 1 jam bagi setiap tukaran. Seterusnya proses pencerahan dengan merendam tisu hepar ke dalam larutan campuran toluene:alkohol (v/v) (1:1) selama 15 minit dan diikuti dengan rendaman didalam larutan toluene tulen selama 1 jam 30 minit.

Seterusnya, proses pembersihan dilakukan dengan merendam tisu hepar ke dalam lilin paraffin cair sebanyak tiga kali. Bagi rendaman pertama, tisu hepar direndam selama 16 jam. Manakala bagi rendaman kedua dan ketiga tisu hepar direndam selama dua jam bagi setiap tukaran. Proses ini dijalankan di dalam ketuhar 60 °C bagi mengekalkan kondisi lilin supaya berada dalam keadaan cair. Jadual 3.1 menunjukkan langkah-langkah pemprosesan tisu hepar tersebut

Jadual 3.1 Langkah pemprosesan tisu

Proses	Tisu hepar	Tempoh masa
Penetapan	Formalin 10%	2 hari
	↓	
Penyahidratan	Alkohol 50%	1 jam
	Alkohol 70%	1 jam
	Alkohol 80%	1 jam
	Alkohol 90%	1 jam
	Alkohol 100%	1 jam
Pencerahan	Alkohol 100%	1 jam
	Toluena:Alkohol	15 minit
	Toluena tulen	1 jam 30 minit
Pembenaman	Lilin parafin I	16 jam
	Lilin parafin II	2 jam
	Lilin parafin III	jam

3.6.2 Pembenaman Tisu Hepar

a. Alat Radas

- i. Mesin pembenam tisu (Leica EG1160, Leica Microsystem GmbH, Wetzler, Jerman)
- ii. Acuan pembenam (Leica, Jerman)
- iii. Cincin blok parafin (Leica, Jerman)
- iv. Forsep

b. Bahan

i. Lilin parafin (Leica Biosystem, Jerman)

Proses pembenaman dijalankan dengan menggunakan mesin pembenaman tisu. Cincin blok parafin dilabel mengikut kumpulan yang ditetapkan sebelum lilin cair dituang ke dalam acuan blok tersebut. Setelah itu, tisu dibenamkan ke dalam acuan dan cincin blok mengikut satah yang dikehendaki. Acuan pembenaman dipindahkan ke bahagian mesin yang lebih sejuk bagi proses pembekuan lilin. Setelah lilin membeku, cincin blok ditanggalkan daripada acuan dan blok disejukkan semula sebelum dipotong.

3.6.3 Penyediaan Slaid Tisu Hepar

a. Alat Radas

- i) Mikrotom (Leica RM2235 Leica Microsystem Inc., USA)
- ii) Pisau mikrotom (Leica RM2235 Leica Microsystem Inc., USA)
- iii) Slaid mikroskop (Thermo scientific, USA)
- iv) Mandian air (HI 1210 Leica, Jerman)
- v) Plat pemanas slaid (XH-2001 Leica, Jerman)

b. Bahan

i) Air suling

Blok yang telah disejukkan ditempatkan pada mesin mikrotom bagi proses penyediaan slaid. Penghirisan blok parafin dilakukan pada ketebalan 5 μm untuk menghasilkan hirisan yang nipis. Hirisan-hirisan ini kemudian dipindahkan ke atas permukaan mandian air yang bersuhu 40 °C. Hirisan diambil dan dilekatkan ke atas slaid yang berlabel serta dipindahkan ke atas plat pemanas pada suhu 60 °C selama 4 jam.

3.6.4 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin**a. Alat Radas**

- i. Sisip kaca 18mm x 18mm (Matsunami, Jepun)
- ii. Mikroskop Analisa pengimejan (Nikon Eclipse 80i, Jepun)

b. Reagen

- i. Xilena (Merck KGaA, Jerman)
- ii. Etanol tulen (Sigma, USA)
- iii. Hematoksilin (Merck KGaA, Jerman)
- iv. Eosin (Leica Microsystem Inc., USA)
- v. Larutan Pembezaan (Merck, Jerman)
- vi. Media pelekat DPX (Sigma, USA)
- vii. Larutan penonjolan biru

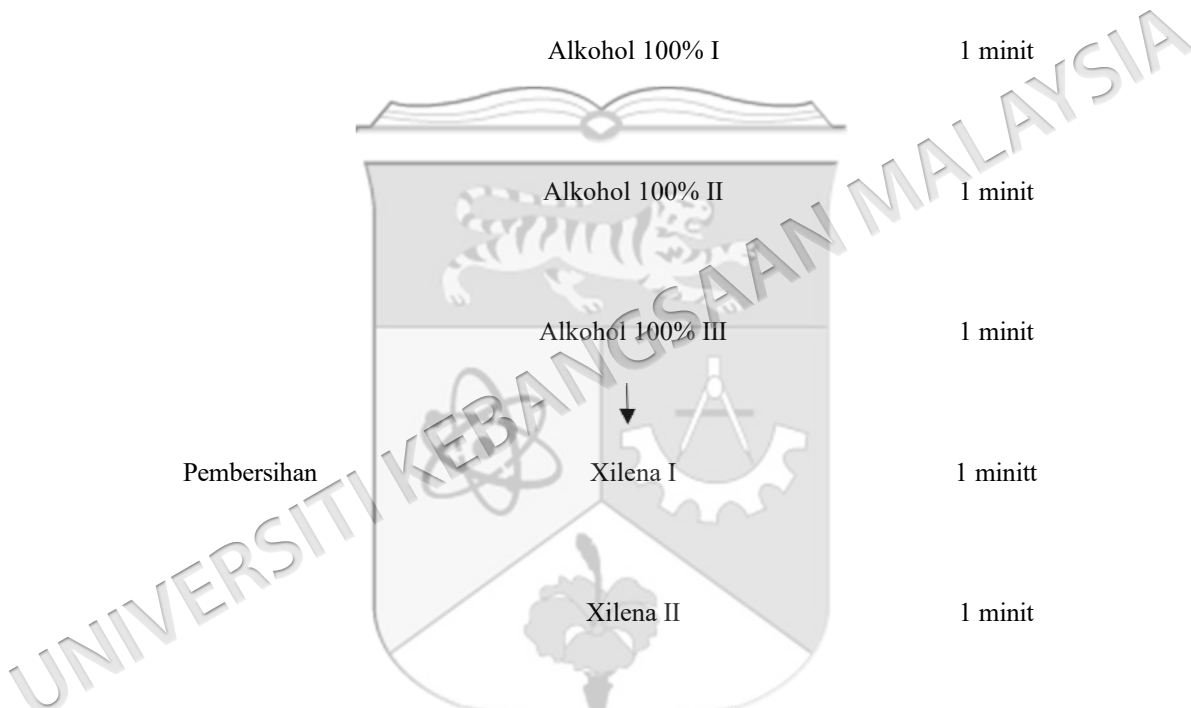
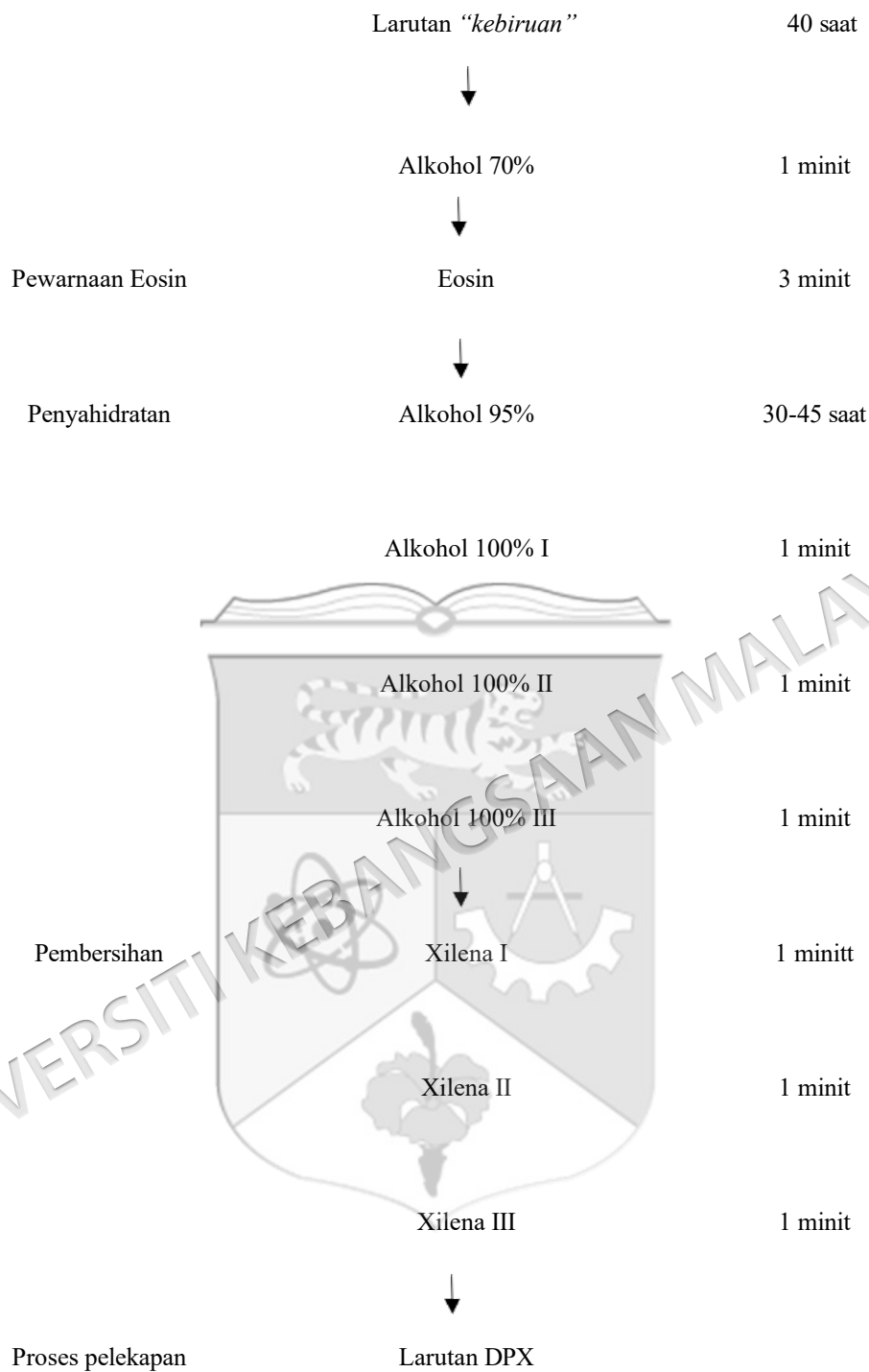
Proses pewarnaan bermula dengan teknik penyah parafin, slaid tisu direndam ke dalam larutan xilena 100% sebanyak dua kali pertukaran selama lima minit setiap pertukaran. Kemudian proses penghidratan dengan meletakkan slaid tersebut ke dalam etanol tulen selama satu minit sebanyak tiga kali sebelum di bilas dengan mencelupkan ke dalam air paip yang mengalir selama satu minit. Seterusnya, slaid tisu tersebut direndam ke dalam larutan hematoksilin selama tujuh minit. Setelah tamat tempoh, slaid tisu tersebut dibilas dengan menggunakan air paip yang mengalir selama satu minit.

Kemudian, slaid tersebut dicelupkan sebanyak dua atau tiga kali kedalam larutan pembezaan selama satu saat untuk setiap celupan dan diakhiri dengan bilasan air paip yang mengalir selama satu minit. Seterusnya, slaid tersebut direndam ke dalam larutan bluing selama 30 - 40 saat dan diikuti dengan bilasan dengan air paip yang mengalir selama satu minit. Selepas itu, slaid tisu kemudiannya dicelupkan ke dalam larutan 70% alkohol selama satu minit. Setelah tamat tempoh, slaid tisu direndamkan dalam larutan pewarna Eosin selama tiga minit dan slaid tersebut direndam pula dalam larutan 95% alkohol selama 45 saat. Kemudian, bagi proses penyahhidratan slaid tisu tersebut direndam ke dalam alkohol tulen sebanyak tiga kali selama satu minit untuk setiap rendaman. Seterusnya, proses pembersihan dilakukan dengan meletakkan slaid tisu ke dalam larutan xilena 100% sebanyak tiga kali pertukaran selama 1 minit bagi setiap tukaran. Akhir sekali, proses pelekapan dilakukan dengan larutan DPX. Gelembung udara dipastikan supaya tidak terperangkap di bawah penutup slaid. Slaid tisu dibiarkan pada suhu bilik semalaman.

Pemeriksaan mikroskopi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX31 (Olympus Corporation, Jepun) pada kanta aras pembesaran 10X dan kanta objektif pada aras pembesaran 4X, 10X, 20X, dan 40X. Jadual 3.2 di bawah menunjukkan carta alir kaedah pewarnaan H&E.

Jadual 3.2 Proses pewarnaan hematoksisilin dan eosin (H&E)

Teknik	Slaid tisu	Jangka masa
Penyahilinan	Xilena I	5 minit
	Xilena II	5 minit
Penghidratan	Alkohol 100% I	1 minit
	Alkohol 100% II	1minit
	Alkohol 100% III	1 minit
Pewarnaan hematoksilin	Air paip mengalir	1minit
	Hematoksilin	7 minit
	Air paip mengalir	1 minit
Pembezaan	Larutan pembezaan	1 saat
	Air paip mengalir	1 minit



3.7 PENGEKSTRAKAN PROTEIN

a. Alat Radas

- i) Tiub pengempar mikro
- ii) Tabung uji
- iii) Alat penimbang (Shimadzu, Jepun)
- iv) Penghomogen
- v) Pengempar mikro kawalan suhu
- vi) Pengaduk tiub berputar

b. Reagen

1. Kit komersil pengekstrakan protein , Mem-PERTMPlus Membrane Protein Extraction Kits (Thermo Scientific, USA).
2. Larutan basuhan sel (Thermo Scientific)
3. Penimbal pelarut (Thermo Scientific)
4. Penimbal kebolehtelapan (*Permeabilization buffer*) (Thermo Scientific)
5. Kit BCA protein Kit (Thermo Scientific, USA).

Sebanyak 40 mg tisu hepar ditimbang dan dicampurkan bersama 2000 ul larutan basuhan sel sebelum dicampurkan menggunakan vorteks. Kemudian larutan basuhan sel tersebut dibuang terlebih dahulu sebelum tisu hepar dihancurkan. Sebanyak 1000 ul larutan penimbal kebolehtelapan ditambah dan tisu dihomogenat sehingga menghasilkan mendakan. Seterusnya, 1000 ul larutan penimbal kebolehtelapan ditambah ke dalam tisu homogenat dan kemudian dipindahkan ke dalam tiub pengempar mikro untuk dieram selama 10 minit pada suhu 4°C diatas pengaduk tiub berputar untuk menggalakkan pelepasan protein bagi tujuan pengekstrakan. Seterusnya, sampel tersebut diemparkan pada 16000 RCF selama 15 minit pada suhu 4°C. Akhir sekali, larutan di bahagian atas tisu homogenat yang mengandungi fraksi sitosolik dipindahkan ke dalam tiub yang baharu.

3.7.1 Penentuan Kepekatan Protein Menggunakan Asai Asid Bichonconinik

Penentuan kepekatan menggunakan kaedah asai asid bichonconinik (BCA) dilakukan mengikut protokol pengilang. 25ul standard dan sampel dipipet ke dalam plat mikrotiter 96 telaga. 200 ul reagen kerja (WR) dipipet ke dalam setiap telaga. WR disediakan dengan mencampur 50 bahagian reagen A BCA dan satu bahagian reagen B BCA. Plat kemudian diletakkan diatas penggongcang plat selama 30 saat. Plat ditutup dan diinkubasi selama 30 minit pada suhu 37°C. Seterusnya, plat dibiarkan sejuk pada suhu bilik. Daya serapan diukur pada 562 nm.

3.8 PENENTUAN EKSPRESI PROTEIN MENGGUNAKAN KAEDAH PROTEOMIK

Kaedah proteomik yang digunakan dalam kajian ini adalah kombinasi dua teknik utama iaitu elektroforesis gel 2-dimensi (2DE) dan spektrometer jisim. 2DE adalah teknik pemisahan protein secara dua dimensi yang memisahkan campuran protein-protein mengikut titik isoelektrik secara mendatar pada peringkat pertama dan kemudiannya pada peringkat kedua memisahkan protein-protein mengikut berat molekul secara menegak. Pemisahan peringkat pertama adalah berdasarkan nilai titik isoelektrik setiap protein. Peringkat kedua pula berdasarkan berat molekul sesuatu protein.

3.8.1 Penentuan Ekspresi Protein Menggunakan Teknik 2DE

3.8.1.2 Rehidrasi Strip

Strip direhidrasi sebelum elektroforesis satu dimensi. Proses ini bertujuan untuk mengembangkan gel pada strip bagi memaksimumkan kapasiti strip untuk menampung kesemua protein di dalam sampel. Komponen-komponen di dalam larutan rehidrasi yang terdiri daripada agen denaturasi, detergen, agen penurun dan agen pelarut. Komponen-komponen tersebut membantu meningkatkan keterlarutan dan pemisahan protein-protein di dalam sampel. Larutan penimbal rehidrasi urea perlu disediakan terlebih dahulu seperti yang dijelaskan dalam Lampiran A. Proses rehidrasi dilakukan menggunakan dulang pengembangan semula, strip, larutan rehidrasi urea dan cecair pelitup strip. Strip yang digunakan ialah strip berkecerunan pegun pH 3-10. Julat pH 3-

10 digunakan untuk melihat taburan protein-protein secara umum dan menyeluruh. Dulang pengembangan semula terlebih dahulu dipastikan dalam keadaan bersih dan kering. Sebanyak 450 ml larutan rehidrasi urea yang dicampur dengan sampel protein (500 μg) dipipet masuk ke dalam beberapa lajur mengikut bilangan strip yang hendak direhidrasi dalam tray. Strip dimasukkan ke dalam lajur tersebut dengan permukaan gel dipastikan menghala ke permukaan dulang. Gelembung udara dipastikan tidak terperangkap di bawah strip yang telah direndam di dalam larutan rehidrasi. Cecair pelutup strip kemudiannya dimasukkan ke dalam lajur tersebut supaya dapat melapisi bahagian atas strip. Cecair pelutup strip berfungsi untuk mengelakkan pengewapan urea yang boleh mengakibatkan lapisan gel retak. Dulang pengembangan semula ditutup dan strip dibiarkan rehidrat semalaman dalam suhu bilik.

3.8.1.3 Elektroforesis Satu Dimensi

Peringkat pertama teknik elektroforesis dua dimensi dimulakan dengan elektroforesis satu dimensi. Proses elektroforesis satu dimensi dimulakan dengan meletakkan strip yang telah direhidrasi ke dalam pemegang strip di mana permukaan gel dipastikan menghala ke atas dan hujung positif/negatif strip diletakkan pada hujung positif/negatif pemegang strip. Kertas elektrod yang dilembapkan dengan air ultratulen MiliQ diletakkan di kedua-dua hujung positif (anod) dan hujung negatif (katod) pada pemegang strip. Elektrod pula diletakkan di atas kertas elektrod tadi. Pemegang strip diletakkan di atas pentas sistem pemfokus BioRad Protean 112 IEF Cell pada kedudukan yang telah ditetapkan. Cecair pelutup strip dimasukkan ke dalam pemegang strip dan dipastikan melapisi seluruh permukaan pemegang strip dengan rata. Setelah itu, pemegang strip ditutup dengan penutup plastik khas dan penutup Biorad juga turut ditutup. Protokol bagi voltan untuk elektroforesis ditetapkan mengikut protokol kajian oleh Gitau et. al. (2011) seperti Jadual 3.3. Elektroforesis mengambil masa lebih kurang semalaman untuk selesai. Pemegang strip yang mengandungi strip disimpan di dalam peti sejuk beku bersuhu $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Jadual 3.3 Protokol bagi voltan untuk elektroforesis satu dimensi

Langkah	Kaedah Voltan	Voltan (V)	Masa (Jam)
1	Tetap	150	1
2	Gradian	300	1
3	Gradian	1500	1
4	Tetap	8000	18

3.8.1.4 Penyediaan Gel Poliakrilamida

Gel poliakrilamida bertindak sebagai medium untuk elektroforesis dua dimensi perlu disediakan terlebih dahulu sebelum elektroforesis boleh dijalankan kerana gel yang besar mengambil masa yang lebih untuk mengeras. Larutan akrilamida/bis 30%T, larutan 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), larutan pelarut gel berkepekatan 4x, larutan SDS 10 %, larutan ammonium persulfat (APS) 10 % dan tetrametiletilediamina (TEMED) serta air ultratulen mili-Q adalah diperlukan untuk membentuk gel. Larutan gel berkepekatan 4x dan larutan SDS 10 % disediakan dengan banyak sebagai stok dan boleh disimpan dalam 4°C untuk tempoh masa yang panjang. Manakala larutan APS 10 % memerlukan penyediaan segar seurus sebelum proses penyediaan gel dilakukan. Gel akrilamid yang digunakan mempunyai ukuran 24 cm panjang dan 1.0 mm tebal. Gel disediakan menggunakan alat penuangan gel, di mana empat gel boleh dibentuk dalam satu masa. Isipadu larutan-larutan tersebut yang diperlukan untuk membuat satu gel ditunjukkan di Jadual 3.4. Larutan yang telah dikacau sebatu dituang ke dalam alat penuangan gel secara perlahan hingga mencapai takat yang betul. Sebaik sahaja larutan gel habis dituang, air ultratulen mili-Q dimasukkan dengan segera bagi melapisi bahagian atas gel untuk mengelakkan pembentukan gelembung udara pada larutan gel dan menjadikan permukaan atas gel rata. Gel dibiarkan untuk proses polimerisasi dalam tempoh dua jam. Gel yang telah mengeras disimpan di dalam peti sejuk bersuhu 4 °C dengan untuk penyimpanan maksimum selama seminggu.

Jadual 3.4 Isipadu larutan diperlukan untuk menyediakan 2D gel

Larutan	Isipadu
Akrilamida/bis 30%	4
1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)	2.5
10%(w/v) SDS	0.1
10% (w/v) APS	0.05
TEMED	0.005
Air mili-Q	10

3.8.1.5 Proses Penyeimbangan Strip Gel

Sebanyak 30 ml larutan penimbal penyeimbangan disediakan terlebih dahulu (Rujuk cara penyediaan di Lampiran A) dan dibahagikan kepada dua bahagian. Setiap bahagian boleh memuatkan 15 ml bagi setiap bahagian. Sebanyak 0.1 g ditiotreitrol (DTT) dilarutkan ke dalam satu bahagian larutan penyeimbangan manakala 0.25 g asid indol-3-asetik (IAA) dilarutkan ke dalam satu bahagian lagi. Larutan penyeimbangan yang mengandungi DTT dimasukkan ke dalam tiub yang mengandungi strip. Strip kemudiannya diseimbangkan di atas penggongcang selama 15 minit. Kemudian proses yang sama diulang dengan larutan penyeimbang yang mengandungi IAA.

3.8.1.6 Elektroforesis dua dimensi

Proses elektroforesis dimensi kedua adalah peringkat kedua teknik elektroforesis dua dimensi. Strip daripada proses elektroforesis satu dimensi yang telah diseimbangkan diletakkan di atas permukaan gel akrilamid dengan perlahan dan ditekan bagi menghalang pembentukan gelembung udara dan memastikan tiada ruang antara strip dan gel akrilamid. 10 μ L penanda protein dipipet ke atas turas yang kecil dan kertas turas tersebut diletakkan di atas gel, pada hujung strip. Larutan gel agaros (cara penyediaan di Lampiran A) yang telah dicairkan terlebih dahulu dimasukkan sehingga melapisi seluruh strip dan kertas turas untuk setiap gel. Gel agaros ini bertujuan untuk melekatkan strip dan gel akrilamid disamping memberikan petunjuk semasa elektroforesis. Tangki elektroforesis terlebih dahulu diisi dengan 4.5 L penimbal

elektroforesis Laemmli berkepekatan 1x. Kaset gel dimasukkan ke dalam tangki. Bahagian atas tangki dipasang dan sebanyak 800 ml penimbal elektroforesis laemmli berkepekatan 1x dituang ke dalamnya. Aras bagi penimbal bahagian atas dan bahagian bawah dipastikan sama. Setelah selesai, penutup tangki ditutup dan wayar pada penutup tangki disambungkan kepada bekalan tenaga. Voltan, arus dan kuasa untuk elektroforesis ditetapkan seperti Jadual 3.5. Apabila warna penunjuk telah berada lebih kurang 1 cm dari paras bawah gel, elektroforesis dihentikan. Bahagian atas tangki bersama-sama kaset gel dikeluarkan daripada tangki elektroforesis. Gel dikeluarkan daripada plat kaca dengan berhati-hati dan dipindahkan ke dalam larutan fiksasi sebelum proses pewarnaan dengan pewarna Biru Terang Coomassie R-250.

Jadual 3.5 Protokol bekalan tenaga elektrik bagi elektroforesis dua dimensi

Langkah	Voltan (V)	Arus/gel (Ma)	Kuasa /gel (W)	Masa (jam)
1	80	10	1	1
2	500	40	13	4.3-6.0

3.8.1.7 Pewarnaan Biru Terang Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250)

Gel poliakrilamida yang mengandungi protein-protein yang telah dipisahkan oleh kedua-dua proses elektroforesis satu dan dua dimensi diwarnakan bagi menjelaskan bintik-bintik protein. Proses pewarnaan memudahkan analisis gel oleh perisian khas di peringkat seterusnya. Larutan pewarnaan Biru Terang Coomassie R-250 terdiri daripada larutan fiksasi, larutan kerja pewarna, dan larutan nyahwarna. Kesemua larutan disediakan terlebih dahulu dan disimpan dalam suhu bilik.

Gel digoncang perlahan di atas pengaduk tiub berputar sepanjang proses pewarnaan supaya pewarnaan sekata pada keseluruhan gel. Proses pewarnaan dimulakan dengan memasukkan gel kedalam bekas yang mengandungi larutan fiksasi selama 30 minit. Larutan fiksasi boleh disimpan dan digunakan semula. Larutan kerja pewarna ditambah ke dalam bekas untuk proses pewarnaan dan dibiarkan semalaman. Seterusnya, larutan pewarna disimpan dan digantikan dengan larutan penyahwarna. Proses penyahwarna mengambil masa beberapa jam sehingga bintik boleh dilihat dengan jelas. Larutan penyahwarna juga perlu digantikan setiap 30 minit atau bila larutan sudah kelihatan gelap. Selesai semua proses pewarnaan, gel disimpan dalam

bekas yang mengandungi air milli-Q. Gel boleh disimpan lama dalam 4°C. Untuk proses seterusnya, gel dikeluarkan dan diletakkan di atas pengimbas Densitometer Pengimejan (BioRad, Hertfordshire, UK). Imej yang terhasil disimpan dalam format TIFF untuk proses analisis. Gel dimasukkan semula ke dalam air milli-Q supaya ia boleh disimpan untuk jangka masa panjang dalam suhu 4°C.

3.8.1.8 Analisis Bintik-Bintik Protein

Bintik-bintik protein dianalisis menggunakan perisian Progenesis SameSpot versi 6.0 (GE Healthcare, UK). Langkah-langkah yang mesti dituruti dalam menganalisis bintik-bintik protein termasuklah menyunting, memadankan titik protein dari semua gel di dalam kumpulan yang sama dan memadankan titik-titik protein antara kumpulan yang berlainan. Gel disunting dengan terlebih dahulu membezakan bintik protein sebenar dengan bintik bukan protein dan latar belakang gel. Bintik bukan protein dikenalpasti melalui gambarajah tiga dimensi di mana bintik protein dilihat membentuk hanya satu puncak manakala titik bukan protein membentuk lebih daripada satu puncak. Gambar gel juga hendaklah mempunyai bilangan bintik protein yang hampir sama untuk kesemua gel. Selain itu, satu nilai intensiti ditetapkan supaya hanya bintik yang melebihi nilai intensiti itu sahaja akan dikesan.

Nilai intensiti ditetapkan berdasarkan kepada nilai intensiti bintik protein dalam kumpulan kontrol. Setelah kesemua gel telah disunting, padanan dilakukan dahulu antara setiap kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan positif terhadap bintik dalam kumpulan kontrol untuk melihat jumlah bintik yang diekspresi dalam setiap kumpulan secara berbeza berbanding kumpulan kontrol. Seterusnya, kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan positif digabungkan dan dipadankan terhadap kumpulan kawalan untuk mengenalpasti sebarang perbezaan ekspresi di antara bintik-bintik. Nilai perbezaan ditetapkan melebihi dua kali ganda dan hanya bintik yang berbeza lebih dari dua kali ganda akan diambil kira sebagai protein yang mempunyai perbezaan ekspresi. Bintik protein yang diekspresi secara berbeza dua kali ganda dilabelkan untuk

dikenalpasti menggunakan spektrometer jisim. Untuk proses ini, hanya bintik yang terkandung di dalam kesemua gel saja yang dipilih supaya variasi bintik protein antara individu dapat dielakkan. Setiap padanan bintik protein disamak satu persatu bagi memastikan kesilapan padanan tidak berlaku. Bintik protein dipastikan dipadankan dengan bintik yang mempunyai kedudukan berat molekul dan titik isoelektrik (pI) yang hampir sama. Setiap padanan protein disamak satu persatu. Perisian ini turut menjalankan analisis statistik perbandingan intensiti titik secara automatik.

3.8.2 Pengenalpastian Protein dengan Spektrometer Jisim MALDI TOF (MS)

3.8.2.1 Isolasi bintik protein daripada gel 2DE untuk identifikasi menggunakan MALDI TOF

Bintik-bintik protein yang diekspresi secara berbeza akan diasingkan daripada gel 2D terlebih dahulu untuk diproses sebelum dikenalpasti dengan menggunakan spektrometer jisim (MS). Hujung tip mikropipet 200 μL dipotong mengikut anggaran saiz bintik dan ditekapkan di atas bintik yang dikehendaki, kemudian dimasukkan ke dalam tiub emparan mikro yang mengandungi 200 μL larutan penyimpanan. Larutan penyimpanan mengandungi metanol 10%, asid asetik 7%, dan air ultratulen MiliQ. Teknik ini hendaklah dilakukan dengan berhati-hati di dalam kabinet aliran laminar bagi mengelakkan kontaminasi keratin pada bintik. Setelah selesai, tiub berisi bintik protein disimpan pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$.

3.8.2.2 Pencernaan Protein Menggunakan Enzim Tripsin

Pewarnaan Biru Terang Coomassie R-250 secara umum sesuai dengan MS berbanding teknik perwarnaan yang lain. Gel yang mengandungi bintik protein dicuci terlebih dahulu dengan 200 μL air ultratulen MiliQ selama 10 minit dan diulang sebanyak dua kali. Seterusnya, gel dicuci dengan 150 μL larutan ammonium bikarbonat (ABC) (100 mM) selama 10 minit. Gel protein kemudiannya direndam di dalam 150 μL larutan asetonitril (ACN) (50%) dalam ABC (100 mM) di dalam tiub selama 10 minit dan diulang 2 kali. Setelah selesai, larutan ACN (50%) dibuang keluar dan digantikan dengan 150 μL larutan DTT (10 mM) yang disediakan secara segar. Gel dieram dalam tangki rendaman air pada suhu 60 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 minit. Kemudian, larutan DTT (10 mM) dibuang dan diganti dengan 150 μL larutan IAA (55 mM) yang disediakan secara segar

dan diletakkan di tempat yang gelap selama 20 minit. Larutan IAA dibuang dan diganti dengan 150 μL larutan ACN (50 %) selama 20 minit dan diulang sebanyak 2 kali untuk mencuci gel protein. Seterusnya, larutan ACN (50 %) dibuang dan gel direndam pula di dalam 50 μL ACN (100 %) selama 15 minit. Gel protein kemudian dikeringkan di dalam pengempar vakum berkelajuan tinggi selama 20 minit atau sehingga gel protein betul-betul kering. Kemudian gel protein direndam sepenuhnya di dalam 25-35 μL tripsin (7ng/ μL). Tiub yang mengandungi gel protein seterusnya direndam di dalam tangki rendaman air bersuhu 30 °C untuk tempoh semalaman (maksimum 18 jam). Gel protein kemudian direndam dengan 25 μL ACN (50 %) selama 15 minit dan tiub digoncang dan diempar. Seterusnya, supernatan dipindahkan ke dalam tiub pengempar mikro yang baru. Sebanyak 25 μL ACN (100 %) pula dimasukkan ke dalam tiub yang mengandungi gel dan dibiarkan berendam untuk 15 minit. Setelah selesai, tiub digoncang, diempar, dan larutan ACN 100 % dipindahkan ke dalam tiub yang mengandungi ACN (50%). Tiub yang mengandungi campuran ACN dan protein diempar di dalam pengempar vakum berkelajuan tinggi selama 1 jam 30 minit atau sehingga semua larutan di dalamnya kering. Sampel yang telah kering boleh disimpan pada suhu -40 °C atau boleh terus dilakukan proses pemekatan dan penyahgaraman sampel.

3.8.2.3 Pemekatan dan Penyahgaraman Sampel Protein

Pemekatan dan penyahgaraman sampel protein dilakukan dengan menggunakan tip penuras ZipTip $\mu\text{-C18}$ bagi membersihkan dan memekatkan sampel untuk tujuan meningkatkan kualiti spektrum jisim yang dihasilkan MS. Sebelum itu, larutan-larutan seperti larutan 30% asetonitril dengan asid trifluoroasetik (TA30), larutan pelembapan, larutan penyeimbangan dan pencuci dan larutan elusi perlu disediakan secara segar terlebih dahulu. Mikropipet dilaraskan kepada isipadu 10 μL . Sebanyak 10 μL larutan asid triklorasetik 30% (TA30) dimasukkan ke dalam tiub yang mengandungi sampel. Seterusnya, sebanyak 10 μL dipipet masuk ke dalam tip untuk melembapkan hujung tip. Larutan tersebut kemudian dibuang dengan tidak melebihi unit penuras yang berada di dalam tip. Langkah ini diulang sebanyak lima kali. Kemudian, larutan penyeimbangan dipipet masuk dan keluar sebanyak tiga kali dengan isipadu yang sama. Sampel yang bercampur dengan larutan TA30 dipipet masuk dan keluar sebanyak 10

kali dengan isipadu yang sama. Sampel tersebut kemudian dibuang dengan tidak melebihi unit penuras yang berada di dalam tip. Sebanyak 10 μL larutan penyeimbangan dipipet masuk ke dalam tip untuk mencuci hujung tip. Langkah ini diulang sebanyak tiga kali. Seterusnya, 5 μL larutan elusi dalam tiub pengempar mikro yang baru dipipet masuk dan keluar sebanyak 10 kali. Pada kali yang ke sepuluh, kesemua larutan elution dipipet keluar bersama-sama sampel yang berada pada unit penuras.

3.8.2.4 Analisis Spektrometer Jisim MALDI TOF

Analisis pengenalpastian protein ini dilakukan menggunakan spektrometer jisim Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF. Prosedur ini dijalankan oleh oleh saintis Institut Agro-Bioteknologi (ABI), NIBM, Serdang, Malaysia. Identifikasi protein adalah berdasarkan pengecaman cap jisim peptida. Setiap protein mempunyai jujukan dan jisim yang berbeza dikenali sebagai cap jisim unik. Pencarian pangkalan data untuk pengenalpastian protein dilakukan menggunakan sistem pencarian Mascot (<http://www.matrixscience.com>) di mana sumber pangkalan data adalah dari Swissprot. Identifikasi protein adalah berdasarkan perbandingan jisim peptida melalui eksperimen dengan jisim peptida teori yang terdapat di dalam pangkalan data. Sistem skor digunakan untuk menentukan protein di mana protein mempunyai jumlah peptida yang paling banyak akan dipilih. Protein yang mempunyai nilai skor lebih daripada 50 dan aras keyakinan lebih dari 95% dikenalpasti sebagai signifikan.

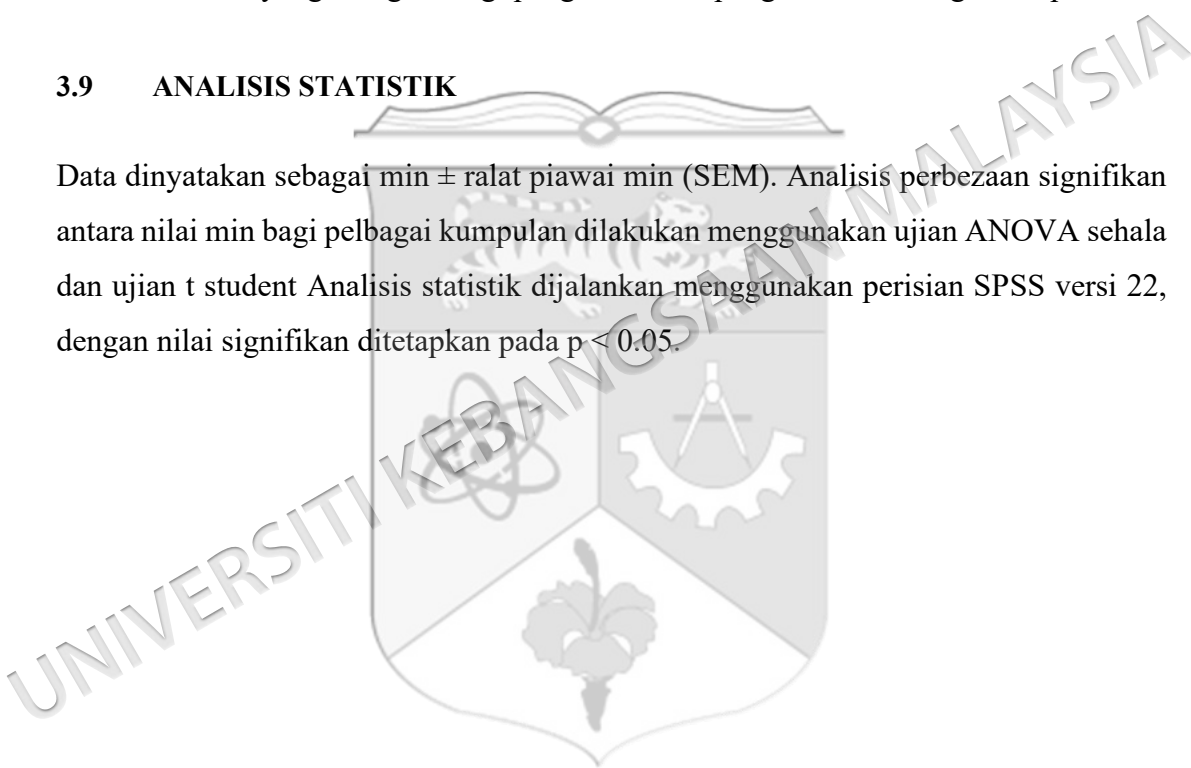
Parameter-parameter untuk analisis MS ditetapkan iaitu spesis *Mus musculus*, tripsin sebagai agen pencerna, modifikasi sistein melalui karbamidometilasi, modifikasi metionin melalui oksidasi dan toleransi jisim maksimum adalah 50 ppm. Sebanyak 10 kebarangkalian protein yang mempunyai persamaan dalam jujukan peptida akan terhasil untuk sesuatu sampel. Nilai pI dan berat molekul teori protein yang terhasil daripada data analisis MS dibandingkan dengan nilai pI dan berat molekul eksperimen spot protein tersebut yang terdapat pada gambar rujukan gel.

3.8.3 Bioinformatik dan Analisis Kefungsian

Klasifikasi fungsi dan analisis tapakjalan protein yang menunjukkan perbezaan yang signifikan telah dijalankan menggunakan pangkalan data STRING dan Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources v2024q2 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) melalui alat anotasi fungsi yang tersedia dalam talian. Perisian DAVID digunakan untuk memperoleh pemahaman yang lebih mendalam mengenai anotasi kefungsiian protein yang diekspres secara berbeza dalam kajian ini. Senarai *UNIPROT_ACCESSION ID* telah dimuat naik ke dalam DAVID, yang mengandungi pangkalan data pengetahuan biologi bersepadu.

3.9 ANALISIS STATISTIK

Data dinyatakan sebagai $\text{min} \pm \text{ralat piawai min (SEM)}$. Analisis perbezaan signifikan antara nilai min bagi pelbagai kumpulan dilakukan menggunakan ujian ANOVA sehalu dan ujian t student Analisis statistik dijalankan menggunakan perisian SPSS versi 22, dengan nilai signifikan ditetapkan pada $p < 0.05$.



BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 KAJIAN HISTOLOGI TISU HEPAR

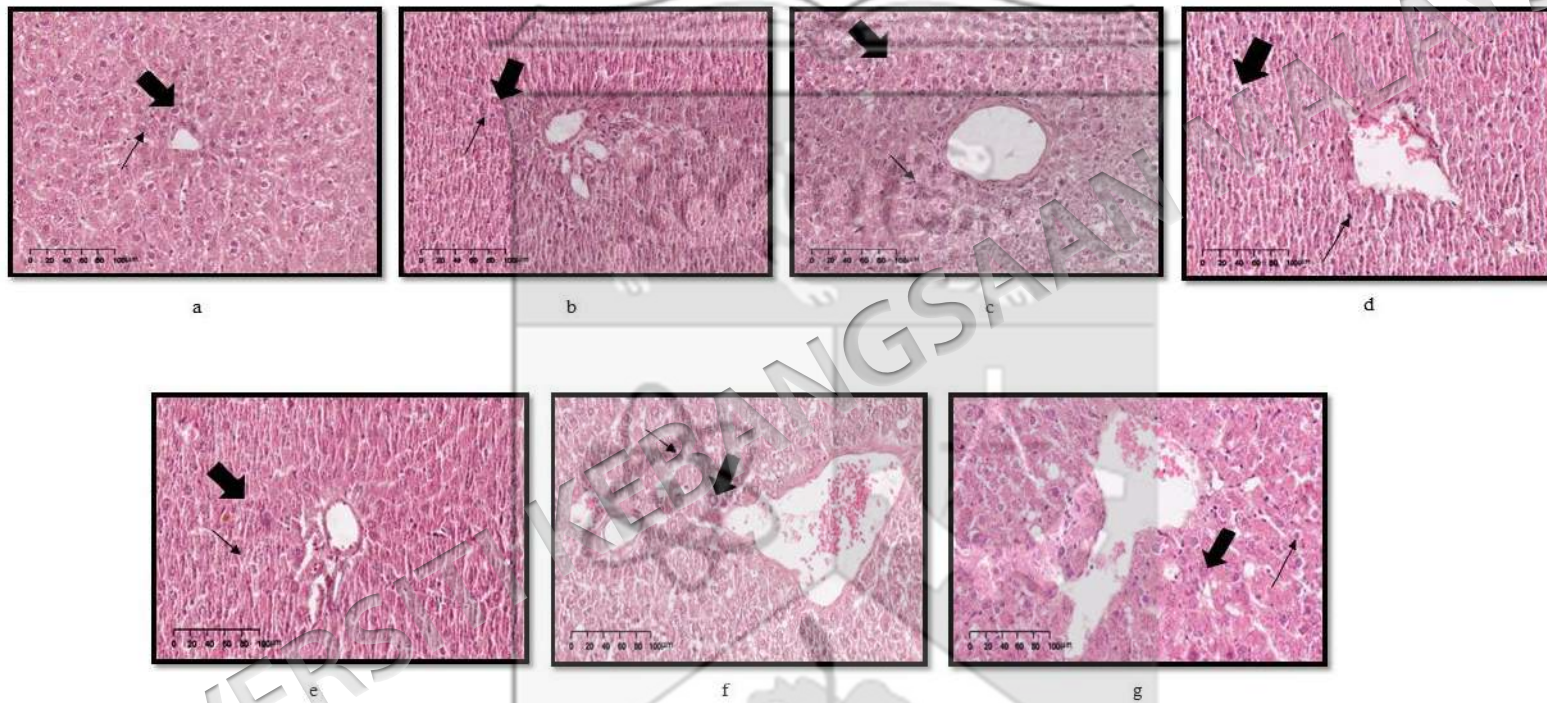
Pewarnaan H&E pada tisu hepar memberikan warna merah jambu yang merujuk kepada sitoplasma, manakala biru keunguan menunjukkan nukleus. Rajah 4.1 menunjukkan fotomikrograf morfologi tisu hepar tikus kumpulan kajian selepas 12 minggu diberikan rawatan.

Morfologi hepar tikus kumpulan kawalan dan tikus kumpulan TRF kawalan ditunjukkan pada fotomikrograf (a) dan (b). Hasil kajian menunjukkan tikus yang tidak diaruh dengan bahan karsinogen menunjukkan sel hepatosit normal yang berbentuk polihidral. Sel hepatosit mengandungi dua atau empat nukleus yang bersaiz besar dan berbentuk sfera berada di tengah-tengah sitoplasma.

Fotomikrograf (c) menunjukkan struktur hepar kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan. Struktur hepatosit di dalam kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan tersebut didapati menjadi lebih tebal berbanding kumpulan kawalan, disertai pembesaran nukleus dan pengurangan taburan sitoplasma. Manakala, bagi kumpulan yang diberi rawatan TRF dengan dos 125mg/kg masih menunjukkan ciri-ciri pra-kanser dan sirosis pada sel hepatosit di mana proses nekrosis telah berlaku pada fotomikrograf (d).

Fotomikrograf (e) pula menunjukkan hasil imej bagi kumpulan rawatan TRF dengan dos 250 mg/kg. Imej menunjukkan ciri-ciri kanser yang tidak sekata pada sel hepatosit disebabkan oleh rawatan profilaksis yang telah diberikan. Namun bagi kumpulan yang diberikan rawatan TRF sebanyak 500 mg/kg dan kumpulan kawalan positif yang diberi rawatan BHA tidak lagi menunjukkan ciri-ciri kanser pada sel hepatosit pada fotomikrograf (f) dan (g).





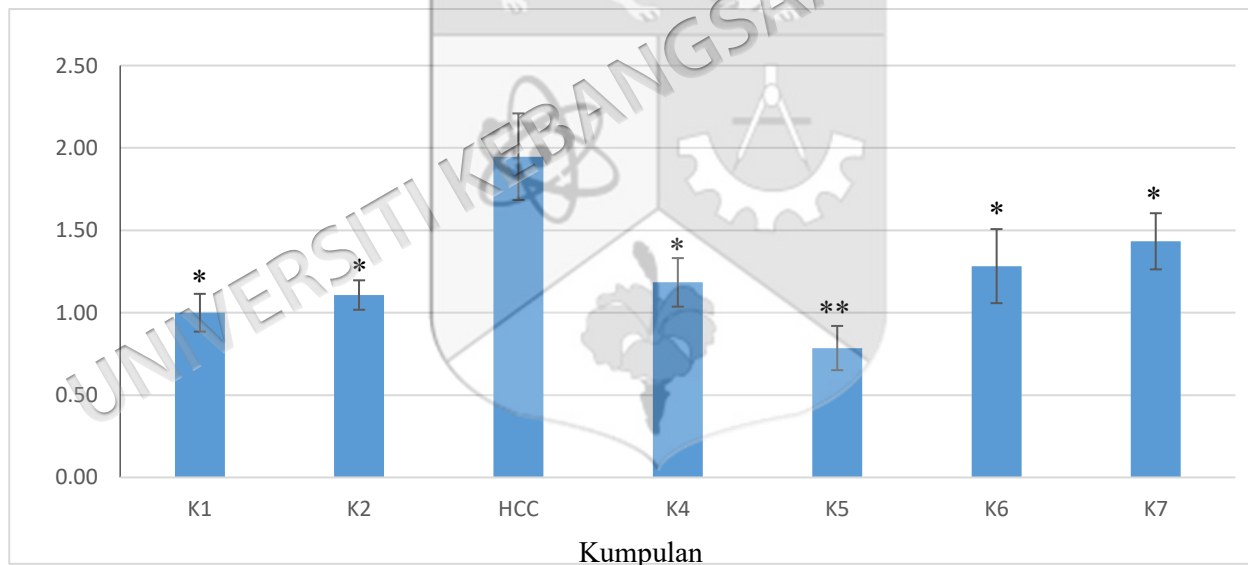
Rajah 4.4 Fotomikrograf tisu hepar yang diwarnakan dengan pewarnaan H&E dari kumpulan kawalan (a), kumpulan TRF kawalan (b), kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan (c), kumpulan hepatokarsinogenesis+TRF 125mg/kg (d), kumpulan hepatokarsinogenesis+TRF 250mg/kg (e), kumpulan hepatokarsinogenesis+TRF 500mg/kg (f) dan kumpulan hepatokarsinogenesis+BHA 100mg/kg (g). Anak panah **➡** menunjukkan hepatosit sel, manakala anak panah **→** nukleus sel.

4.2 ARAS ENZIM FUNGSI HEPAR

4.2.1 Purata Nisbah Aktiviti Enzim Alanina Aminotransferase Serum (ALT)

Rajah 4.2 menunjukkan perbandingan purata nisbah aktiviti enzim ALT serum tikus pada minggu ke-12. Hasil kajian menunjukkan kumpulan tikus yang diaruh dengan bahan karsinogen menunjukkan purata bacaan nisbah aktiviti enzim ALT yang tinggi secara signifikan berbanding kumpulan kawalan (K1). Namun begitu, pemberian tokotrienol kepada tikus yang diaruh karsinogenesis berupaya menurunkan aras purata nisbah aktiviti enzim ALT kepada aras menghampiri kumpulan kawalan (K1) dengan signifikan kepada kumpulan tikus karsinogenesis.

Nisbah Aktiviti Enzim Alanina Aminotransferase Serum (ALT)



* $p < 0.05$ berbanding kumpulan 3

** $p < 0.01$ berbanding kumpulan 3

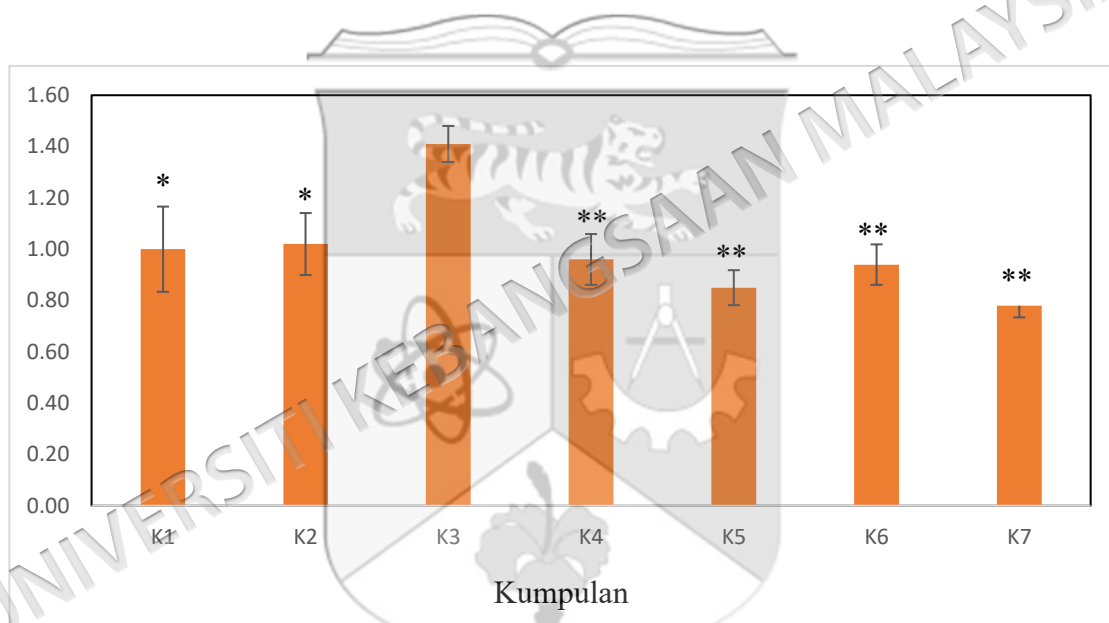
Petunjuk: K1= Kumpulan kawalan, K2 = Kumpulan T3 kawalan, HCC = Kumpulan DEN+2AAF, K4 = Kumpulan DEN+2AAF+TRF 125mg/kg, K5 = Kumpulan DEN+2AAF+TRF 250mg/kg, K6 = Kumpulan DEN+2AAF +TRF 250mg/kg, K7= Kumpulan DEN +2AAF+ BHA 100mg/kg.

Rajah 4.5 Purata nisbah aktiviti enzim alanina aminotransferase serum (ALT) antara kumpulan kajian

4.2.2 Purata Nisbah Aktiviti Enzim Aspartate Aminotransferase Serum (AST)

Rajah 4.3 menunjukkan perbandingan purata nisbah aktiviti enzim AST serum tikus pada minggu ke-12. Kumpulan tikus yang diaruh karsinogenesis (k3) menunjukkan purata nisbah aktiviti AST yang tinggi secara signifikan berbanding tikus kumpulan kawalan (K1). Manakala, bagi kumpulan tikus normal yang diberi suplementasi tokotrienol (kumpulan TRF), menunjukkan purata nisbah aktiviti enzim AST serum yang rendah hampir menyamai kumpulan tikus kawalan (K1). Tikus yang diaruh dengan karsinogenesis yang diberi rawatan tokotrienol dan BHA berupaya menurunkan purata nisbah aktiviti enzim AST dengan lebih rendah secara signifikan berbanding kumpulan tikus karsinogenesis tanpa rawatan.

Nisbah Aktiviti Enzim Aspartate Aminotransferase (AST)



* $p < 0.05$ berbanding kumpulan 3

** $p < 0.01$ berbanding kumpulan 3

Petunjuk: K1= Kumpulan kawalan, K2 = Kumpulan TRF kawalan, HCC = Kumpulan DEN+2AAF, K4 = Kumpulan DEN+2AAF+TRF 125mg/kg, K5 = Kumpulan DEN+2AAF+TRF 250mg/kg, K6 = Kumpulan DEN+2AAF +TRF 250mg/kg, K7= Kumpulan DEN +2AAF+ BHA 100mg/kg

Rajah 4.6 Purata nisbah aktiviti enzim aspartate aminotransferase (AST) serum antara kumpulan kajian

4.3 PROFIL GLOBAL PROTEIN-PROTEIN HEPAR YANG DAPAT DIASINGKAN MELALUI KAEDAH ELEKTROFORESIS GEL DUA DIMENSI (2D-GEL) BAGI SEMUA KUMPULAN TIKUS KAJIAN

Analisis menggunakan elektroforesis gel dua dimensi menunjukkan bahawa profil global protein hepar berbeza antara semua kumpulan kajian. Secara keseluruhan, kumpulan kawalan memperlihatkan corak ekspresi protein yang konsisten dengan taburan bintik protein yang jelas dan tersusun, mencerminkan keadaan fisiologi normal.

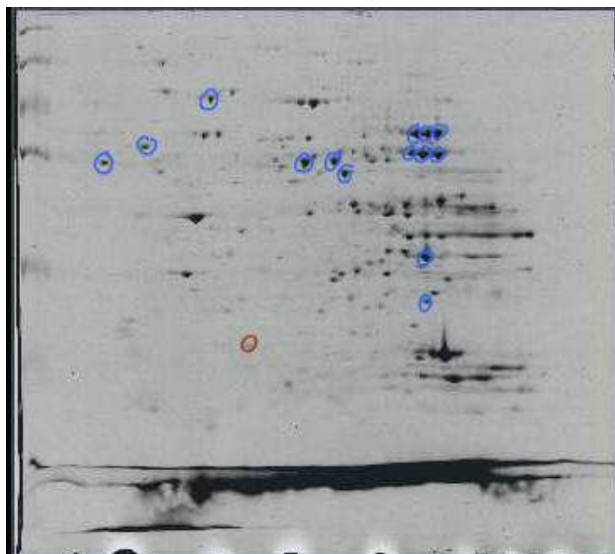
Sebaliknya, kumpulan karsinogenesis tanpa rawatan menunjukkan perubahan ketara dalam profil protein, termasuk pengurangan serta peningkatan intensiti bintik protein tertentu, yang mencerminkan gangguan terhadap homeostasis protein akibat induksi karsinogenesis. Perubahan ini menunjukkan berlakunya pengubahsuaian dalam ekspresi protein yang berkait rapat dengan proses patologi hepar.

Bagi kumpulan hepatokarsinogenesis yang menerima rawatan TRF, perubahan dalam profil protein didapati berlaku secara berperingkat mengikut dos yang diberikan. Pada dos 125 mg/kg, masih terdapat corak protein yang menyerupai kumpulan karsinogenesis tanpa rawatan, namun dengan sedikit pemulihan dalam beberapa bintik protein. Peningkatan dos kepada 250 mg/kg dan 500 mg/kg menunjukkan kecenderungan yang lebih jelas ke arah pemulihan profil protein, dengan corak yang semakin menghampiri kumpulan kawalan, menunjukkan kesan modulasi TRF terhadap ekspresi protein hepar.

Selain itu, kumpulan hepatokarsinogenesis yang menerima rawatan BHA pada dos 100 mg/kg turut menunjukkan perubahan dalam profil protein hepar berbanding kumpulan karsinogenesis tanpa rawatan. Walau bagaimanapun, corak perubahan yang diperhatikan adalah berbeza berbanding kumpulan hepatokarsinogenesis yang dirawat dengan TRF, mencadangkan kemungkinan perbezaan dalam mekanisme tindakan antara kedua-dua bahan tersebut dalam mempengaruhi ekspresi protein.

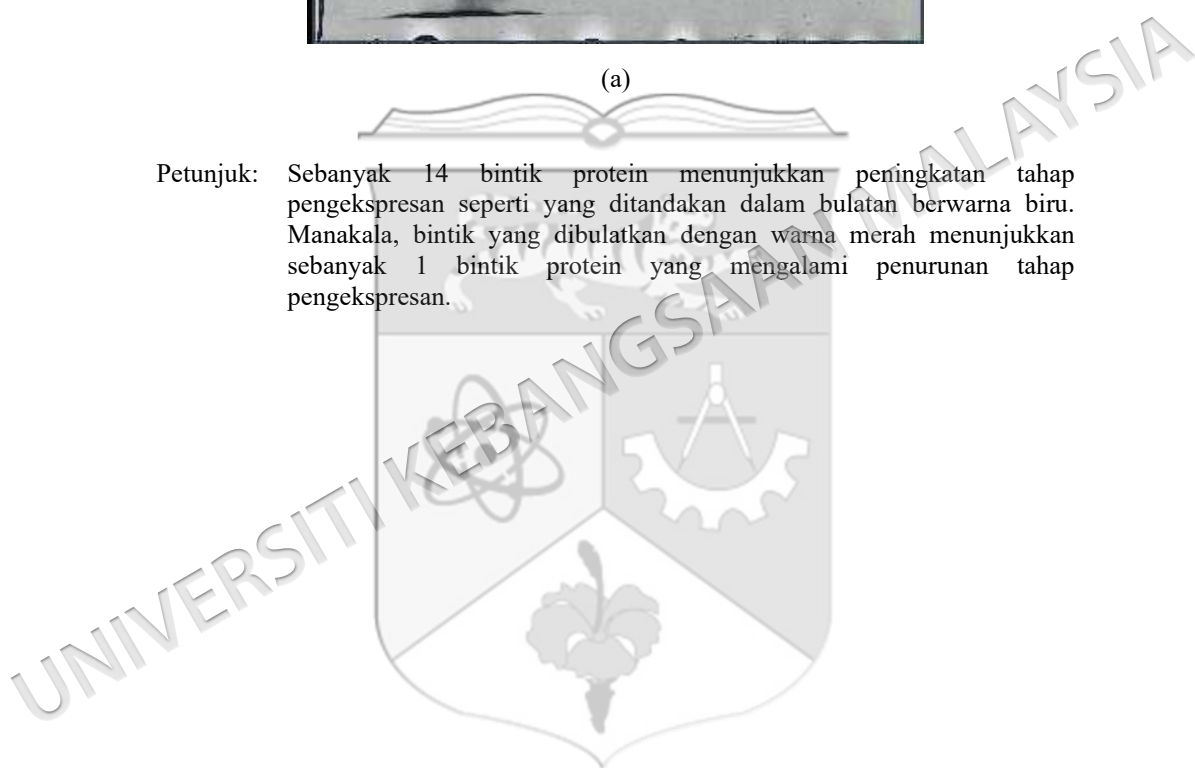
4.4 PERBANDINGAN JUMLAH BINTIK PROTEIN YANG DIEKSPRESIKAN SECARA SIGNIFIKAN ANTARA PROFIL PROTEIN 2D-GEL RUJUKAN (KUMPULAN KAWALAN NORMAL) DAN PROFILPROTEIN 2D-GEL PELBAGAI KUMPULAN RAWATAN

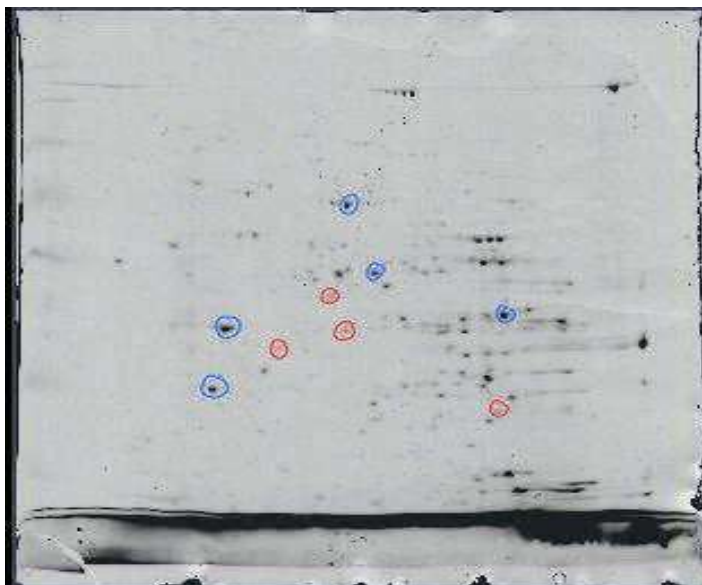
Rajah 4.4 menunjukkan profil protein yang diekspresikan secara signifikan (>2 kali ganda dan $p < 0.05$) bagi setiap rawatan berbanding kumpulan rujukan (kumpulan kawalan) selepas rawatan selama 12 minggu. Analisis perbandingan berdasarkan perbezaan intensiti bintik yang signifikan antara kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan menunjukkan bahawa kumpulan yang dirawat dengan hepatokarsinogenesis + TRF 500 mg/kg mempunyai jumlah bintik tertinggi yang diekspresi secara signifikan (51 bintik mengalami peningkatan pengekspresan dan empat bintik mengalami penurunan pengekspresan), diikuti dengan kumpulan hepatokarsinogenesis + BHA 100 mg/kg (43 bintik mengalami peningkatan pengekspresan dan satu bintik mengalami penurunan pengekspresan), kumpulan hepatokarsinogenesis + TRF 250 mg/kg (35 bintik mengalami peningkatan pengekspresan), kumpulan hepatokarsinogenesis + TRF 125 mg/kg (15 bintik mengalami peningkatan pengekspresan dan enam bintik mengalami penurunan pengekspresan), kumpulan TRF 500 mg/kg (14 bintik mengalami peningkatan pengekspresan dan satu bintik mengalami penurunan pengekspresan), dan akhir sekali kumpulan hepatokarsinogenesis (lima bintik mengalami peningkatan pengekspresan dan empat bintik mengalami penurunan pengekspresan) (Rajah 4.5).



(a)

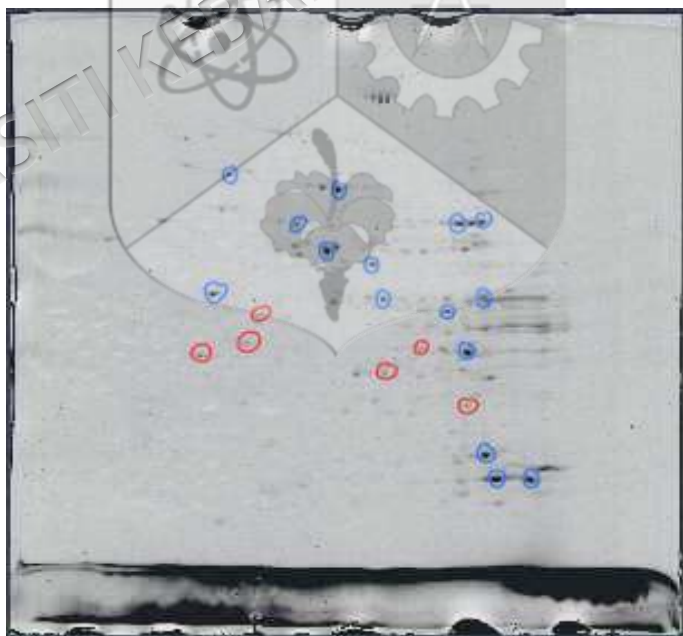
Petunjuk: Sebanyak 14 bintik protein menunjukkan peningkatan tahap pengekspresan seperti yang ditandakan dalam bulatan berwarna biru. Manakala, bintik yang dibulatkan dengan warna merah menunjukkan sebanyak 1 bintik protein yang mengalami penurunan tahap pengekspresan.





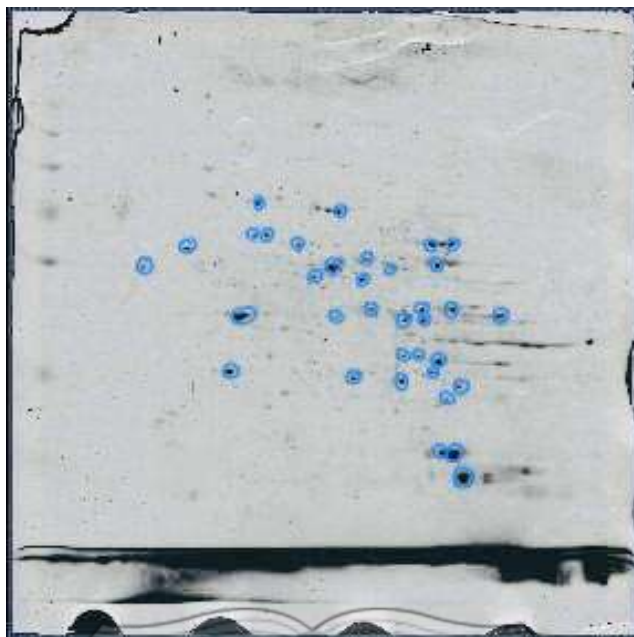
(b)

Petunjuk: Sebanyak 5 bintik protein menunjukkan peningkatan tahap pengekspresan seperti yang ditandakan dalam bulatan berwarna biru. Manakala, bintik yang dibulatkan dengan warna merah menunjukkan sebanyak 4 bintik protein yang mengalami penurunan tahap pengekspresan.



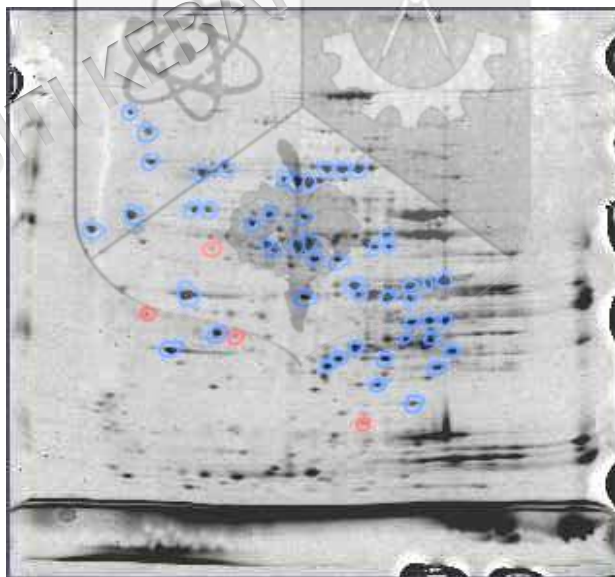
(c)

Petunjuk: Sebanyak 15 bintik protein menunjukkan peningkatan tahap pengekspresan seperti yang ditandakan dalam bulatan berwarna biru. Manakala, bintik yang dibulatkan dengan warna merah menunjukkan sebanyak 6 bintik protein yang mengalami penurunan tahap pengekspresan.



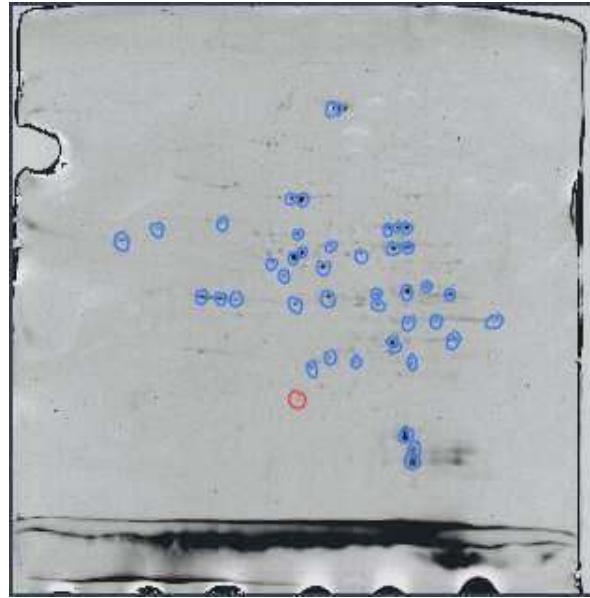
(d)

Petunjuk: Sebanyak 35 bintik protein menunjukkan peningkatan tahap pengekspresan seperti yang ditandakan dalam bulatan berwarna biru.



(e)

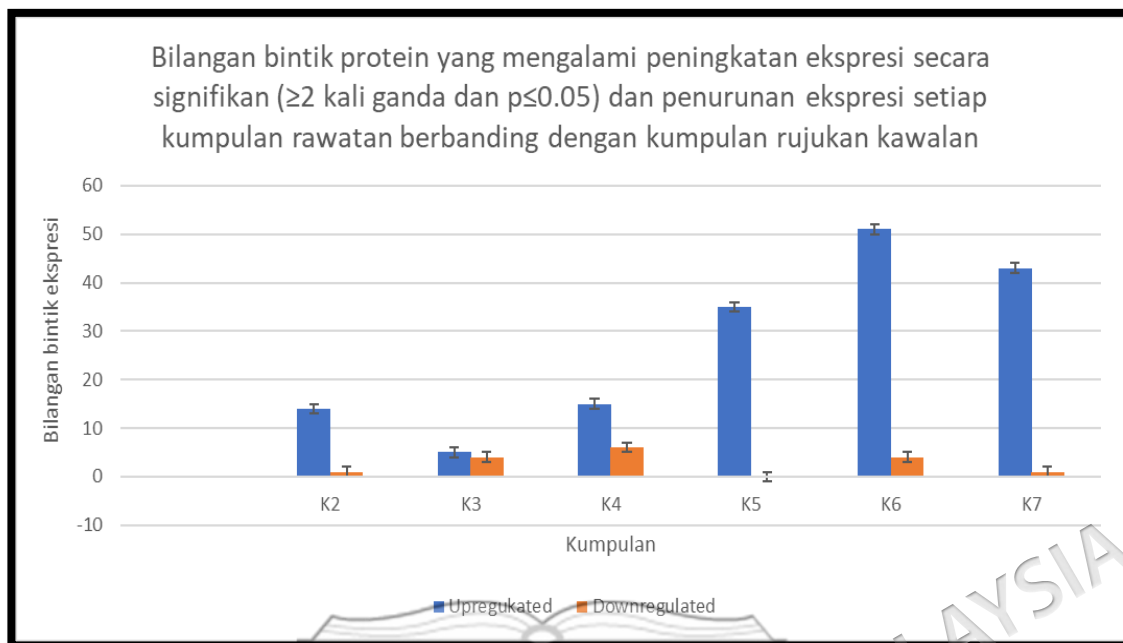
Petunjuk: Sebanyak 51 bintik protein menunjukkan peningkatan tahap pengekspresan seperti yang ditandakan dalam bulatan berwarna biru. Manakala, bintik yang dibulatkan dengan warna merah menunjukkan sebanyak 4 bintik protein yang mengalami penurunan tahap pengekspresan.



(f)

Petunjuk: Sebanyak 35 bintik protein menunjukkan peningkatan tahap pengekspresan seperti yang ditandakan dalam bulatan berwarna biru. Manakala, bintik yang dibulatkan dengan warna merah menunjukkan sebanyak 1 bintik protein yang mengalami penurunan tahap pengekspresan.

Rajah 4.7 Bintik protein yang diekspresikan secara signifikan (≥ 2 kali ganda dan $p \leq 0.05$) setiap kumpulan rawatan berbanding kumpulan rujukan (kawalan). TRF 500mg/kg vs kumpulan kawalan (a), hepatokarsinogenesis vs kumpulan kawalan (b), hepatokarsinogenesis + TRF 125mg/kg vs kumpulan kawalan (c), hepatokarsinogenesis + TRF 250mg/kg vs kumpulan kawalan (d), hepatokarsinogenesis + TRF 500mg/kg vs kumpulan kawalan (e), hepatokarsinogenesis + BHA 100mg/kg vs kumpulan kawalan (g).

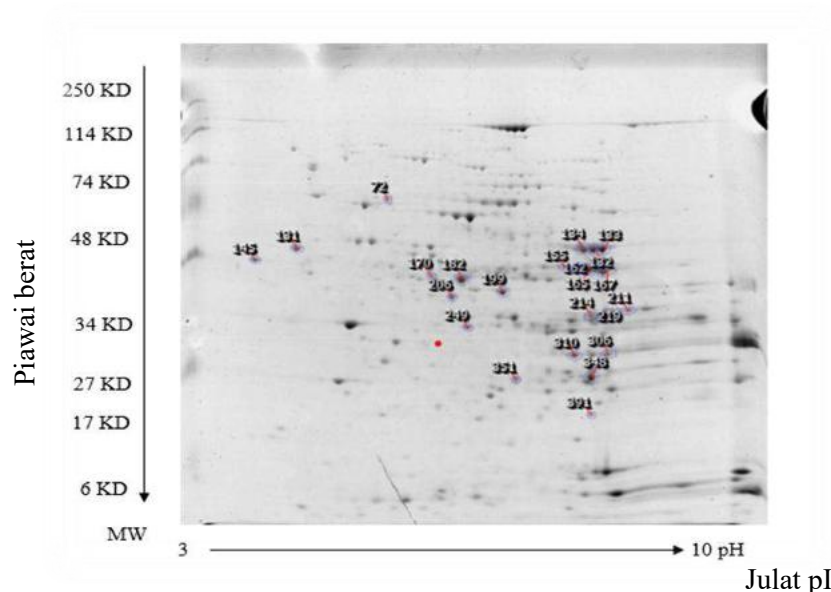


Petunjuk: K2 = Kumpulan TRF kawalan, HCC = Kumpulan DEN+2AAF, K4 = Kumpulan DEN+2AAF+TRF 125mg/kg, K5 = Kumpulan DEN+2AAF+TRF 250mg/kg, K6 = Kumpulan DEN+2AAF +TRF 250mg/kg, K7= Kumpulan DEN +2AAF+ BHA 100mg/kg

Rajah 4.8 Perbandingan bilangan bintik yang diekspresi secara signifikan antara kumpulan-kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan (perubahan ≥ 2 kali ganda dan $p \leq 0.05$).

4.5 PROFIL PROTEIN RUJUKAN BERDASARKAN ANALISIS GABUNGAN KUMPULAN RAWATAN TERHADAP KUMPULAN KAWALAN

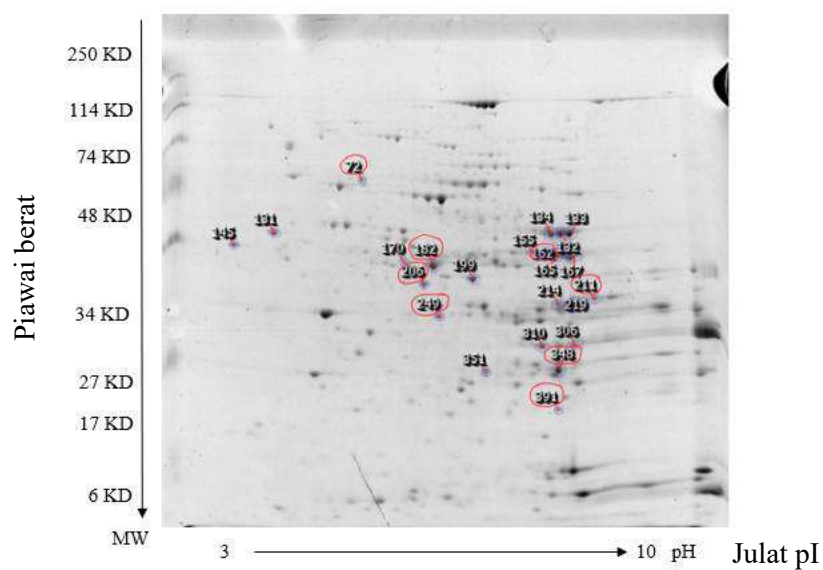
Rajah 4.6 menunjukkan profil bintik protein yang diekspresi secara signifikan. Hasil analisa gabungan 28 imej gel pada pH 3-10NL iaitu empat gel dari setiap kumpulan kajian dengan menjadikan kumpulan kawalan sebagai gel rujukan. Profil protein ini dijadikan sebagai gel rujukan untuk mengasingkan bintik pada setiap gel. Analisa setiap gel menunjukkan setiap gel mengandungi ± 1000 bintik protein secara purata. Walaubagaimanapun, daripada gel rujukan yang didapati tersebut, hanya 23 bintik protein yang diekspresi secara signifikan (perubahan ≥ 2 kali ganda dan $p \leq 0.05$).



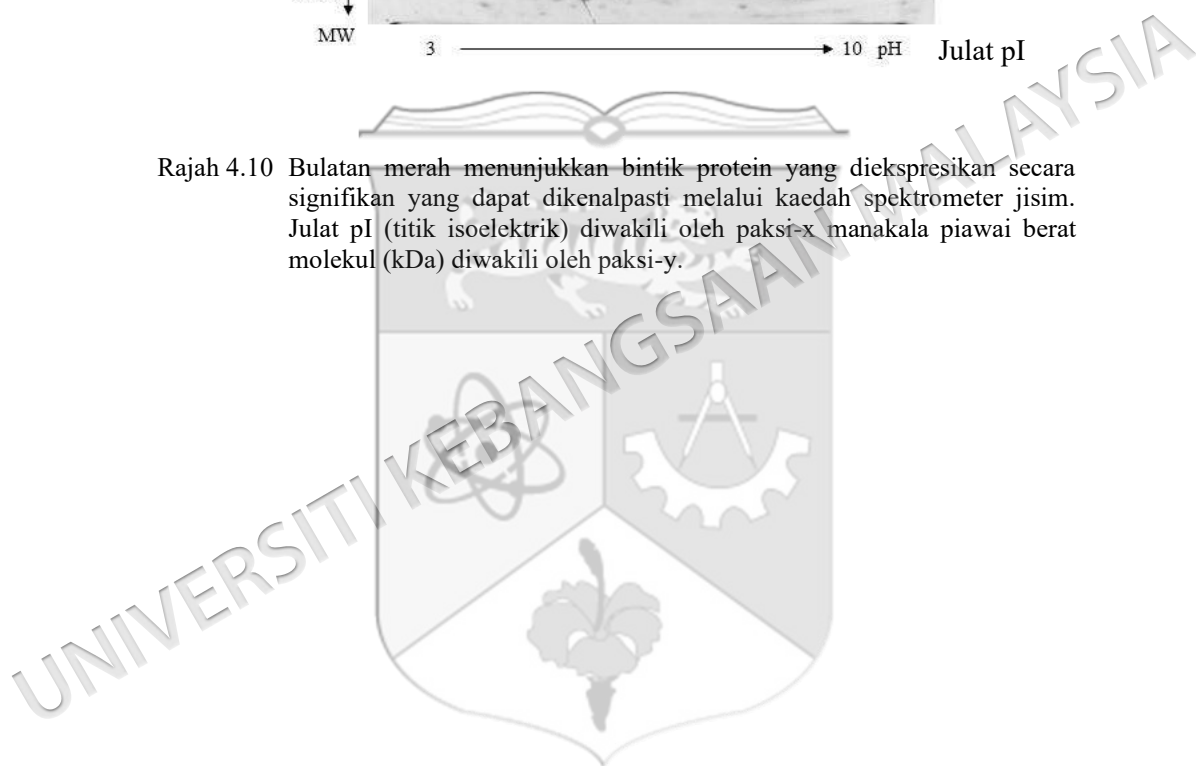
Rajah 4.9 Gel dua dimensi rujukan hasil daripada gabungan semua gel daripada semua kumpulan rawatan. Sebanyak 23 bintik protein diekspresikan secara signifikan setelah perbandingan dilakukan dengan gel kumpulan kawalan. Julat pI (titik isoelektrik) diwakili oleh paksi-x manakala piawai berat molekul (kDa) diwakili oleh paksi-y.

4.6 PENGENALPASTIAN IDENTITI PROTEIN YANG MENUNJUKKAN PERBEZAAN EKSPRESI YANG SIGNIFIKAN

Rajah 4.7 menunjukkan daripada 23 bintik protein yang diekspresikan secara berbeza pada gel rujukan, hanya lapan bintik protein sahaja yang berjaya dikenalpasti melalui kaedah spektrometri jisim iaitu dehidrogenase glutamat 1 (DHE3), protein tekanan-70 (GRP75), aldehyd dehidrogenase (ALDH2), s-adenosilmetionina (METK1), argininosuksinat sintase (ASSY), adenosin kinase (ADK), ornitin karbamoiltransferase (OTC), dan **subunit** alfa protein flavin pemindah elektron (ETF α). Kesemua protein menunjukkan perubahan ekspresi secara signifikan (≥ 2 kali gand, dan $p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan. Jadual 4.1 menunjukkan identiti dan data berkenaan lapan bintik protein yang diperolehi daripada spektrometri jisim. Rajah 4.8 menunjukkan perbezaan ekspresi lapan protein yang telah dikenalpasti melalui spektrometri jisim untuk setiap kumpulan.

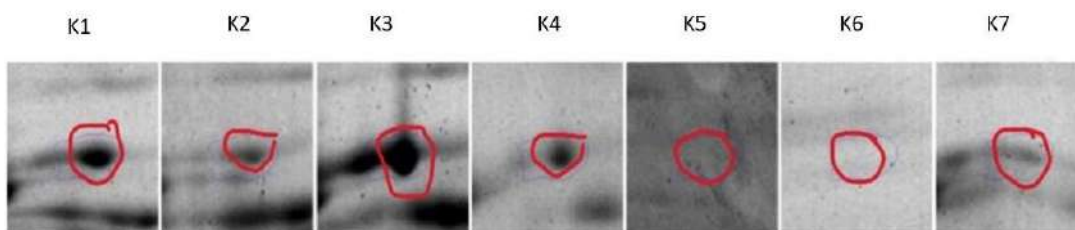


Rajah 4.10 Bulatan merah menunjukkan bintik protein yang diekspresikan secara signifikan yang dapat dikenalpasti melalui kaedah spektrometer jisim. Julat pI (titik isoelektrik) diwakili oleh paksi-x manakala piawai berat molekul (kDa) diwakili oleh paksi-y.

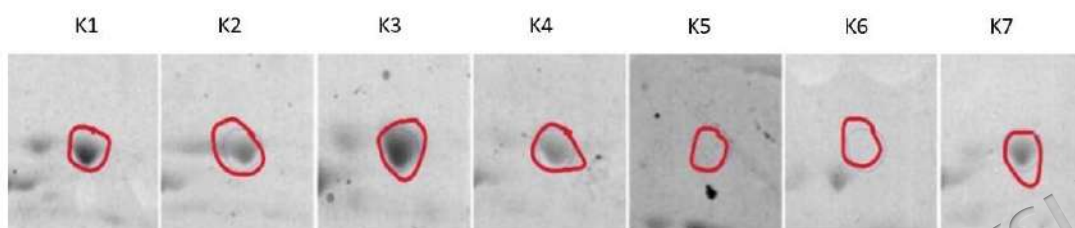


Jadual 4.6 Identiti dan data berkenaan lapan bintik protein yang diperolehi daripada MS

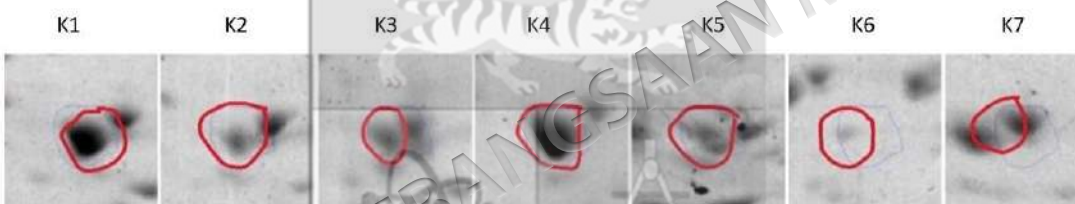
Nombor bintik	Protein	Simbol	Organisma Rujukan	pI/MW (teoretikal) (Da)	pI/MW (eksperimental) (Da)	Skor Protein	Nisbah Perubahan	Nilai P
162	Dehidrogenase glutamat 1	DHE3	Rattus norvegicus	8.05	8.19	85	2.6	0.003
72	Protein tekanan 70	GRP75	Rattus norvegicus	5.97	5.6	80	3.2	0.014
182	Aldehid dehidrogenase	ALDH2	Rattus norvegicus	6.63	6.6	213	3.1	0.009
206	S-adenosilmetionina	METK1	Rattus norvegicus	5.61	6.48	102	2.1	0.045
211	Argininosuksinat sintase	ASSY	Rattus norvegicus	7.63	8.86	58	2.1	0.017
249	Adenosin kinase	ADK	Rattus norvegicus	5.72	6.68	72	2.4	0.019
348	Ornitin karbamoiltransferase	OTC	Rattus norvegicus	9.12	8.35	77	2.9	0.008
391	Subunit alfa protein flavin pemindah elektron	ETFA	Rattus norvegicus	8.62	8.35	77	2.2	0.026



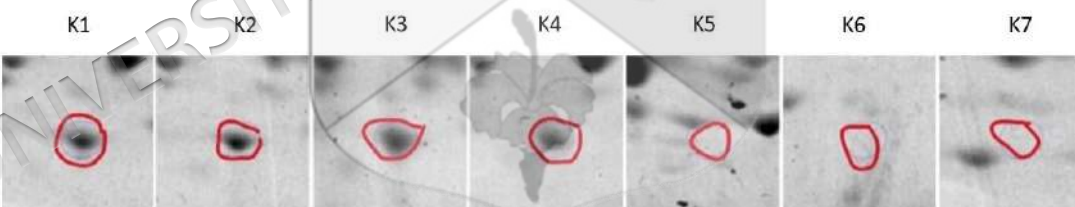
Dehidrogenase glutamat 1 (DHE3)



Protein tekanan 70 (GRP 75)

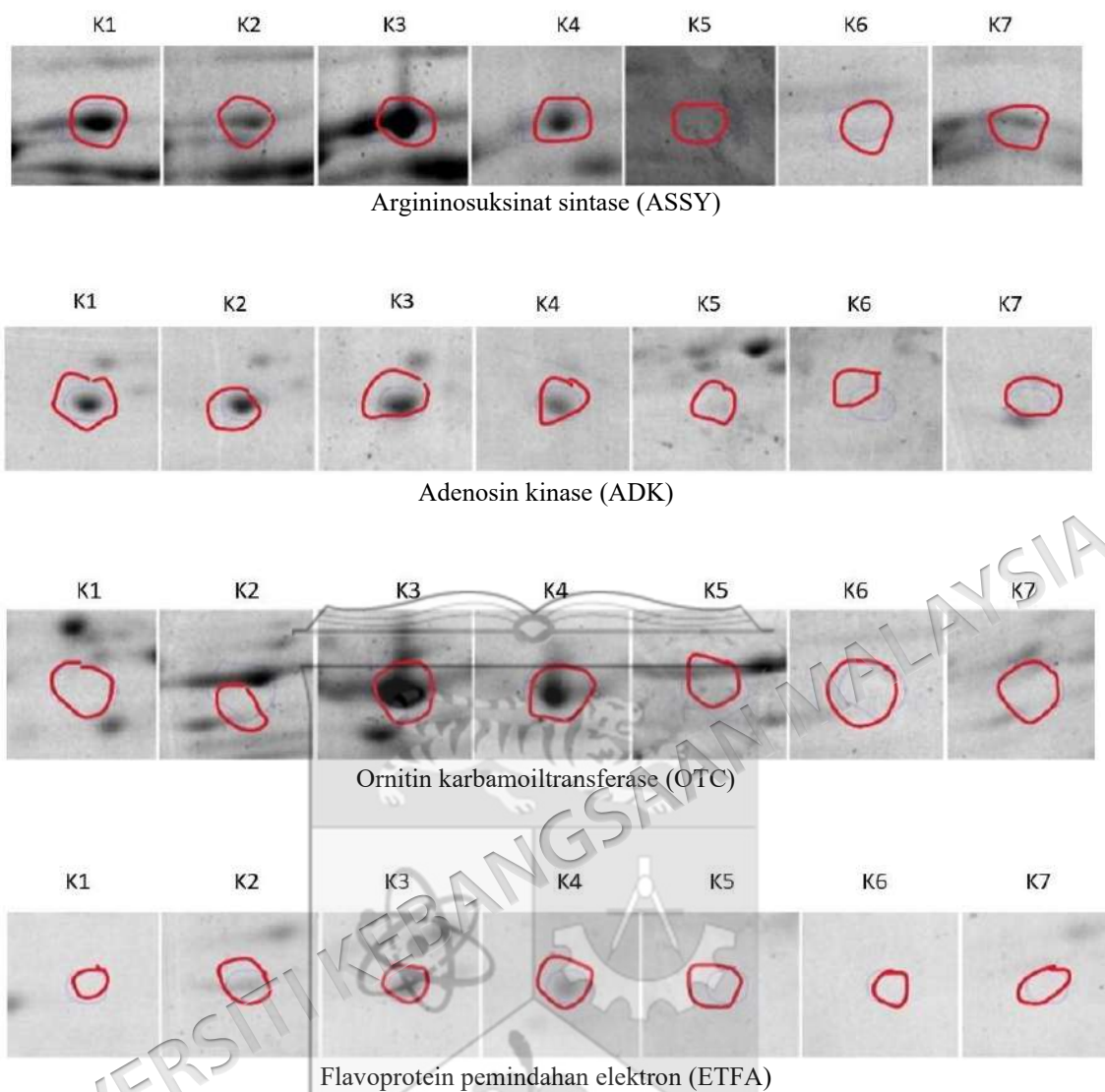


Aldehid dehidrogenase (ALDH2)



S-adenosilmetionina (METK1)

Petunjuk : K1 = kumpulan kawalan, K2 = kumpulan TRF kawalan, K3 = kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan, K4 = kumpulan hepatokarsinogenesis +TRF 125 mg/kg, K5 = kumpulan hepatokarsinogenesis + TRF 250 mg/kg, K6 = kumpulan hepatokarsinogenesis + TRF 250 mg/kg, K7 = kumpulan hepatoarsinogenesis + BHA 100 mg/kg.

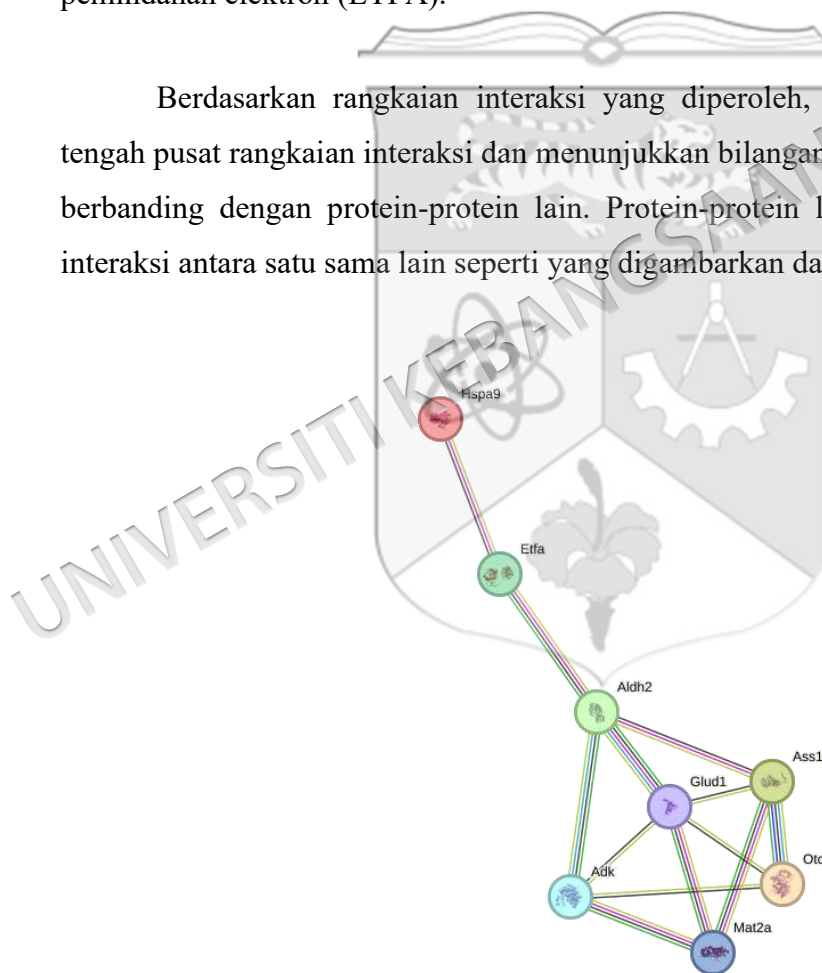


Rajah 4.11 Perbezaan ekspresi setiap lapan protein yang telah dikenalpasti melalui spektrometri jisim untuk setiap kumpulan

4.7 INTERAKSI ANTARA PROTEIN

Rajah 4.9 menunjukkan rangkaian interaksi antara protein-protein yang telah dikenalpasti melalui analisis MALDI-TOF/TOF dan dianalisis menggunakan perisian STRING. Analisis ini dijalankan bagi menilai hubungan kefungsiian antara protein yang telah dikenal pasti, serta mengenal pasti protein utama yang berpotensi memainkan peranan penting dalam laluan biologi tertentu. Antara protein yang telah dikenalpasti ialah dehidrogenase glutamat 1 (DHE3), protein tekanan 70 (GRP75), aldehyd dehidrogenase (ALDH2), s-adenosilmetionina (METK1), argininosuksinat sintase (ASSY), adenosin kinase (ADK), ornitin karbamoiltransferase (OTC), dan flavoprotein pemindahan elektron (ETFA).

Berdasarkan rangkaian interaksi yang diperolehi, protein DHE3 terletak di tengah pusat rangkaian interaksi dan menunjukkan bilangan interaksi yang lebih tinggi berbanding dengan protein-protein lain. Protein-protein lain membentuk hubungan interaksi antara satu sama lain seperti yang digambarkan dalam rajah tersebut.



Rajah 4.12 Interaksi protein-protein dengan menggunakan perisian STRING

4.7.1 Analisis Pengayaan Fungsi Protein

Analisis proses biologi (ontologi gen) terhadap lapan protein yang telah dikenalpasti menunjukkan beberapa proses biologi utama yang diperkaya, khususnya yang berkaitan dengan biosintesis dan metabolisme asid amino.

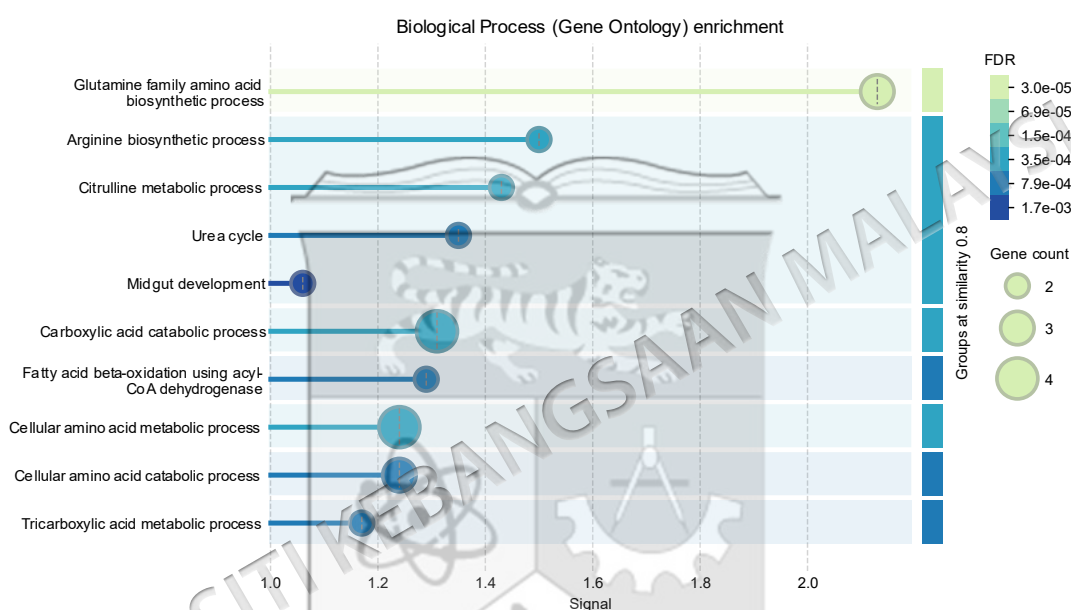
Antara proses biologi yang menunjukkan nilai signifikan termasuk proses biosintesis asid amino keluarga glutamin, proses biosintesis arginin, proses metabolisme sitrulin dan kitar urea. Proses-proses ini melibatkan antara dua hingga empat protein dalam rangkaian dan menunjukkan nilai kadar penemuan palsu (FDR) yang rendah, menandakan tahap signifikan statistik yang tinggi.

Selain itu, beberapa proses metabolik lain turut dikenal pasti, termasuk proses katabolisme asid karboksilik, pengoksidaan beta asid lemak menggunakan dehidrogenase asil-KoA, proses metabolisme asid amino selular, proses katabolisme asid amino selular dan proses metabolisme asid trikarboksilik. Proses biologi lain yang berkaitan dengan metabolisme molekul kecil dan perkembangan sel turut direkodkan seperti yang ditunjukkan dalam rajah 4.10 dan jadual 4.2.

Jadual 4.3 pula memperincikan kategori komponen sel, yang menunjukkan bahawa protein-protein yang dikenal pasti terutamanya dikategorikan dalam komponen mitokondria, matriks mitokondria, dan lumen organel intrasel. Antara komponen tersebut, mitokondria telah menunjukkan tahap pengayaan tertinggi, menandakan bahawa majoriti protein yang dikenal pasti berkait rapat dengan fungsi organel ini. Hasil ini membuktikan penglibatan signifikan protein-protein tersebut dalam proses metabolik dan penghasilan tenaga selular, selaras dengan peranan mitokondria sebagai pusat utama metabolisme dalam sel.

Dari segi fungsi molekul, lapan protein tersebut menunjukkan pengayaan signifikan dalam aktiviti pengikatan, termasuk pengikatan asid amino, anion, molekul kecil, nukleotida, serta pengikatan ATP, serta aktiviti katalitik yang mencerminkan peranan sebahagian protein sebagai enzim. Corak fungsi ini mencerminkan penglibatan protein-protein tersebut dalam tindak balas biokimia dan proses metabolik asas sel seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 4.4.

Selari dengan dapatan ini, analisis laluan KEGG seperti yang ditunjukkan dalam jadual 4.5 menunjukkan bahawa protein-protein tersebut terlibat secara signifikan dalam beberapa laluan metabolik utama, termasuk biosintesis arginin, biosintesis asid amino, serta metabolisme alanina, aspartat dan glutamat, selain pengayaan dalam laluan metabolik umum. Secara keseluruhan, penglibatan dalam fungsi molekul dan laluan metabolik ini menegaskan peranan penting protein-protein yang dikenal pasti dalam metabolisme asid amino dan homeostasis metabolik sel.



Rajah 4.13 Menunjukkan pengayaan proses biologi (Ontologi Gen) bagi 8 protein yang telah dikenalpasti

Jadual 4.7 Proses biologi yang terlibat dalam 8 protein yang telah dikenalpasti

Huraian	Bilangan dalam rangkaian	Kekuatan	Isyarat	Kadar Penemuan Palsu
Proses biosintesis asid amino keluarga glutamin	3 daripada 14	2.77	2.13	0.00031
Proses biosintesis arginin	2 daripada 14	3.14	1.5	0.0036
Proses metabolisme sitrulin	2 daripada 6	2.97	1.43	0.0047
Kitaran urea	2 daripada 9	2.79	1.35	0.0061
Proses katabolisme asid karboksilik	4 daripada 126	1.71	1.31	0.0031
Pengoksidaan beta asid lemak menggunakan dehidrogenase asil-KoA	2 daripada 12	2.67	1.29	0.0077
Proses metabolisme asid amino selular	4 daripada 262	1.63	1.24	0.0036
Proses katabolisme asid amino selular	3 daripada 105	1.9	1.24	0.0061
Proses metabolisme asid trikarboksilik	2 daripada 16	2.54	1.17	0.0117
Perkembangan usus tengah	2 daripada 21	2.42	1.06	0.0177
Proses metabolisme molkul kecil	7 daripada 1534	1.1	1.03	0.00042
Proses biosintesis molekul kecil	4 daripada 415	1.43	1.03	0.0064
Proses metabolisme asid karboksilik	5 daripada 805	1.24	0.95	0.0047
Ritma harian	3 daripada 185	1.65	0.93	0.0192
Perkembangan hepar	3 daripada 246	1.53	0.77	0.0358
Tindak balas hormon	5 daripada 1100	1.1	0.76	0.0105
Tindak balas terhadap sebatian organik siklik	5 daripada 1333	1.02	0.64	0.0207
Proses metabolisme selular	8 daripada 6431	0.54	0.35	0.0262

Jadual 4.8 Komponen yang terlibat bagi 8 protein yang telah dikenalpasti

Huraian	Bilangan dalam rangkaian	Kekuatan	Isyarat	Kadar Penemuan Palsu
Matriks mitokondria	5 daripada 318	1.64	1.89	6.46e-05
Mitokondrion	6 daripada 1588	1.02	0.8	0.0032
Lumen organel intrasel	7 daripada 3519	0.74	0.51	0.0110

Jadual 4.9 Fungsi bagi kesemua 8 protein yang telah dikenalpasti

Huraian	Bilangan dalam rangkaian	Kekuatan	Isyarat	Kadar Penemuan Palsu
Pengikatan asid amino	4 daripada 71	2.19	2.48	3.63e-05
Pengikatan anion	8 daripada 2316	0.98	0.98	3.63e-05
Pengikatan molkul kecil	8 daripada 2451	0.96	0.95	3.63e-05
Pengikatan nukleotida	7 daripada 2080	0.97	0.87	0.00041
Pengikatan ATP	5 daripada 1393	1.0	0.62	0.0227
Aktiviti katalitik	8 daripada 5437	0.61	0.44	0.0071

Jadual 4.10 Tapak jalan KEGG yang terlibat dalam 8 protein yang telah dikenalpasti

Huraian	Bilangan dalam rangkaian	Kekuatan	Isyarat	Kadar Penemuan Palsu
Biosintesis arginin	3 daripada 18	2.67	2.9	1.34e-05
Biosintesis asid amino	3 daripada 76	2.04	1.94	0.00030
Metabolisme alanina, aspartat dan glutamat	2 daripada 34	2.21	1.31	0.0059
Tapak jalan metabolik	6 daripada 1431	1.07	1.0	0.00030

BAB V

PERBINCANGAN

5.1 KAJIAN HISTOLOGI TERHADAP PERUBAHAN TISU HEPAR

Pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (H&E) merupakan teknik histologi yang digunakan secara meluas untuk menilai perubahan morfologi dalam tisu bagi memberikan imej yang jelas terhadap struktur sel yang tidak normal. Pewarnaan H&E menunjukkan perbezaan morfologi diantara sel hepatosit normal dan sel kanser malignan (Krishna 2013). Berdasarkan kajian ini, kumpulan rawatan TRF 500 mg/kg menunjukkan sel hepatosit yang normal seperti sel hepatosit yang terdapat di dalam kumpulan kawalan. Ini membuktikan bahawa suplementasi TRF tidak memberi sebarang kesan kepada sel hepatosit yang normal (Magosso et al. 2013).

Bagi kumpulan yang diaruh hepatokarsinogen (menerima DEN + 2AAF sahaja) menunjukkan perubahan morfologi sel hepatosit iaitu saiz nukleus yang lebih besar, taburan sitoplasma yang lebih rendah dan susunan sel hepatosit yang lebih tebal berbanding dengan kumpulan kawalan. Keadaan ini berlaku kerana DEN bertindak sebagai pemula dalam kanser hepar dengan mengubah suai DNA dan menyebabkan berlakunya pembentukan luka pada fokal praneoplastik. Manakala, agen 2AAF berperanan dalam menggalakkan percambahan sel hepatosit yang telah berubah struktur DNA (Bruno Pisani et al. 2016).

Dalam kajian ini, bagi kumpulan tikus HCC yang dirawat dengan BHA 100 mg/kg menunjukkan hasil keputusan histopatologi sel hepatosit yang tidak lagi menunjukkan ciri-ciri dan morfologi sel kanser, menandakan keberkesanan rawatan dalam menghapuskan sel malignan. BHA merupakan antioksidan sintetik yang boleh dijumpai di dalam industri pemakanan dan farmaseutikal yang berperanan sebagai rawatan kanser dengan mengawal atur tekanan oksidatif. Berdasarkan kajian terdahulu, BHA mampu menghalang kecederaan tisu yang disebabkan oleh ferik nitrilotriasetat (Fe-NTA) (Ansar et al. 2016).

Bagi kumpulan tikus aruhan hepatokarsinogenesis dan diberi rawatan TRF dengan dos 125 mg/kg didapati gagal menghalang perkembangan kanser hepar iaitu sel hepatosit tidak menunjukkan sebarang perubahan dan kelihatan sama seperti kumpulan tikus hepatokarsinogenesis tidak dirawat. Dos TRF yang rendah menunjukkan keberkesanan yang terhad selaras dengan kajian terdahulu melaporkan bahawa dos TRF yang minimum tidak mampu memberi kesan anti-tumor secara signifikan (Kani et al. 2013). Manakala bagi kumpulan hepatokarsinogenesis yang dirawat dengan TRF 250 mg/kg pula mula menunjukkan pengurangan sel kanser hepatosit secara bertompok-tompok, selari dengan kajian sebelum ini mengatakan bahawa kepekatan dos TRF yang lebih tinggi diperlukan untuk mengganggu percambahan sel tumor dan angiogenesis (Qureshi et al. 2016).

Seterusnya bagi kumpulan kajian hepatokarsinogenesis yang dirawat dengan TRF 500 mg/kg pula menunjukkan keberkesanan TRF dalam mengaruh proses apoptosis kerana tiada penghasilan kanser pada sel hepatosit. Hasil kajian ini setara dengan kajian terdahulu yang membuktikan bahawa dos tokotrienol yang tinggi mampu meningkatkan proses apoptosis (Xu et al. 2017). Perbezaan dos menunjukkan kadar tindak balas biologi yang berbeza terhadap keberkesanan TRF dalam proses apoptosis. Pada dos 200 mg, keberkesanan TRF adalah sebanyak 50%. Keberkesanan meningkat kepada 100% pada dos 400 mg dan 600 mg. Namun, pada dos 800 mg dan 1600 mg, keberkesanan TRF menurun kepada 66% (Yang et al. 2020). Selain itu, kajian lain juga menunjukkan kepekatan γ -T3 yang tinggi mampu merendahkan proses proliferasi sel kanser dalam tempoh yang singkat (Ghanem et al. 2019).

Dalam kajian ini, TRF yang digunakan mengandungi kepekatan gamma tokotrienol (γ -T3) yang tinggi, yang merupakan komponen bioaktif utama dalam fraksi tersebut. Oleh itu, peningkatan apoptosis dan pengurangan proliferasi sel yang diperhatikan berkemungkinan besar disumbangkan oleh kandungan γ -T3 yang dominan dalam TRF, selaras dengan laporan bahawa γ -T3 pada kepekatan tinggi mampu merencatkan proliferasi sel kanser dalam tempoh yang singkat (Ghanem et al. 2019).

Perbezaan dos tokotrienol menunjukkan tahap keberkesanan yang berbeza berpunca daripada bioavailabiliti tokotrienol itu sendiri (Qureshi et al. 2016). Pada dos tokotrienol yang rendah, tokotrienol menunjukkan sifat antioksidan manakala pada dos sederhana dan tinggi, tokotrienol telah mengaktifkan laluan pro-apoptosis (Ghanem et al. 2019). Kajian ini membuktikan peranan tokotrienol dalam memodulasi tekanan oksidatif secara kebergantungan dos. Hasil kajian ini menunjukkan kepentingan dos tokotrienol yang optimum dalam rawatan kanser. Walaupun setiap dos menunjukkan potensi sebagai agen terapeutik, namun kajian klinikal terhadap kesan sampingan penggunaan dos tokotrienol perlu dilaksanakan pada masa akan datang.

5.2 KESAN SUPLEMENTASI FRAKSI KAYA TOKOTRIENOL TERHADAP ARAS ENZIM FUNGSI HEPAR

Enzim ALT dan AST berperanan penting dalam metabolisme asid amino yang berlaku di dalam organ hepar. ALT dan AST merupakan penanda biologi bagi menilai fungsi hepar dan mengesan kecederaan sel hepatosit. Peningkatan paras enzim tersebut sering menandakan kerosakan hepar. Berdasarkan kajian terdahulu, pemberian DEN telah menyebabkan karsinogenesis secara progresif dalam hepar (Castro-Gil et al. 2021). Dalam kajian ini, terdapat peningkatan enzim ALT dan AST secara signifikan bagi kumpulan kawalan hepatokarsinogenesis berbanding kumpulan kawalan. Peningkatan aras enzim ini membuktikan bahawa bahan kimia DEN dan 2 AAF yang digunakan memberikan kesan ketoksikan kepada organ hepar (Malik et al. 2013).

Seterusnya, bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 250 mg/kg menunjukkan penurunan paras enzim ALT paling signifikan ($p < 0.01$) berbanding kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 125 mg/kg dan 500 mg/kg ($p < 0.05$). Perbezaan ini menunjukkan bahawa kesan dos pertengahan hepatokarsinogenesis +

TRF 250 mg/kg adalah lebih dominan dan mencadangkan bahawa dos pertengahan tersebut merupakan julat dos optimum untuk mencapai keberkesanan maksimum dalam kajian ini. Bagi kumpulan rawatan dos rendah hepatokarsinogenesis + TRF 125 mg/kg, sifat antioksidan dan anti-keradangan yang terdapat di dalam tokotrienol mungkin tidak mencukupi untuk mengurangkan tekanan oksidatif serta keradangan yang berkaitan dengan kanser hepar. Manakala pemberian dos TRF yang tinggi bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 500 mg/kg berpotensi menghasilkan kesan pro-oksidan lalu menyebabkan keberkesanan TRF berkurang.

Bagi hasil ujian AST pula, setiap kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF dengan dos 125 mg/kg, 250 mg/kg dan 500 mg/kg menunjukkan penurunan enzim secara signifikan ($p < 0.01$) berbanding ujian ALT tanpa mengira dos. Hasil kajian ini telah menyokong kajian terdahulu yang menyatakan bahawa suplementasi tokotrienol mampu mengurangkan paras enzim ALT dan AST kerana tokotrienol telah menunjukkan kesan hepatoprotektif dengan peningkatan sistem pertahanan antioksidan dan perencatan peroksidasi lipid (Pervez et al. 2020).

Tokotrienol merupakan vitamin E mempunyai sifat antioksidan dan anti keradangan yang berpotensi menyumbang kepada penurunan paras enzim hepar. Tokotrienol berpotensi sebagai agen hepatoprotektif melalui mekanisme meneutralkan tekanan oksidatif dan merencat tapak jalan isyarat keradangan yang merupakan faktor utama dalam patogenesis kerosakan hepatosit. Berdasarkan kajian terdahulu, tokotrienol mampu mengurangkan peroksidasi lipid melalui mekanisme antioksidan yang meneutralkan radikal bebas yang terbentuk akibat tekanan oksidatif yang menjadi punca utama peroksidasi lipid. Selain itu, tokotrienol juga turut mengurangkan tahap nitrik oksida dan tumor nekrosis yang menjadi punca berlakunya keradangan (Chin et al. 2016).

Berdasarkan kajian-kajian terdahulu, tokotrienol telah terbukti memainkan peranan penting dalam menjadi agen hepatoprotektif melalui pengurangan tekanan oksidatif dan bertindak sebagai anti keradangan dalam mengekalkan fungsi hepar (Wong et al. 2017). Hasil kajian ini yang menunjukkan penurunan yang signifikan dalam tahap ALT dan AST selaras dengan kajian-kajian terdahulu yang memberi

sokongan tambahan terhadap kesan hepatoprotektif (Jayusman et al. 2017). Penurunan enzim - enzim ini membuktikan bahawa tokotrienol mampu mengurangkan kerosakan hepar melalui mekanisma perlindungan yang telah dikenalpasti melalui kajian – kajian terdahulu. Namun begitu, kajian lebih terperinci masih diperlukan untuk mengenalpasti mekanisma-mekanisma yang lebih spesifik terlibat dalam aktiviti hepatoprotektif. Penyelidikan lebih lanjut mengenai kesan penggunaan tokotrienol untuk jangka masa yang panjang akan memberi pemahaman lebih mendalam terhadap mekanisma tokotrienol melindungi hepar pada peringkat selular dan molekular.

5.3 PERBANDINGAN PROFIL PROTEIN UNTUK SETIAP KUMPULAN

Kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan memperlihatkan perubahan ketara dalam bilangan dan taburan bintik protein berbanding kumpulan kawalan, ini menunjukkan terdapat gangguan terhadap kestabilan proteomik akibat proses karsinogenesis. Perbezaan bintik protein ini selari dengan kajian terdahulu yang melaporkan perbezaan taburan bintik protein yang ketara antara kumpulan hepatoselular karsinoma dan kumpulan tisu normal (Zorina et al. 2025). Kumpulan rawatan TRF pada dos 125 mg/kg tidak menunjukkan perubahan yang signifikan apabila dibandingkan dengan kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan, mencadangkan bahawa dos tersebut mungkin tidak mencukupi untuk mengawal perubahan proteomik yang berlaku.

Kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 250 mg/kg memaparkan profil protein yang lebih stabil berbanding kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan, dengan taburan bintik protein yang lebih menghampiri corak kumpulan kawalan. Keadaan ini mencadangkan bahawa dos TRF yang sederhana berpotensi memodulasi perubahan proteomik yang dicetuskan oleh proses karsinogenesis, dan kesannya mungkin setanding dengan agen rujukan BHA.

Namun begitu, kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 500 mg/kg menunjukkan taburan bintik protein yang lebih banyak berbanding kumpulan kawalan. Peningkatan ini mungkin menunjukkan pengaktifan laluan tindak balas selular yang lebih meluas, termasuk mekanisma tekanan oksidatif atau regulasi apoptosis, yang menunjukkan bahawa dos TRF yang tinggi mampu mencetuskan perubahan proteomik yang lebih kompleks berbanding sekadar pemulihan kepada keadaan normal.

Bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA 100 mg/kg turut menunjukkan corak taburan bintik protein yang hampir sama dengan kumpulan kawalan, ini menandakan kesan penstabilan proteom yang konsisten. Perbandingan ini mencadangkan bahawa keberkesanan kumpulan rawatan TRF 250 mg/kg dalam memulihkan perubahan proteomik adalah setanding dengan agen rujukan BHA, meskipun mekanisme molekul yang terlibat berbeza-beza.

Seterusnya, kumpulan TRF kawalan menunjukkan corak taburan bintik protein yang hampir menyerupai kumpulan kawalan normal, mencadangkan bahawa TRF tidak menyebabkan gangguan proteomik yang signifikan dalam keadaan fisiologi normal. Hasil ini menunjukkan bahawa TRF tidak memberi kesan toksik atau perubahan besar terhadap homeostasis protein dalam hepar yang normal.

Perbezaan dos TRF menunjukkan kesan yang berbeza terhadap tindak balas proteomik. Secara keseluruhan, dapatan ini menunjukkan bahawa kesan TRF terhadap profil protein dalam model hepatokarsinogenesis adalah bergantung kepada dos. Dos rendah mungkin tidak mencukupi untuk menghasilkan kesan protektif yang jelas, manakala dos sederhana menunjukkan modulasi proteomik yang optimum, dan dos tinggi berpotensi mencetuskan tindak balas proteomik yang lebih luas dan kompleks.

5.4 PERBANDINGAN JUMLAH BINTIK YANG DIEKSPRESIKAN SECARA SIGNIFIKAN ANTARA PROFIL BINTIK PROTEIN RUJUKAN (KUMPULAN KAWALAN) DAN PROFIL PROTEIN KUMPULAN RAWATAN

Analisis perbandingan antara kumpulan kawalan dengan setiap kumpulan menunjukkan kumpulan aruhan hepatokarsinogenesis sahaja mempunyai 5 bintik protein yang berbeza secara signifikan. Dapatan ini menunjukkan bahawa aruhan karsinogen telah mencetuskan perubahan dalam landskap proteomik hepar secara selektif. Oleh itu, hanya protein tertentu sahaja yang dapat diekspresikan secara signifikan berbanding kumpulan kawalan.

Kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 500 mg/kg menunjukkan peningkatan ketara dalam bilangan bintik signifikan (51 bintik). Pola peningkatan ini selari dengan kecenderungan kebergantungan dos, iaitu pada 15 bintik pada 125 mg/kg, 35 bintik pada dos 250 mg/kg dan 51 bintik pada 500 mg/kg. Hasil kajian ini mencadangkan bahawa berlaku penyusunan semula profil protein sebagai tindak balas terhadap gabungan karsinogen dan TRF. Dos yang lebih tinggi berkemungkinan memberi kesan yang lebih ketara terhadap perubahan ekspresi protein. Dapatan ini adalah konsisten dengan laporan terdahulu yang menunjukkan bahawa γ -tokotrienol mampu mengawal pengekspresan protein, seperti peroxedoxin-4 dalam model kanser hepar, seterusnya mengawal proliferasi sel tumour (Abdul Rahman Sazli et al. 2015). Walaupun kajian tersebut menggunakan isoform tunggal tokotrienol, kehadiran γ -tokotrienol dalam TRF menyokong kemungkinan bahawa perubahan proteomik yang diperhatikan dalam kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF mencerminkan mekanisme modulasi protein yang serupa dalam konteks patologi.

Bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA menunjukkan 43 bintik protein yang signifikan turut menyokong intervensi antioksidan dalam keadaan hepatokarsinogenesis yang boleh mengubah profil protein dengan lebih jelas berbanding kumpulan kawalan. Namun, bilangan bintik protein kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 500 mg/kg lebih tinggi berbanding kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA menunjukkan bahawa kesan TRF melibatkan mekanisme yang lebih luas daripada sekadar aktiviti antioksidan.

Seterusnya, kumpulan TRF 500 mg/kg memperlihatkan 14 bintik yang menunjukkan perubahan signifikan. Dapatan ini mencerminkan bahawa TRF tidak memberi kesan kepada perubahan proteomik yang meluas dalam kumpulan tikus normal yang diberi rawatan tersebut. Hasil kajian ini mencadangkan bahawa TRF memberi kesan yang berbeza-beza bergantung kepada keadaan biologi sel atau tisu dengan memodulasi ekspresi beberapa protein tertentu dan mengawal pelbagai laluan biokimia dalam sel secara terkawal dan selektif (Rusli et al. 2024).

Apabila semua kumpulan kajian dibandingkan secara serentak, hanya 23 bintik protein sahaja yang diekspresikan secara signifikan. Hasil ini menunjukkan bahawa perubahan proteomik yang diperhatikan dalam analisis perbandingan individu adalah bergantung kepada kumpulan tertentu, manakala hanya sebahagian kecil protein menunjukkan pola ekspresi yang konsisten kepada semua kumpulan. Keadaan ini mengukuhkan bahawa modulasi proteomik yang berlaku adalah terpilih dan tidak melibatkan keseluruhan proteome hepar.

Secara keseluruhan, dapatan ini menunjukkan bahawa rawatan TRF, khususnya pada dos tinggi dalam keadaan hepatokarsinogenesis, dikaitkan dengan perubahan proteomik yang lebih meluas berbanding keadaan fisiologi normal, manakala analisis serentak mengenal pasti subset protein yang paling konsisten berubah merentasi kumpulan.

5.5 IDENTIFIKASI PROTEIN YANG MENUNJUKKAN PERBEZAAN EKSPRESI DAN PERANAN PROTEIN

Daripada 23 bintik protein yang menunjukkan perbezaan ekspresi secara signifikan (\geq kali ganda), namun hanya 8 bintik protein sahaja yang berjaya dikenalpasti menggunakan analisis spektrometri jisim (MS). Manakala, bintik-bintik protein yang lain tidak dapat dikenalpasti mungkin kerana jumlah padanan peptida yang tidak mencukupi dan proses penyediaan sampel yang tidak optimum menjadi factor utama kegagalan dalam identifikasi protein. Menurut kajian terdahulu, kekurangan jumlah sampel mengakibatkan kepekatan peptida terlalu rendah, lalu menyukarkan pengesanan protein secara tepat (Topić Popović et al. 2023). Apabila penyediaan sampel yang tidak optimum menyebabkan pemecahan protein yang tidak lengkap, menjejaskan ketepatan pemadanan spektrum jisim dengan pengkalan data protein yang berkaitan.

Protein-protein yang telah dikenalpasti ialah dehidrogenasi glutamate 1 (DHE3), protein tekanan-70 (GRP 75), S-adenosilmetionina (METK1), Aldehid dehidrogenase (ALDH2), Argininosuksinat sintase (ASSY), Adenosin kinase (ADK), Ornitin karbamoiltransferase (OTC) dan Subunit alfa protein flavin pemindah elektron (ETF_A). Berdasarkan fungsi biologi yang telah direkodkan, protein-protein ini

dikaitkan dengan pelbagai laluan molekul termasuk homeostasis tekanan oksidatif, regulasi pembahagian sel dan perlindungan terhadap kerosakan sel (Dibal et al. 2025).

Berdasarkan kajian terdahulu, peningkatan dos TRF menunjukkan pengaktifan faktor transkripsi Nrf2, yang seterusnya meningkatkan ekspresi gen yang terlibat dalam mekanisme antioksidan dan perlindungan sel (Atia et al. 2021). Memandangkan Nrf2 merupakan pengawalatur utama untuk homeostasis redoks dan mekanisme sitoprotektif, perubahan ekspresi protein yang terdapat dalam kajian ini, khususnya yang berkaitan dengan metabolisme mitokondria dan detoksifikasi, mungkin selaras dengan pengaktifan tapak jalan tersebut. Corak kebergantungan dos menunjukkan bahawa modulasi proteomik ini mungkin dikawal oleh sebahagian Nrf2.

Penganalisan daripada kajian-kajian terdahulu mencadangkan bahawa protein ALDH2 dan DHE3 dikawalatur oleh Nrf2. ALDH2 berperanan penting dalam detoksifikasi aldehid reaktif yang meningkat ketika tekanan oksidatif. Hal ini selari dengan kajian terdahulu, yang menunjukkan bahawa TRF berpotensi mengaktifkan laluan Nrf2 yang terlibat dalam pertahanan antioksidan, manakala ALDH2 berfungsi dalam pengawalan tekanan oksidatif melalui modulasi sistem ROS (Abdullah et al. 2012; Tong et al. 2025). Selain itu, DHE3 merupakan enzim mitokondria yang terlibat dalam metabolisme tenaga dan berfungsi dalam keseimbangan redoks. Kajian terdahulu mencadangkan bahawa Nrf2 turut terlibat dalam pengawalan proses metabolik termasuk fungsi mitokondria (Deblasi et al. 2020). Oleh itu, pengaktifan Nrf2 secara tidak langsung menyumbang kepada pemeliharaan keseimbangan redoks melalui pengawalan enzim detoksifikasi serta proses metabolic mitokondria.

Protein-protein lain seperti ASSY, GRP75, dan OTC tidak dikawalatur oleh Nrf2 kerana protein-protein tersebut terlibat dalam metabolik yang berbeza. Protein OTC dan ASSY terlibat dalam kitaran urea yang berperanan dalam detoksifikasi ammonia serta homeostasis nitrogen. Oleh itu, pengawalan kedua-dua protein ini lebih bergantung kepada status metabolik hepar serta perubahan mekanisme metabolik sel, berbanding laluan Nrf2. (Hong et al. 2021; Xia et al. 2025). Protein GRP75 pula merupakan protein chaperone mitokondria yang terlibat dalam pemeliharaan lipatan protein. Kajian terdahulu mencadangkan bahawa GRP75 lebih bergantung kepada

mekanisme tekanan mitokondria berbanding Nrf2, yang berfungsi dalam pengawalan gen antioksidan melalui ARE (Wang et al. 2025; Zhao et al. 2022). Secara keseluruhannya, dapatan ini menunjukkan bahawa protein GRP75, ASS1 dan OTC tidak dikawal secara langsung oleh Nrf2, sebaliknya lebih dipengaruhi oleh laluan tekanan mitokondria dan metabolisme nitrogen yang berbeza daripada mekanisme pertahanan antioksidan yang dimediasi oleh Nrf2.

Aldehid dehidrogenase (ALDH2) yang telah dikenalpasti berfungsi menguraikan asetaldehid, sejenis toksin yang dihasilkan semasa metabolisme alkohol. Protein ini membantu mengurangkan tekanan oksidatif dan kerosakan DNA, seterusnya melindungi sel daripada transformasi karsinogenik. Penurunan ALDH2 dikaitkan dengan peningkatan spesies oksigen reaktif yang disebabkan oleh karbon tetraklorida (CCl₄) (Ma et al. 2018). Kajian terdahulu juga menunjukkan ALDH2 boleh merencat metastasis sel karsinoma hepatoselular melalui protein kinase yang diaktifkan oleh adenosine 5'-monofosfat, meningkatkan autofagi sel HCC dan menghalang pelarian imun dengan merencat paksi ROS/Nrf2 (Xia et al. 2023). Hasil kajian menunjukkan bahawa pengekspresan ALDH2 berkurang dalam kumpulan rawatan dos TRF 250 mg/kg dan 500 mg/kg, berkemungkinan disebabkan oleh pengurangan jumlah sel kanser. Penurunan ini mencadangkan bahawa ALDH2 tidak diperlukan untuk kelangsungan hidup sel dalam keadaan ini, sejajar dengan perannya dalam metabolisme dan ketahanan sel kanser terhadap tekanan mikropersekitaran. Secara keseluruhan, hasil kajian ini menyokong peranan ALDH2 dalam modulasi tekanan dan kelangsungan sel hepatokarsinogenesis.

Protein glutamat dehidrogenase (DHE3) merupakan enzim mitokondria yang berfungsi dalam metabolisme asid amino melalui penukaran glutamate kepada α -ketoglutarat, sekali gus menghubungkan metabolisme nitrogen dengan kitaran asid trikarboksilik (TCA) (Nissen et al. 2015). Selain itu, DHE3 juga terlibat dalam pengawalan keseimbangan hormon tubuh, khususnya melalui peranan dalam metabolisme glutamat yang boleh mempengaruhi rembesan hormon tertentu. Berdasarkan hasil kajian ini, kepekatan bintik protein DHE3 yang tinggi dalam kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan berbanding kumpulan kawalan menunjukkan bahawa kemungkinan sel prakanser hepar meningkatkan aktiviti metabolik mitokondria

untuk menyokong proses proliferasi. Hasil kajian ini selari dengan kajian terdahulu, pengekspresan glutamat dehidrogenase 1 (GDH1) yang tinggi membantu sel menggunakan glutamin sebagai sumber tenaga daripada kitaran TCA dan sekaligus menyokong proliferasi sel tumor (Marsico et al. 2021).

Bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 250 mg/kg dan 500 mg/kg pula menunjukkan tiada pengekspresan bintik protein DHE3. Dapatan ini berkemungkinan kerana berlakunya perencatan pengangkut glutamin lalu, mengurangkan pengambilan glutamin oleh sel proliferaatif. Keadaan ini membawa kepada penurunan proliferasi sel dan peningkatan apoptosis selari dengan dapat kajian terdahulu yang merekodkan bahawa δ -tokotrienol merencat laluan mekanistik sasaran rapamisin (mTOR) dan metabolisme glutamin (Rajasinghe et al. 2019). Manakala bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA pula menunjukkan penurunan intensity bintik protein DHE3 mencadangkan bahawa rawatan tersebut berpotensi mengurangkan aktiviti metabolisme glutamin dan sel hepar. DHE3 berfungsi dalam glutaminolisis dan menyokong kelangsungan hidup serta proliferasi sel hepatokarsinoma, pengurangan ekspresi mungkin mencerminkan gangguan metabolisme tenaga sel tumor (Zhou et al. 2022).

Secara keseluruhannya, dapatan kajian ini menunjukkan bahawa ekspresi protein glutamate dehydrogenase berubah mengikut keadaan fisiologi dan rawatan yang diberikan. Perubahan intensiti bintik protein ini mencadangkan bahawa metabolisme glutamin mungkin terlibat dalam proses hepatokarsinogenesis dan boleh dimodulasi oleh rawatan seperti TRF dan BHA. Oleh kerana glutamate dehydrogenase memainkan peranan penting dalam menyalurkan metabolit ke dalam kitaran asid trikarboksilik, perubahan ekspresinya berpotensi mempengaruhi metabolisme tenaga sel hepar serta perkembangan sel tumor.

Seterusnya, protein tekanan-70 (GRP75) pula merupakan protein yang berperanan dalam mengekalkan fungsi mitokondria dan menstabilkan protein yang salah lipat ketika tekanan selular. Protein ini diekspresikan lebih tinggi apabila sel mengalami tekanan oksidatif dan ketika pembentukan tumor (Starenki et al. 2019). Selaras dengan itu, dapatan kajian ini menunjukkan kehadiran bintik protein yang tinggi

dalam kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan, yang mengindikasikan tindak balas pertahanan sel terhadap tekanan yang berlaku akibat pembentukan tumor. Ini membuktikan bahawa lebih banyak protein GRP75 diperlukan untuk mengekalkan homeostasis protein dan fungsi mitokondria.

Bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF (250 mg/kg dan 500 mg/kg) memperlihatkan bintik protein yang rendah berbanding kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan. Hasil ini menunjukkan bahawa dos TRF yang tinggi mungkin melindungi sel daripada tekanan mitokondria dan tekanan protein melalui sifat antioksidan atau pengawalan mekanisme apoptosis, lalu mengurangkan pengekspresan protein GRP75. Manakala bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF 125 mg/kg dan kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA 100 mg/kg pula menunjukkan ekspresi bintik protein yang rendah, membuktikan bahawa dos TRF yang rendah dan BHA memberikan kesan perlindungan yang sederhana kerana dapat mengurangkan sedikit tekanan pada sel berbanding kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan. Corak dapatan kajian ini, mencerminkan potensi perlindungan hepatoprotektif TRF terhadap tekanan mitokondria dan tekanan protein ketika berada didalam hepatokarsinogenesis.

S-adenosilmetionina (METK1) ialah protein yang terlibat dalam proses metilasi DNA bagi mengekalkan kestabilan genetik sel. Molekul ini juga merupakan penderma kumpulan metil utama dalam sel yang berperanan penting dalam proses metilasi DNA, pengawalan ekspresi gen, metabolisme lipid serta perlindungan terhadap tekanan oksidatif (Ouyang et al. 2020). Berdasarkan hasil kajian ini, kumpulan kawalan dan TRF kawalan menunjukkan ekspresi bintik protein yang agak pekat dalam keadaan fisiologi normal. Dapatan ini menunjukkan bahawa metabolisme metionina dan S-adenosilmetionina berada dalam keadaan seimbang dalam hepar yang sihat. Bagi kumpulan TRF kawalan pula membuktikan bahawa TRF tidak mengganggu sistem metabolisme metionina apabila berada dalam keadaan normal.

Hasil bintik protein bagi kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan menunjukkan bintik protein yang lebih besar dan pekat yang membuktikan peningkatan ekspresi METK1 dalam keadaan karsinogenesis. Ini berkemungkinan disebabkan oleh tindak

balas terhadap perubahan tekanan oksidatif. Dapatan kajian ini selari dengan kajian terdahulu yang merekodkan pengekspresan protein METK1 yang berlebihan dalam tisu tumor pesakit, menunjukkan perubahan metabolisme metionina semasa perkembangan tumor (An et al. 2018).

Namun begitu bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + TRF, bintik protein yang terhasil adalah lebih cair pada dos 125 mg/kg, berpotensi mengurangkan sedikit ekspresi protein tersebut. Perkara ini mencadangkan bahawa TRF mungkin membantu memodulasi metabolisme metionina dan proses metilasi selular ketika perkembangan hepatokarsinogenesis. Dapatan ini selari dengan kajian terdahulu yang mengatakan bahawa suplemen TRF dapat mempengaruhi metabolisme metionina dan mengurangkan tekanan oksidatif hepar (Kamisah et al. 2015).

Walaupun bagaimanapun, tiada pengekspresan protein METK1 diperhatikan dalam kumpulan rawatan TRF dos (250 mg/kg dan 500 mg/kg) serta kumpulan rawatan BHA. Ketiadaan ekspresi protein berkemungkinan menunjukkan bahawa rawatan tersebut memberi kesan yang lebih kuat terhadap laluan metabolisme metionina sehingga merencat penghasilan enzim METK1. Keadaan ini mungkin berkait dengan perubahan metabolik yang lebih ketara dalam sel hepar yang dirawat dengan TRF dan BHA termasuk pengurangan aktiviti tapak jalan metilasi atau metabolisme sel terhadap tekanan oksidatif yang berbeza.

Kesimpulannya, hasil kajian ini menunjukkan bahawa ekspresi METK1 tinggi dalam keadaan hepatokarsinogenesis, manakala rawatan TRF pada dos 125 mg/kg mengurangkan sedikit ekspresi protein tersebut dan dos TRF yang lebih tinggi serta rawatan BHA menunjukkan ketiadaan ekspresi protein. Keputusan ini mencadangkan bahawa rawatan tersebut berpotensi mempengaruhi metabolisme metionina dan laluan metilasi selular dalam perkembangan hepatokarsinogenesis.

Protein argininosuksinat sintase (ASSY) merupakan enzim utama dalam kitaran urea yang berfungsi dalam penukaran sitrulin kepada argininosuksinat semasa biosintesis arginin. Protein ini penting untuk mengekalkan homeostasis nitrogen dan metabolisme asid amino dalam hepatosit. Hasil kajian ini mendapati ekspresi protein

ASSY yang tinggi dan pekat dalam kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan. Penemuan ini mencadangkan, berlakunya peningkatan metabolisme arginin ketika hepatokarsinogenesis. Peningkatan ekspresi ASSY mencerminkan keperluan metabolik sel hepatokarsinogenesis yang meningkat, untuk menyokong proliferasi sel dan penghasilan molekul bioaktif seperti nitrik oksida selaras dengan dapatan kajian terdahulu (Kim et al. 2025).

Sebaliknya, bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis yang menerima TRF pada dos 125 mg/kg dan kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA menunjukkan bintik protein ASSY yang kurang, menandakan tahap ekspresi yang lebih rendah berbanding kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan. Penurunan ekspresi ini mencadangkan bahawa rawatan TRF mungkin sudah mula mempengaruhi metabolisme arginin dalam sel hepar yang mengalami perubahan karsinogenik. Seterusnya. Tiada pengekspresan protein ASSY dikesan dalam kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis yang menerima TRF pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg. Ketiadaan bintik protein menunjukkan bahawa TRF pada dos yang tinggi berpotensi merencat ekspresi ASSY dengan lebih ketara. Perencatan enzim ini, mengurangkan penghasilan arginin, iaitu substrat yang diperlukan untuk menghasilkan molekul bioaktif seperti nitrik oksida lalu mengurangkan proliferasi sel hepatokarsinogenesis.

Secara keseluruhannya, hasil kajian ini menunjukkan bahawa ekspresi ASSY berkait rapat dengan perubahan metabolisme arginin semasa perkembangan hepatokarsinogenesis, dan pengawalan ekspresi enzim oleh TRF berkemungkinan menyumbang kepada kesan antikarsinogenik melalui gangguan terhadap keperluan metabolik sel tumor.

Adenosin kinase (ADK) berperanan dalam menukarkan adenosin kepada adenosine monofosfat (AMP), sekaligus mengekalkan kepekatan adenosin intraselular dan keseimbangan tenaga sel. Berdasarkan kajian ini, ekspresi ADK dikesan dalam kumpulan kawalan dan TRF kawalan mencerminkan peranan enzim ini dalam mengekalkan homeostasis metabolik sel (Zhang et al. 2024). Namun, kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan pula menunjukkan saiz bintik protein yang lebih besar berbanding kumpulan kawalan. Ini menunjukkan bahawa ADK diekspreskan pada

tahap tinggi dalam kumpulan tersebut, mungkin sebagai mekanisme untuk melawan pembentukan dan perkembangan hepar yang diaruh dengan karsinogen, sejajar dengan laporan terdahulu yang menunjukkan peningkatan ekspresi ADK dalam tisu tumor lain seperti kanser payudara dan glioma manusia (Huang et al. 2015; Shamloo et al. 2019).

Walaubagaimanapun, kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis yang diberi TRF dengan dos 125 mg/kg menunjukkan penurunan ekspresi bintik protein ADK berbanding kumpulan kawalan hepatokarsinogenesis. Penurunan ekspresi protein ini berkemungkinan menggambarkan kesan modulasi TRF terhadap metabolisme nukleosida dan homeostasis tenaga dalam sel hepar yang mengalami perubahan neoplastik. Kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis yang menerima TRF pada dos lebih tinggi (250 mg/kg dan 500 mg/kg) serta kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis dengan BHA menunjukkan tiada pengekspresan protein ADK. Hasil ini mungkin menunjukkan bahawa dos TRF yang lebih tinggi dan BHA mampu merencat ekspresi protein ADK dengan lebih jelas. Keputusan ini mencadangkan bahawa TRF berpotensi dalam mengubah laluan metabolisme adenosin yang berkait rapat dengan sel hepar yang terdedah kepada karsinogen. Oleh itu, TRF berpotensi berfungsi sebagai agen kemoprevensi, bagi membantu mengurangkan risiko perkembangan kanser hepar.

Ornitin karbamoiltransferase (OTC) berperanan penting dalam mengawal kitaran urea dengan menukarkan ornitin dan karbamoil fosfat kepada citrulin. Fungsi ini membantu menyingkirkan ammonia yang toksik serta mengekalkan homeostasis metabolisme nitrogen dalam sel hepar, sekaligus memastikan kestabilan fungsi selular (Couchet et al. 2021). Berdasarkan hasil kajian ini, pengekspresan OTC menunjukkan perbezaan yang ketara antara kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan dan kumpulan kawalan. Kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan memperlihatkan pengekspresan protein yang lebih tinggi berbanding kumpulan kawalan, yang mungkin mencerminkan peningkatan keperluan metabolik dalam sel hepar yang mengalami perubahan karsinogenik.

Pengekspresan OTC menurun pada kumpulan rawatan yang diberi TRF dengan dos 125 mg/kg berbanding kumpulan kawalan hepatokarsinogenesis, manakala kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis untuk dos yang lebih tinggi (250 mg/kg dan

500 mg/kg) serta kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis + BHA, ekspresi OTC tidak dapat dikesan. Pengekspresan OTC yang rendah dalam kumpulan rawatan TRF berbanding kumpulan hepatokarsinogenesis kawalan, berkemungkinan disebabkan oleh kesan TRF dalam membaiki fungsi sel pra-kanser melalui pengaktifan apoptosis. Penurunan ekspresi OTC ini mencadangkan bahawa TRF mungkin menyumbang kepada pengurangan keperluan metabolik sel kanser atau perubahan dalam laluan metabolik yang berkaitan dengan kelangsungan hidup sel.

Subunit alfa protein flavin pemindah elektron (ETF_A) terletak di dalam mitokondria. Protein ini berperanan sebagai pembawa elektron dalam proses metabolisme tenaga sel, terutama dalam laluan β -oksidasi asid lemak dan penghasilan ATP melalui respirasi mitokondria (Park et al. 2021). Oleh itu, peningkatan ekspresi ETF_A sering dikaitkan dengan peningkatan keperluan tenaga sel yang mengalami proliferasi aktif.

Berdasarkan kajian ini, kumpulan kawalan hepatokarsinogenesis menunjukkan ekspresi bintik protein ETF_A yang tinggi. Hasil ini mencadangkan bahawa sel hepar yang diaruh dengan karsinogen mungkin mengalami peningkatan aktiviti metabolisme tenaga, sel pre-kanser memerlukan ATP untuk proliferasi yang pesat selari dengan laporan kajian terdahulu bahawa ETF_A menyokong proliferasi dan pertumbuhan tumor hepatoselular karsinoma (HCC) (Guo et al. 2024). Sebaliknya bagi kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis dengan TRF pada dos 125 mg/kg menunjukkan penurunan ekspresi ETF_A, menunjukkan bahawa rawatan TRF mungkin sudah mula mempengaruhi laluan metabolisme tenaga dalam sel hepar yang telah diaruh dengan karsinogen. Penurunan ekspresi ini berkemungkinan menunjukkan bahawa TRF berpotensi mengurangkan keperluan metabolik, sekali gus mengganggu proses proliferasi yang tidak terkawal.

Seterusnya, tiada pengekspresan ETF_A dikesan dalam kumpulan rawatan hepatokarsinogenesis pada dos yang lebih tinggi (250 mg/kg dan 500 mg/kg) serta BHA. Ketiadaan ekspresi ini mungkin disebabkan oleh dos TRF yang lebih tinggi dan BHA mungkin menunjukkan gangguan dalam laluan metabolisme tenaga sel. Penurunan ekspresi ETF_A ini berkemungkinan mengurangkan kapasiti sel untuk

menghasilkan ATP melalui β -oksidasi asid lemak, sekaligus melambatkan proliferasi sel kanser. Keadaan ini menyokong potensi kesan kemoprevensi TRF, yang mungkin bertindak melalui modulasi metabolisme mitokondria dan pengurangan penghasilan tenaga dalam sel hepar yang telah diaruh dengan karsinogen.

Protein-protein yang dikenalpasti ini berpotensi sebagai agen antikanser melalui beberapa mekanisma biologi yang kompleks. Protein-protein ini berkemungkinan dapat menghalang proses proliferasi sel kanser dan mengganggu isyarat tapak jalan yang terlibat dalam pembahagian sel. Justeru itu, kajian lanjut perlu dijalankan dengan lebih mendalam mengenai mekanisme aktiviti protein ini serta potensi terapeutik dalam rawatan kanser.

5.6 ANALISIS PROTEIN-PROTEIN INTERAKSI

Berdasarkan analisis protein-protein interaksi menggunakan pengkalan data STRING menunjukkan 8 protein yang telah dikenal pasti membentuk satu rangkaian interaksi yang saling berkait. Rangkaian ini menunjukkan beberapa protein berinteraksi secara langsung atau tidak langsung, menandakan bahawa protein-protein tersebut mungkin terlibat dalam pelbagai laluan metabolik yang berkaitan. Secara khususnya, hasil kajian ini menunjukkan bahawa interaksi protein-protein tersebut berkaitan dengan metabolisme asid amino, fungsi mitokondria dan kitar urea, yang mencerminkan pengaturan semula proses metabolik yang penting dalam pemulihan selular.

Dalam rangkaian tersebut, glutamat dehidrogenase 1 (GLUD1) bertindak sebagai pusat protein yang mempunyai beberapa sambungan dengan protein lain seperti aldehid dehidrogenase (ALDH2), adenosin kinase (ADK), argininosuksinat sintase (ASS1), S-adenosilmetionina (Mat2a) dan ornitin karbamoiltransferase (OTC). Jalinan interaksi yang tinggi dan kuat menunjukkan bahawa GLUD1 mungkin berperanan penting dalam pengawalan metabolisme asid amino dan penghasilan tenaga dalam sel. GLUD1 diketahui terlibat dalam metabolisme glutamat yang berkait rapat dengan metabolisme nitrogen dan kitaran urea (Luczkowska et al. 2024).

Selain itu, ASS1 dan OTC juga menunjukkan jalinan interaksi yang kuat antara satu sama lain serta dengan protein lain yang terdapat dalam rangkaian. Kedua-dua

protein ini merupakan enzim utama dalam kitaran urea yang berfungsi menyingkirkan ammonia toksik daripada sel dengan menukarkannya kepada urea (Cholico et al. 2024). Kehadiran interaksi ini mencadangkan bahawa sebahagian daripada protein yang dikenal pasti mungkin terlibat dalam pengawalan metabolisme nitrogen.

Di samping itu, gen ETFA dan gen protein tekanan-70 (HSP90) menunjukkan interaksi protein yang lebih sedikit berbanding protein lain dalam rangkaian, tetapi masih mempunyai hubungan tidak langsung melalui protein perantara ALDH2. ETFA diketahui memainkan peranan dalam pemindahan elektron dalam mitokondria semasa metabolisme asid lemak, manakala HSPA9 merupakan protein chaperone yang terlibat dalam lipatan protein dan fungsi mitokondria (Havalová et al. 2021; Henriques et al. 2021).

Protein ALDH2 pula menunjukkan interaksi dengan beberapa protein lain dalam rangkaian, mencadangkan peranannya dalam proses metabolisme aldehyd dan detoksifikasi sel. Fungsi ini penting dalam melindungi sel daripada tekanan oksidatif dan kerosakan metabolik serta menunjukkan bahawa protein-protein yang terlibat berkemungkinan berkongsi laluan metabolisme yang sama atau saling mempengaruhi dalam proses metabolik sel (Gao et al. 2022).

Berdasarkan analisis pengayaan proses biologi (ontologi gen), beberapa proses metabolik telah dikenal pasti dalam rangkaian protein ini. Antara proses yang menunjukkan tahap pengayaan tertinggi ialah proses biosintesis asid amino keluarga glutamin, biosintesis arginin, dan metabolisme sitrulin yang berkait rapat dengan kitaran urea. Protein seperti ASS1 dan OTC merupakan enzim yang penting dalam kitaran urea, menunjukkan interaksi yang kuat antara satu sama lain dan dengan protein lain dalam rangkaian, mencerminkan penyelarasan fungsi dalam penukaran ammonia kepada urea yang kurang toksik. Selain itu, penglibatan protein lain yang berkaitan dengan metabolisme asid amino turut menyumbang kepada pengayaan yang tinggi, memandangkan laluan-laluan ini saling berkait dan berkongsi perantara metabolik seperti glutamat dan sitrulin. Dapatan ini mencadangkan bahawa pengayaan yang diperhatikan menggambarkan kebergantungan fungsi antara protein dalam rangkaian tersebut. Interaksi yang kuat antara protein yang terlibat dalam kitaran urea dan

metabolisme asid amino menunjukkan kewujudan modul fungsi khusus yang berperanan dalam detoksifikasi ammonia dan pengawalan keseimbangan metabolik sel hepar.

Analisis ini juga menunjukkan penglibatan protein dalam metabolisme asid amino selular serta katabolisme asid amino. Tahap pengayaan yang diperhatikan berkemungkinan disebabkan oleh kehadiran beberapa protein yang terlibat secara langsung dalam rangkaian laluan degradasi dan penggunaan asid amino sebagai sumber tenaga dan prekursor metabolik. Interaksi yang wujud antara protein-protein ini mencadangkan bahawa protein-protein tersebut berfungsi secara bersepadu dalam menyokong keperluan metabolik sel, terutamanya melalui penghasilan perantara penting seperti α -ketoglutarat yang memasuki kitaran TCA untuk penjana tenaga. Selain itu, proses katabolisme asid amino juga menyumbang kepada penyediaan substrat bagi biosintesis makromolekul yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pembahagian sel. Dalam konteks hepatokarsinogenesis, pengayaan dalam laluan ini mencerminkan penyesuaian metabolik sel kanser, di mana peningkatan metabolisme asid amino berlaku untuk memenuhi keperluan tenaga dan biosintetik yang tinggi (Pavlova et al. 2016). Oleh itu, dapatan ini menunjukkan bahawa protein-protein dalam rangkaian bukan sahaja saling berinteraksi, tetapi turut membentuk modul fungsi yang menyokong pemrograman semula metabolik dalam sel hepar.

Bagi analisis komponen selular pula menunjukkan kebanyakan protein yang dikenal pasti terletak dalam matriks mitokondria dan mitokondria. Kehadiran protein yang signifikan didalam mitokondria mencerminkan kepentingan mitokondria sebagai pusat metabolisme sel, di mana pelbagai laluan biokimia utama berlaku. Tambahan pula, protein yang terdapat dalam matriks mitokondria pula menunjukkan penglibatan dalam pengawalan homeostasis metabolik, pengendalian radikal bebas, dan sintesis prekursor metabolik yang penting untuk biosintesis makromolekul. Dalam hepatokarsinogenesis, perubahan fungsi atau ekspresi protein mitokondria boleh mengganggu metabolisme tenaga sel dan keseimbangan redoks, serta menyokong proliferasi sel kanser (Lee et al. 2021). Justeru, pengayaan protein dalam komponen mitokondria bukan sahaja menunjukkan peranan dalam metabolisme asas, tetapi juga menekankan kepentingannya dalam proses patofisiologi seperti kanser hepar.

Dari segi fungsi molekul, protein-protein tersebut terlibat dalam pelbagai aktiviti seperti pengikatan asid amino, pengikatan anion, pengikatan molekul kecil, pengikatan nukleotida, pengikatan ATP serta aktiviti katalitik. Fungsi-fungsi ini memberi indikasi bahawa protein-protein tersebut berperanan sebagai enzim metabolik yang membolehkan tindak balas biokimia untuk mengekalkan homeostasis sel. Pengikatan ATP dan nukleotida menunjukkan penglibatan protein tersebut dalam penghasilan tenaga serta pengawalan laluan metabolik, termasuk kitaran metabolisme utama seperti kitaran TCA, pengoksidaan asid lemak, dan biosintesis prekursor metabolik. Tokotrienol boleh mengganggu penghasilan ATP melalui kegagalan fungsi mitokondria, menyebabkan tekanan tenaga yang akhirnya membawa kepada apoptosis (Raimondi et al. 2021). Hasil kajian ini menekankan protein-protein ini bukan sahaja berperanan dalam metabolisme asas, tetapi turut menyokong penyesuaian metabolik sel, yang penting dalam konteks proliferasi dan pertumbuhan sel, termasuk hepatokarsinogenesis.

Selari dengan hasil kajian analisis ontologi gen, analisis tapak jalan KEGG turut menunjukkan bahawa protein-protein yang dikenal pasti terlibat dalam beberapa laluan metabolik utama seperti biosintesis arginin, biosintesis asid amino, serta metabolisme alanin, aspartat dan glutamat. Penglibatan dalam tapak jalan ini mengukuhkan lagi fungsi-fungsi protein dalam metabolisme nitrogen, kerana tapak jalan ini saling berhubung dan berkongsi perantara metabolik yang sama. Sebagai contoh, glutamat bertindak sebagai molekul pusat dalam pemindahan kumpulan amino, manakala aspartat terlibat dalam pembentukan arginin melalui kitaran urea (Fung et al. 2025; Stolarz et al. 2025).

Selain itu, protein seperti GLUD1, ASS1 dan OTC dalam tapak jalan KEGG menunjukkan interaksi protein yang mempunyai fungsi penting dalam rangkaian metabolik. Tapak jalan ini juga menyumbang kepada penghasilan metabolit utama, termasuk prekursor bagi nukleotida dan molekul lain yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pembahagian sel (Zhao et al. 2024). Dalam hepatokarsinogenesis, tapak jalan asid amino mencerminkan strategi sel untuk penyesuaian metabolik, dengan menggunakan asid amino sebagai sumber tenaga bagi menyokong proliferasi sel (Zhou et al. 2026).

Kesimpulannya, hasil analisis ini menunjukkan bahawa protein-protein yang dikenal pasti kebanyakannya terlibat dalam rangkaian metabolisme asid amino, tenaga, serta kitaran urea yang berlaku dalam mitokondria. Perubahan ekspresi protein-protein ini berkemungkinan memberi kesan kepada keseimbangan metabolik sel hepar dan seterusnya menyumbang kepada proses hepatokarsinogenesis. Oleh itu, protein-protein ini berpotensi menjadi biomarker dalam mekanisme perkembangan hepatokarsinogenesis serta kesan rawatan TRF sebagai kemopreventif.



BAB VI

KESIMPULAN DAN CADANGAN

6.1 KESIMPULAN KAJIAN

Rawatan TRF berupaya mengawal pengekspresan protein global dalam hepar tikus yang diaruh dengan karsinogenesis secara kebergantungan dos. Hasil perubahan profil yang diperhatikan dalam kajian ini mencerminkan TRF memberikan kesan yang signifikan terhadap pelbagai proses biologi penting yang terlibat dalam proses hepatokarsinogenesis.

Hasil analisis proteomik telah mengenal pasti beberapa protein utama seperti ASSY, DHE3 dan OTC yang menunjukkan perubahan ketara selepas pengaruh karsinogen. Protein-protein ini terlibat secara langsung dalam metabolisme asid amino dan kitar urea, yang berperanan penting dalam mengekalkan homeostasis nitrogen dan menyokong keperluan biosintesis sel. Rawatan dengan TRF didapati memodulasi semula ekspresi protein-protein ini dengan corak yang berbeza mengikut dos, membuktikan bahawa TRF berpotensi dalam memulihkan gangguan metabolik yang berlaku ketika karsinogenesis hepar.

Analisis tapak jalan pula menunjukkan bahawa protein-protein yang telah dikenal pasti terlibat dalam metabolik utama seperti metabolisme asid amino, biosintesis arginin, dan kitar urea. Interaksi antara protein ASSY, DHE3 dan OTC dalam rangkaian ini mencadangkan wujudkan hubungan kefungsiian yang signifikan dalam menyokong keperluan metabolik dan proliferasi sel hepatokarsinogenesis. Pengawasan tapak jalan- tapak jalan ini oleh TRF menunjukkan bahawa TRF berpotensi untuk

mengganggu dalam rangkaian metabolik yang penting dalam perkembangan sel prakanser hepar.

Seterusnya, perubahan pengekspresan protein yang dikawal atur oleh Nrf2 serta protein lain yang dikawal atur oleh faktor transkripsi lain menunjukkan bahawa TRF turut mempengaruhi mekanisme pengawalan gen dan sistem pertahanan antioksidan sel. Profil pengekspresan yang bergantung kepada dos menunjukkan bahawa TRF berupaya untuk mengawal tekanan oksidatif dalam sel hepar melalui pengaktifan atau perencatan laluan tertentu, yang menyumbang kepada kestabilan persekitaran intraselular semasa karsinogenesis.

Kesimpulannya, hasil kajian ini mengukuhkan lagi bukti bahawa TRF berpotensi sebagai agen pengawalan dalam karsinogenesis hepar melalui kesannya terhadap pengekspresan protein global, rangkaian metabolik dan mekanisme pengawalan transkripsi secara kebergantungan dos. Kajian ini bukan sahaja memperkukuh pemahaman terhadap fungsi TRF dalam biologi kanser hepar, malah berpotensi sebagai strategi terapeutik berasaskan sebatian semula jadi yang lebih berkesan pada masa hadapan.

6.2 KETERBATASAN KAJIAN

Terdapat beberapa keterbatasan kajian dalam kajian ini antaranya ialah kepekaan teknik 2D-gel elektroforesis terhadap jumlah protein yang rendah terutama pada protein yang diekspresikan pada jumlah yang sangat rendah. Dalam kajian ini terdapat beberapa protein yang tidak dapat dikesan dengan jelas disebabkan oleh kandungan protein yang tidak mencukupi, menyebabkan kekurangan maklumat penting tentang ekspresi protein yang terlibat dalam mekanisme penyakit atau rawatan.

Selain itu, pemisahan bintik protein yang tidak jelas dan bertindih, terutamanya bagi protein yang mempunyai saiz molekul atau titik isoelektrik yang hampir sama. Perkara ini menyukarkan analisis kuantitatif serta perbandingan ekspresi protein antara sampel. Ketidaksempurnaan dalam pemisahan protein menyebabkan kesukaran dalam mengenal pasti protein dengan tepat, yang memberi kesan terhadap kesahihan hasil kajian.

Penggunaan teknik MALDI-TOF dalam identifikasi protein juga terbatas terutama dari segi kepekaan terhadap protein dengan berat molekul kecil atau rendah. MALDI-TOF mungkin kurang sensitif terhadap protein yang tidak mengalami pemecahan peptida atau pengionan yang rendah menyebabkan beberapa protein tidak dapat dikenalpasti dengan tepat.

6.3 CADANGAN KAJIAN

Berdasarkan kajian yang telah dilakukan, terdapat beberapa kajian lanjutan yang dicadangkan bagi menyokong dan mendalami hasil kajian ini. Pertama, penggunaan strip dengan julat pH yang lebih luas dalam isoelektrik dapat meningkatkan pemisahan protein lebih optimum. Dengan julat pH yang lebih besar, protein mempunyai titik isoelektrik (pI) berbeza dapat dipisahkan dengan lebih jelas. Perkara ini dapat mengurangkan masalah pertindihan bintik protein dalam analisis 2D-gel elektroforesis. Penggunaan strip yang lebih panjang juga memberikan resolusi pemisahan yang lebih tinggi, membolehkan pengesanan protein pada kepekatan yang rendah dengan lebih efektif.

Seterusnya, gabungan dengan kaedah yang lebih sensitif dan spesifik seperti kromatografi cecair spektrometri jisim (LC-MS) bagi meningkatkan ketepatan analisis protein yang berkaitan dengan mekanisme rawatan tokotrienol terhadap sel kanser. Penggunaan LC-MS disarankan kerana ia lebih sensitif dalam mengenalpasti protein yang gagal dikesan melalui kaedah MALDI-TOF.

Selain digunakan untuk mengenal pasti protein, LC-MS juga boleh menentukan perubahan ekspresi protein secara kuantitatif, mengenal pasti modifikasi pasca-translasi yang mungkin terjejas akibat rawatan, serta meneroka perubahan dalam profil metabolik yang berkaitan dengan kegagalan fungsi mitokondria dan apoptosis. Maklumat ini amat penting untuk memahami bagaimana tokotrienol mempengaruhi laluan molekul yang menyumbang kepada kesan terapeutiknya dalam rawatan kanser.

RUJUKAN

- Abdul Rahman Sazli, F., Jubri, Z., Abdul Rahman, M., Karsani, S. A., Md Top, A. G. & Wan Ngah, W. Z. 2015. Gamma-tocotrienol treatment increased peroxiredoxin-4 expression in HepG2 liver cancer cell line. *BMC complementary and alternative medicine* 15(1): 64.
- Abdullah, A., Atia, A. & Alrawaiq, N. S. 2017. Liver heme oxygenase-1 expression is positively induced by palm oil-derived tocotrienol-rich fraction (TRF) supplementation in mice. *Pharmacology* 21(
- Abdullah, A., Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Goldring, C., Higgins, L., Yamamoto, M., Hayes, J. & Park, B. K. 2012. Analysis of the role of Nrf2 in the expression of liver proteins in mice using two-dimensional gel-based proteomics. *Pharmacological reports* 64(3): 680-697.
- Abu-Fayyad, A. & Nazzal, S. 2017. Extraction of vitamin E isomers from palm oil: methodology, characterization, and in vitro anti-tumor activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 94(1209-1217).
- Aggarwal, V., Kashyap, D., Sak, K., Tuli, H. S., Jain, A., Chaudhary, A., Garg, V. K., Sethi, G. & Yerer, M. B. 2019. Molecular mechanisms of action of tocotrienols in cancer: Recent trends and advancements. *International journal of molecular sciences* 20(3): 656.
- Agostini, M., Traldi, P. & Hamdan, M. 2023. Mass Spectrometry Contribution to Pediatric Cancers Research. *Medicina (Kaunas)* 59(3):
- Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J. & Siddiqui, W. A. 2014. Pharmacological potential of tocotrienols: a review. *Nutrition & metabolism* 11(1-22).
- Al-Baiaty, F. D. R., Ismail, A., Abdul Latiff, Z., Muhammad Nawawi, K. N., Raja Ali, R. A. & Mokhtar, N. M. 2021. Possible Hepatoprotective Effect of Tocotrienol-Rich Fraction Vitamin E in Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *Front Pediatr* 9(667247).
- Amin, N., Anwar, J., Sulaiman, A., Naumova, N. N. & Anwar, N. 2025. Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review. *Diseases* 13(7): 207.
- An, J., Na, S. K., Shim, J. H., Park, Y. S., Jun, M. J., Lee, J. H., Song, G. W., Lee, H. C. & Yu, E. 2018. Histological expression of methionine adenosyl transferase (MAT) 2A as a post-surgical prognostic surrogate in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 117(5): 892-901.
- Ansar, S. & Iqbal, M. 2016. Antioxidant and nephroprotective potential of butylated hydroxyanisole against ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and early tumor events. *Human & experimental toxicology* 35(4): 448-453.
- Aravalli, R. N., Steer, C. J., Aravalli, R. N. & Steer, C. J. 2014. Pathophysiology of HCC. *Hepatocellular Carcinoma: Cellular and Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Strategies* 15-32.
- Arul, D. & Subramanian, P. 2013. Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434(2): 203-209.
- Atia, A., Alrawaiq, N. & Abdullah, A. 2016. Tocotrienol-rich Palm Oil Extract Induces NAD (P) H: quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) Expression in Mice Liver. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 6(8): 127-134.

- Atia, A., Alrawaiq, N. S. & Abdullah, A. 2018. The effect of tocotrienol-rich fraction on the expression of glutathione S-transferase isoenzymes in mice liver. *Sains Malaysiana* 47(11): 2799-2809.
- Atia, A., Alrawaiq, N. S. & Abdullah, A. 2021. Tocotrienols activate Nrf2 nuclear translocation and increase the antioxidant-related hepatoprotective mechanism in mice liver. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 22(8): 1085-1098.
- Azman Abdullah, A. A., Ahmed Atia, A. A. & Nadia Salem Alrawaiq, N. S. A. 2017. Liver heme oxygenase-1 expression is positively induced by palm oil-derived tocotrienol-rich fraction (TRF) supplementation in mice.
- Bartolini, D., Marinelli, R., Stabile, A. M., Frammartino, T., Guerrini, A., Garetto, S., Lucci, J., Migni, A., Zatini, L., Marcantonini, G., Rende, M. & Galli, F. 2022. Wheat germ oil vitamin E cytoprotective effect and its nutrigenomics signature in human hepatocyte lipotoxicity. *Heliyon* 8(9): e10748.
- Berasain, C., Arechederra, M., Argemí, J., Fernández-Barrena, M. G. & Avila, M. A. 2023. Loss of liver function in chronic liver disease: An identity crisis. *Journal of hepatology* 78(2): 401-414.
- Browne, D., Mcguinness, B., Woodside, J. V. & Mckay, G. J. 2019. Vitamin E and Alzheimer's disease: what do we know so far? *Clin Interv Aging* 14(1303-1317).
- Bruno Pisani, G., Valenti, J. L. & Beatriz Quintana, A. 2016. Hepatic preneoplasia induction in male Wistar rats: histological studies up to five months post treatment. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 108(8): 437-463.
- Carneiro, B. A. & El-Deiry, W. S. 2020. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology* 17(7): 395-417.
- Castro-Gil, M. P., Sánchez-Rodríguez, R., Torres-Mena, J. E., López-Torres, C. D., Quintanar-Jurado, V., Gabiño-López, N. B., Villa-Treviño, S., Del-Pozo-Jauner, L., Arellanes-Robledo, J. & Pérez-Carreón, J. I. 2021. Enrichment of progenitor cells by 2-acetylaminofluorene accelerates liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in vivo. *Molecular carcinogenesis* 60(6): 377-390.
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B. & Sarkar, D. 2021. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Advances in cancer research* 149(1-61).
- Chin, K.-Y., Pang, K.-L. & Soelaiman, I.-N. 2016. Tocotrienol and its role in chronic diseases. *Anti-inflammatory nutraceuticals and chronic diseases* 97-130.
- Cholico, G. N., Fling, R. R., Sink, W. J., Nault, R. & Zacharewski, T. 2024. Inhibition of the urea cycle by the environmental contaminant 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases serum ammonia levels in mice. *Journal of Biological Chemistry* 300(1):
- Couchet, M., Breuillard, C., Corne, C., Rendu, J., Morio, B., Schlattner, U. & Moinard, C. 2021. Ornithine transcarbamylase—From structure to metabolism: an update. *Frontiers in physiology* 12(748249).
- Czauderna, C., Castven, D., Mahn, F. L. & Marquardt, J. U. 2019. Context-dependent role of NF- κ B signaling in primary liver cancer—from tumor development to therapeutic implications. *Cancers* 11(8): 1053.
- De Luján Alvarez, M., Cerliani, J. P., Monti, J., Carnovale, C., Ronco, M. T., Pisani, G., Lugano, M. C. & Carrillo, M. C. 2002. Their vivoapoptotic effect of interferon alfa-2b on rat preneoplastic liver involves Bax protein. *Hepatology* 35(4): 824-833.
- Deblasi, J. M. & Denicola, G. M. 2020. Dissecting the crosstalk between NRF2 signaling and metabolic processes in cancer. *Cancers* 12(10): 3023.

- Delanghe, T., Huyghe, J., Lee, S., Priem, D., Van Coillie, S., Gilbert, B., Choi, S. M., Vandenabeele, P., Degterev, A. & Cuny, G. D. 2021. Antioxidant and food additive BHA prevents TNF cytotoxicity by acting as a direct RIPK1 inhibitor. *Cell Death & Disease* 12(7): 699.
- Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. 2020. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental Biology and Medicine* 245(2): 96-108.
- Dibal, N. & Orendu, M. 2025. The pathophysiologic role of oxidative stress in mitotic cell division. *Biocell* 49(3): 419.
- Donnelly, J., Appathurai, A., Yeoh, H.-L., Driscoll, K. & Faisal, W. 2022. Vitamin E in cancer treatment: a review of clinical applications in randomized control trials. *Nutrients* 14(20): 4329.
- Duong, V. A. & Lee, H. 2023. Bottom-Up Proteomics: Advancements in Sample Preparation. *Int J Mol Sci* 24(6):
- Fontana, F., Marzagalli, M., Raimondi, M., Zuco, V., Zaffaroni, N. & Limonta, P. 2021. δ -Tocotrienol sensitizes and re-sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin via induction of G1 phase cell cycle arrest and ROS/MAPK-mediated apoptosis. *Cell proliferation* 54(11): e13111.
- Fung, T. S., Ryu, K. W. & Thompson, C. B. 2025. Arginine: at the crossroads of nitrogen metabolism. *The EMBO journal* 44(5): 1275-1293.
- Gao, J., Hao, Y., Piao, X. & Gu, X. 2022. Aldehyde dehydrogenase 2 as a therapeutic target in oxidative stress-related diseases: post-translational modifications deserve more attention. *International journal of molecular sciences* 23(5): 2682.
- Ghanem, P., Zouein, A., Mohamad, M., Hodroj, M. H., Haykal, T., Abou Najem, S., Naim, H. Y. & Rizk, S. 2019. The vitamin E derivative gamma tocotrienol promotes anti-tumor effects in acute myeloid leukemia cell lines. *Nutrients* 11(11): 2808.
- Goh, K. L., Razlan, H., Hartono, J. L., Qua, C. S., Yoong, B. K., Koh, P. S. & Abdullah, B. J. J. 2015. Liver cancer in Malaysia: Epidemiology and clinical presentation in a multiracial Asian population. *Journal of Digestive Diseases* 16(3): 152-158.
- Gugliandolo, A., Bramanti, P. & Mazzone, E. 2017. Role of vitamin E in the treatment of Alzheimer's disease: Evidence from animal models. *International journal of molecular sciences* 18(12): 2504.
- Guo, J., Gu, H., Yin, S., Yang, J., Wang, Q., Xu, W., Wang, Y., Zhang, S., Liu, X. & Xian, X. 2024. Hepatocyte-derived Igk promotes HCC progression by stabilizing electron transfer flavoprotein subunit α to facilitate fatty acid β -oxidation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 43(1): 280.
- Guo, L., Hu, C., Yao, M. & Han, G. 2023. Mechanism of sorafenib resistance associated with ferroptosis in HCC. *Front Pharmacol* 14(1207496).
- Hadi, H. E., Vettor, R. & Rossato, M. 2018. Vitamin E as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease: reality or myth? *Antioxidants* 7(1): 12.
- Havalová, H., Ondrovičová, G., Keresztesová, B., Bauer, J. A., Pevala, V., Kutejová, E. & Kunová, N. 2021. Mitochondrial HSP70 chaperone system—the influence of post-translational modifications and involvement in human diseases. *International journal of molecular sciences* 22(15): 8077.
- Henriques, B. J., Olsen, R. K. J., Gomes, C. M. & Bross, P. 2021. Electron transfer flavoprotein and its role in mitochondrial energy metabolism in health and disease. *Gene* 776(145407).

- Hong, M.-K., Liu, H.-H., Chen, G.-H., Zhu, J.-Q., Zheng, S.-Y., Zhao, D., Diao, J., Jia, H., Zhang, D.-D. & Chen, S.-X. 2021. Oridonin alters hepatic urea cycle via gut microbiota and protects against acetaminophen-induced liver injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021(1): 3259238.
- Huang, D. Q., El-Serag, H. B. & Loomba, R. 2021. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 18(4): 223-238.
- Huang, J., He, Y., Chen, M., Du, J., Li, G., Li, S., Liu, W. & Long, X. 2015. Adenosine deaminase and adenosine kinase expression in human glioma and their correlation with glioma-associated epilepsy. *Molecular Medicine Reports* 12(5): 6509-6516.
- Husain, K., Centeno, B. A., Coppola, D., Trevino, J., Sebti, S. M. & Malafa, M. P. 2017. δ -Tocotrienol, a natural form of vitamin E, inhibits pancreatic cancer stem-like cells and prevents pancreatic cancer metastasis. *Oncotarget* 8(19): 31554.
- Hyun, J., Han, J., Lee, C., Yoon, M. & Jung, Y. 2021. Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *International journal of molecular sciences* 22(11): 5717.
- Idriss, M., Hodroj, M. H., Fakhoury, R. & Rizk, S. 2020. Beta-tocotrienol exhibits more cytotoxic effects than gamma-tocotrienol on breast cancer cells by promoting apoptosis via a P53-independent PI3-kinase dependent pathway. *Biomolecules* 10(4): 577.
- Jayusman, P. A., Budin, S. B., Taib, I. S. & Ghazali, A. R. 2017. The effect of tocotrienol-rich fraction on oxidative liver damage induced by fenitrothion. *Sains Malaysiana* 46(9): 1603-1609.
- Jiang, Q. 2019. Natural forms of vitamin E and metabolites—regulation of cancer cell death and underlying mechanisms. *IUBMB life* 71(4): 495-506.
- Jorriin-Novo, J. V., Komatsu, S., Sanchez-Lucas, R. & De Francisco, L. E. R. 2019. Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics! *Journal of proteomics* 198(1-10).
- Kamisah, Y., Norsidah, K.-Z., Azizi, A., Faizah, O., Nonan, M. R. & Asmadi, A. Y. 2015. Palm tocotrienol-rich fraction inhibits methionine-induced cystathionine β -synthase in rat liver. *Journal of physiology and biochemistry* 71(4): 659-667.
- Kani, K., Momota, Y., Harada, M., Yamamura, Y., Aota, K., Yamanoi, T., Takano, H., Motegi, K. & Azuma, M. 2013. γ -tocotrienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF- κ B-regulated anti-apoptotic gene products. *International journal of oncology* 42(1): 75-82.
- Kim, J. S., Choi, W.-M., Kim, H.-I., Chung, S. W., Choi, J., Lee, D. & Kim, K. M. 2025. Synergistic effects of L-arginine and argininosuccinate synthetase 1 in inducing apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Liver Cancer* 25(1): 79-90.
- Kondo, T. 2019. Cancer biomarker development and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1867(1): 2-8.
- Krishna, M. 2013. Role of special stains in diagnostic liver pathology. *Clinical Liver Disease* 2(S8-S10).
- Lee, H.-Y., Nga, H. T., Tian, J. & Yi, H.-S. 2021. Mitochondrial metabolic signatures in hepatocellular carcinoma. *Cells* 10(8): 1901.

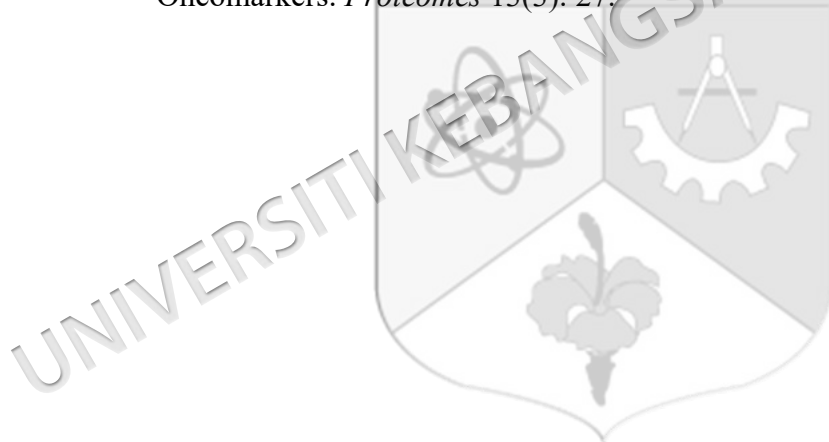
- Li, T. & Chiang, J. Y. 2014. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacological reviews* 66(4): 948-983.
- Lin, J. J., Huang, C. C., Su, Y. L., Luo, H. L., Lee, N. L., Sung, M. T. & Wu, Y. J. 2019. Proteomics Analysis of Tangeretin-Induced Apoptosis through Mitochondrial Dysfunction in Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 20(5):
- Liu, Y., Chen, Y. & Fukui, K. 2024. α -Tocotrienol Protects Neurons by Preventing Tau Hyperphosphorylation via Inhibiting Microtubule Affinity-Regulating Kinase Activation. *International journal of molecular sciences* 25(15): 8428.
- Lodu, W. & Karwur, F. F. 2019. Mode of action of tocotrienol as anticancer. *Journal of the Medical Sciences (Berkala ilmu Kedokteran)* 51(2): 164-180.
- Luczkowska, K., Zhou, Y., Ramos-Lobo, A. M., Brun, T. & Maechler, P. 2024. Dietary protein load affects the energy and nitrogen balance requiring liver glutamate dehydrogenase to maintain physical activity. *Journal of Biological Chemistry* 300(7):
- Ma, X., Luo, Q., Zhu, H., Liu, X., Dong, Z., Zhang, K., Zou, Y., Wu, J., Ge, J. & Sun, A. 2018. Aldehyde dehydrogenase 2 activation ameliorates CC 14-induced chronic liver fibrosis in mice by up-regulating Nrf2/HO-1 antioxidant pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* 22(8): 3965-3978.
- Magosso, E., Ansari, M. A., Gopalan, Y., Shuaib, I. L., Wong, J.-W., Khan, N. a. K., Abu Bakar, M. R., Ng, B.-H. & Yuen, K.-H. 2013. Tocotrienols for normalisation of hepatic echogenic response in nonalcoholic fatty liver: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Nutrition journal* 12(1-8).
- Malik, S., Bhatnagar, S., Chaudhary, N., Katare, D. P. & Jain, S. 2013. DEN+ 2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. *Protoplasma* 250(175-183).
- Marsico, M., Santarsiero, A., Pappalardo, I., Convertini, P., Chiummiento, L., Sardone, A., Di Noia, M. A., Infantino, V. & Todisco, S. 2021. Mitochondria-mediated apoptosis of HCC cells triggered by knockdown of glutamate dehydrogenase 1: perspective for its inhibition through quercetin and permethylated anigopreissin A. *Biomedicines* 9(11): 1664.
- Meleady, P. 2018. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. *Methods Mol Biol* 1664(3-14).
- Montagnani Marelli, M., Macchi, C., Ruscica, M., Sartori, P. & Moretti, R. M. 2024. Anticancer activity of delta-tocotrienol in human hepatocarcinoma: involvement of autophagy induction. *Cancers* 16(15): 2654.
- Montagnani Marelli, M., Marzagalli, M., Fontana, F., Raimondi, M., Moretti, R. M. & Limonta, P. 2019. Anticancer properties of tocotrienols: A review of cellular mechanisms and molecular targets. *Journal of cellular physiology* 234(2): 1147-1164.
- Mooli, R. G. R., Mukhi, D. & Ramakrishnan, S. K. 2022. Oxidative stress and redox signaling in the pathophysiology of liver diseases. *Comprehensive Physiology* 12(2): 3167.
- Nahon, P., Allaire, M., Nault, J.-C. & Paradis, V. 2020. Characterizing the mechanism behind the progression of NAFLD to hepatocellular carcinoma. *Hepatic oncology* 7(4): HEP36.
- Niki, E. & Abe, K. 2019. Vitamin E: Structure, properties and functions.
- Nissen, J. D., Pajęcka, K., Stridh, M. H., Skytt, D. M. & Waagepetersen, H. S. 2015. Dysfunctional TCA-cycle metabolism in glutamate dehydrogenase deficient astrocytes. *Glia* 63(12): 2313-2326.

- Ogunwobi, O. O., Harricharran, T., Huaman, J., Galuza, A., Odumuwagon, O., Tan, Y., Ma, G. X. & Nguyen, M. T. 2019. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World journal of gastroenterology* 25(19): 2279.
- Ouyang, Y., Wu, Q., Li, J., Sun, S. & Sun, S. 2020. S-adenosylmethionine: a metabolite critical to the regulation of autophagy. *Cell proliferation* 53(11): e12891.
- Ozougwu, J. C. 2017. Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences* 4(8): 13-24.
- Pang, K. L., Mai, C. W. & Chin, K. Y. 2023. Molecular Mechanism of Tocotrienol-Mediated Anticancer Properties: A Systematic Review of the Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response. *Nutrients* 15(8): 1-12.
- Park, K. H., Gooz, M., Ye, Z. W., Zhang, J., Beeson, G. C., Rockey, D. C. & Kim, S. H. 2021. Flavin adenine dinucleotide depletion caused by electron transfer flavoprotein subunit alpha haploinsufficiency leads to hepatic steatosis and injury in zebrafish. *Hepatology communications* 5(6): 976-991.
- Parker, C. G. & Pratt, M. R. 2020. Click Chemistry in Proteomic Investigations. *Cell* 180(4): 605-632.
- Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. 2016. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell metabolism* 23(1): 27-47.
- Pedrelli, V., Lauriola, M. & Pigatto, P. 2012. Clinical evaluation of photoprotective effect by a topical antioxidants combination (tocopherols and tocotrienols). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 26(11): 1449-1453.
- Pervez, M. A., Khan, D. A., Slehria, A. U. R. & Ijaz, A. 2020. Delta-tocotrienol supplementation improves biochemical markers of hepatocellular injury and steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, placebo-controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine* 52(102494): 1-10.
- Piñero, F., Dirchwolf, M. & Pessôa, M. G. 2020. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: diagnosis, prognosis and treatment response assessment. *Cells* 9(6): 1370.
- Qureshi, A. A. 2022. Tocotrienols: Exciting Biological and Pharmacological Properties of Tocotrienols and other Naturally Occurring Compounds, Part I. *Annals of clinical case reports* 7(1): 1-10.
- Qureshi, A. A., Khan, D. A., Silswal, N., Saleem, S. & Qureshi, N. 2016. Evaluation of pharmacokinetics, and bioavailability of higher doses of tocotrienols in healthy fed humans. *Journal of clinical & experimental cardiology* 7(4): 434.
- Qureshi, A. A., Khan, D. A., Silswal, N., Saleem, S. & Qureshi, N. 2016. Evaluation of pharmacokinetics, and bioavailability of higher doses of tocotrienols in healthy fed humans. *Journal of clinical & experimental cardiology* 7(4): 434.
- Raihan, R., Azzeri, A., Shabaruddin, F. H. & Mohamed, R. 2018. Hepatocellular carcinoma in Malaysia and its changing trend. *Euroasian journal of hepatogastroenterology* 8(1): 54.
- Raimondi, M., Fontana, F., Marzagalli, M., Audano, M., Beretta, G., Procacci, P., Sartori, P., Mitro, N. & Limonta, P. 2021. Ca²⁺ overload-and ROS-associated mitochondrial dysfunction contributes to δ -tocotrienol-mediated paraptosis in melanoma cells. *Apoptosis* 26(277-292): 277-292.
- Rajasinghe, L. D., Hutchings, M. & Gupta, S. V. 2019. Delta-tocotrienol modulates glutamine dependence by inhibiting ASCT2 and LAT1 transporters in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells: A metabolomic approach. *Metabolites* 9(3): 50.

- Ranasinghe, R., Mathai, M. & Zulli, A. 2022. Revisiting the therapeutic potential of tocotrienol. *Biofactors* 48(4): 813-856.
- Roehlen, N., Crouchet, E. & Baumert, T. F. 2020. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells* 9(4): 875.
- Rumgay, H., Arnold, M., Ferlay, J., Lesi, O., Cabasag, C. J., Vignat, J., Laversanne, M., McGlynn, K. A. & Soerjomataram, I. 2022. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *Journal of hepatology* 77(6): 1598-1606.
- Rusli, M. F., Yusof, K. M., Hasrin, N. a. M., Zulkefli, N., Mogaraja, R. A., Azlan, A. a. A., Fauzi, M. a. M., Atia, A., Kuan, W. S. & Kamisah, Y. 2024. Supplementation of 500 mg kg⁻¹ Tocotrienol-Rich Fraction (TRF) in Mice Induced Alteration in Liver Protein Expression. *International Journal of Pharmacology* 20(2): 194-200.
- Sadeeshkumar, V., Duraikannu, A., Ravichandran, S., Fredrick, W. S., Sivaperumal, R. & Kodisundaram, P. 2016. Protective effects of dieckol on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84(1810-1819).
- Sailo, B. L., Banik, K., Padmavathi, G., Javadi, M., Bordoloi, D. & Kunnumakkara, A. B. 2018. Tocotrienols: The promising analogues of vitamin E for cancer therapeutics. *Pharmacological Research* 130(259-272).
- Shamloo, B., Kumar, N., Owen, R. H., Reemmer, J., Ost, J., Perkins, R. S. & Shen, H.-Y. 2019. Dysregulation of adenosine kinase isoforms in breast cancer. *Oncotarget* 10(68): 7238.
- Shin-Kang, S., Ramsauer, V. P., Lightner, J., Chakraborty, K., Stone, W., Campbell, S., Reddy, S. A. & Krishnan, K. 2011. Tocotrienols inhibit AKT and ERK activation and suppress pancreatic cancer cell proliferation by suppressing the ErbB2 pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 51(6): 1164-1174.
- Starenki, D., Sosonkina, N., Hong, S.-K., Lloyd, R. V. & Park, J.-I. 2019. Mortalin (GRP75/HSPA9) promotes survival and proliferation of thyroid carcinoma cells. *International journal of molecular sciences* 20(9): 2069.
- Stolarz, M. & Hanaka, A. 2025. Glutamate and Its Role in the Metabolism of Plants and Animals. *Processes* 13(7): 2084.
- Sun, L. & Hui, L. 2020. Progress in human liver organoids. *Journal of Molecular Cell Biology* 12(8): 607-617.
- Sylvester, P. W., Wali, V. B., Bachawal, S. V., Shirode, A. B., Ayoub, N. M. & Akl, M. R. 2011. Tocotrienol combination therapy results in synergistic anticancer response. *Front Biosci* 17(3183-3195).
- Szewczyk, K., Chojnacka, A. & Górnicka, M. 2021. Tocopherols and tocotrienols—bioactive dietary compounds; what is certain, what is doubt? *International journal of molecular sciences* 22(12): 6222.
- Tan, C. Y., Saw, T. Y., Fong, C. W. & Ho, H. K. 2015. Comparative hepatoprotective effects of tocotrienol analogs against drug-induced liver injury. *Redox Biology* 4(308-320).
- Tham, S.-Y., Loh, H.-S., Mai, C.-W. & Fu, J.-Y. 2019. Tocotrienols modulate a life or death decision in cancers. *International journal of molecular sciences* 20(2): 372.
- Tong, S., Li, X., Wang, F., Cheng, Q., Zhang, P., Chen, M., Xie, Y., Lu, X. & Wu, H. 2025. ALDH2 Ameliorates Acute Gouty Arthritis Through Inhibiting NLRP3

- Inflammasome and Pyroptosis by Nrf2/ROS Pathway. *Journal of Inflammation Research* 11095-11108.
- Topić Popović, N., Kazazić, S. P., Bojanić, K., Strunjak-Perović, I. & Čož-Rakovac, R. 2023. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass spectrometry reviews* 42(5): 1589-1603.
- Trefts, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. 2017. The liver. *Curr Biol* 27(21): R1147-r1151.
- Vera, M. C., Pisani, G. B., Biancardi, M. E., Bottai, H., De Luján Alvarez, M. & Quintana, A. B. 2015. Comparison of two chemical models to induce hepatic preneoplasia in male Wistar rats. *Annals of Hepatology* 14(2): 259-266.
- Wang, D., Zhang, J., Yang, X., Zhang, Q., Hu, X., Lu, X., Li, H., Bai, X., Zhang, K. & Sack, M. N. 2025. Acetylation of the Mitochondrial Chaperone GRP75 Governs ER-Mitochondrial Calcium Homeostasis and Hepatocyte Insulin Resistance. *Advanced Science* 12(46): e08991.
- Wang, H., Yan, W., Sun, Y. & Yang, C. S. 2022. δ -Tocotrienol is the most potent vitamin E form in inhibiting prostate cancer cell growth and inhibits prostate carcinogenesis in Pten^{-/-} mice. *Cancer Prevention Research* 15(4): 233-245.
- Webster, J. & Oxley, D. 2012. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 800(227-240).
- Wong, W.-Y., Ward, L. C., Fong, C. W., Yap, W. N. & Brown, L. 2017. Anti-inflammatory γ - and δ -tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. *European journal of nutrition* 56(1): 133-150.
- Xia, J., Li, S., Liu, S. & Zhang, L. 2023. Aldehyde dehydrogenase in solid tumors and other diseases: Potential biomarkers and therapeutic targets. *MedComm* 4(1): e195.
- Xia, J., Liu, W., Ni, Y., Shahzad, A., Cui, K., Xu, Z., Zhang, J., Wei, Z., Teng, Z. & Yang, Z. 2025. Advances in the impact of ASS1 dysregulation on metabolic reprogramming of tumor cells. *Cellular Signalling* 127(111593).
- Xiong, H. & Guo, J. 2025. Targeting Hepatic Stellate Cells for the Prevention and Treatment of Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: Strategies and Clinical Translation. *Pharmaceuticals* 18(4): 507.
- Xu, W., Mi, Y., He, P., He, S. & Niu, L. 2017. γ -Tocotrienol inhibits proliferation and induces apoptosis via the mitochondrial pathway in human cervical cancer HeLa cells. *Molecules* 22(8): 1299.
- Yang, C. S., Luo, P., Zeng, Z., Wang, H., Malafa, M. & Suh, N. 2020. Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of tocopherols and tocotrienols. *Molecular carcinogenesis* 59(4): 365-389.
- Yang, Y. M., Kim, S. Y. & Seki, E. 2019. Inflammation and liver cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Seminars in liver disease*, hlm. 026-042.
- Yoo, H.-J., Yoo, J.-J., Kim, S. G. & Kim, Y. S. 2024. Current perspectives on the pharmacological treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a narrative review. *The Ewha Medical Journal* 47(4):
- Zhang, C., Liu, X., Liu, X., Hua, R., Liu, H., Ma, J., Zou, D., Wang, G., Yuan, Q. & Wang, B. 2024. Adenosine kinase protects against acetaminophen-induced acute liver injury by activating autophagy in hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology* 40(1): 59.

- Zhao, Q., Luo, T., Gao, F., Fu, Y., Li, B., Shao, X., Chen, H., Zhou, Z., Guo, S. & Shen, L. 2022. GRP75 regulates mitochondrial-supercomplex turnover to modulate insulin sensitivity. *Diabetes* 71(2): 233-248.
- Zhao, Q., Yu, M., Li, J., Guo, Y., Wang, Z., Hu, K., Xu, F., Liu, Y., Li, L. & Wan, D. 2024. GLUD1 inhibits hepatocellular carcinoma progression via ROS-mediated p38/JNK MAPK pathway activation and mitochondrial apoptosis. *Discover Oncology* 15(1): 8.
- Zheng, Y., Jia, R., Li, J., Tian, X. & Qian, Y. 2022. Curcumin-and resveratrol-co-loaded nanoparticles in synergistic treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Nanobiotechnology* 20(1): 339.
- Zhou, R., Li, Y., Li, G., Li, Y., Luo, L., Wang, B. & Wang, L. 2026. Metabolic characteristics in hepatocellular carcinoma: amino acid metabolic reprogramming. *Molecular Cancer*
- Zhou, Y., Yu, H., Cheng, S., Chen, Y., He, L., Ren, J., He, X., Chen, J., Zheng, L. & Li, F. 2022. Glutamate dehydrogenase 1 mediated glutaminolysis sustains HCC cells survival under glucose deprivation. *Journal of Cancer* 13(3): 1061.
- Zhu, H., Wang, F. L., Zhang, S., Xue, L., Gao, G. Q., Dong, H. W., Wang, Q., Sun, W. G. & Liu, J. R. 2024. γ -Tocotrienol enhances autophagy of gastric cancer cells by the regulation of GSK3 β / β -Catenin pathway. *Molecular carcinogenesis* 63(10): 2013-2025.
- Zorina, E., Ronzhina, N., Legina, O., Klopov, N., Zgodina, V. & Naryzhny, S. 2025. Proteoform Patterns in Hepatocellular Carcinoma Tissues: Aspects of Oncomarkers. *Proteomes* 13(3): 27.



LAMPIRAN A

SIJIL KELULUSAN DARI JAWATANKUASA ETIKA PENGGUNAAN HAIWAN
(UKMAEC)


UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
ANIMAL ETHICS COMMITTEE
 c/o Laboratory Animal Resource Unit
 Faculty of Medicine, UKM
 Jalan Temerloh, 53200 Kuala Lumpur
 Tel: 92895086, 92895091, 92895087




Edited on 18th May, 2022

24th March, 2021

UKMAEC APPROVAL NUMBER:	FAR/FP/2021/AZMAN ABDULLAH/24-MAR-/1162-MAR.-2021-OCT.-2022
CHIEF INVESTIGATOR:	Assoc. Prof. Dr. Azman Abdullah
DIVISION/DEPT. OF CHIEF INVESTIGATOR:	Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Universiti Kebangsaan Malaysia
FUNDING INSTITUTION (S):	Ministry of Higher Education
GRANT NUMBER (S):	FRGS/1/2020/SKKO/UKM/02/14
PROJECT TITLE:	A Quantitative Proteomics Study on the Effects of Tocotrienols from Palm Oil (TRF) on the Expression of Hepatoprotective Proteins in Diethylnitrosamine and 2-Acetylaminofluorene Induced Hepatocarcinogenesis in Rats.
CO-INVESTIGATOR:	Assoc. Prof. Dr. Qodriyah Haji Mohd Saad Assoc. Prof. Dr. Nur Azlina Mohd Fahami Mr. Fadhullah Zuhair Japar Sidik Mrs. Juliana Abdul Hamid
STUDENT:	Muhammad Ridhuan Al-Rasyid Ruslan Nur Syazana Syahira Mohd Norman
OTHER AUXILIARIES:	
PROJECT CLASSIFICATION:	C
SOURCE OF ANIMALS:	LARU, UKM.
HOUSING LOCATION OF ANIMALS DURING PROJECT:	8 th Floor IVC Room, LARU, UKM.
ESTIMATED DURATION OF PROJECT:	From March 2021 to October 2022


 Assoc. Prof. Dr. Nur Azlina Mohd Fahami
 Chairperson of UKMAEC
 Universiti Kebangsaan Malaysia

APPROVED


 Mohammad Arif Tajuddin Osman
 Secretary of UKMAEC
 Universiti Kebangsaan Malaysia

LAMPIRAN B



PEMBENTANGAN BERKAITAN KAJIAN

Klasifikasi: M3097

A Histological Study of the Liver in Hepatocarcinogenesis-Induced Rats Treated with Increasing Amounts of Tocotrienols

Nor Saadiah Syahira Mohd Seman*, Mohamad Hafizuan M-Rahid Razlan†, Adlina Mohd Ghazali†, Faridhah Zahrah Zayazayah‡, Nur Adlina Mohd Fuzami†, Amma Abdalla§

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Tun Dr. Latiff, Kuala Lumpur, 50000, Kuala Lumpur, Malaysia
 †Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50000 Kuala Lumpur, Malaysia
 ‡Corresponding author: email: ammah@ukm.edu.my





INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma is one of the most common causes of death worldwide. Tocotrienols (T3) is thought to exhibit greater anticancer activity due to its potent antioxidant property compared to tocopherols. T3 has been shown to inhibit stomach, colorectal and breast cancer in previous studies.

METHODOLOGY

42 male Wistar rats were divided into 7 groups: Control, T3 Control, Hepatocarcinogenesis Control (HCC), HCC+125 mg/kg T3, HCC+250 mg/kg T3, HCC+500 mg/kg T3, HCC+100 mg/kg BHA. Hepatocarcinogenesis was induced with DEN + 2-AAF. T3 in different doses were administered thereafter as a potential treatment. At week 17, the rats were sacrificed and their livers were isolated and subsequently processed for histology.



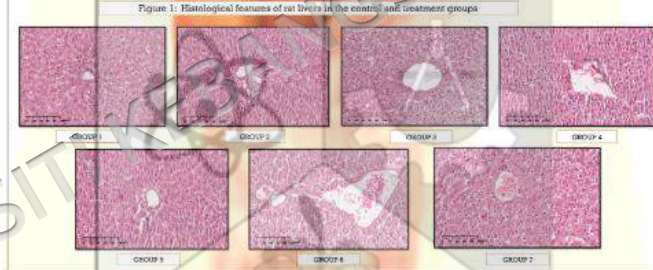
RESULTS

Based on the histological features of rat livers, there is no difference between Control and T3 Control groups. Cellular damage was observed in the livers of rats in the HCC group. Less cellular damage was observed in livers of HCC rats treated with different doses of T3 (Figure 1).

DISCUSSION

Our results showed that rats induced with hepatocarcinogenesis and thereafter treated with different doses of T3 showed different cellular morphology compared to the hepatocarcinogenesis (HCC) group. The cells in the HCC group showed large sized nucleus and decreased cytoplasm, while the normal control and the T3 control groups showed normal cellular morphology of the liver. In the HCC groups treated with different doses of T3 and BHA, they showed less cellular damage compared to the HCC group because T3 exerts antiproliferative effects towards tumorigenic cells, while BHA have been shown to exhibit antioxidant activity which protected the cells from free radical induced damage.

Figure 1: Histological features of rat livers in the control and treatment groups



CONCLUSION

HCC rats treated with T3 showed less liver damage compared to untreated HCC. HCC rats treated with 250 mg/kg T3 showed the least liver damage histologically

LAMPIRAN C

PEMBENTANGAN BERKAITAN KAJIAN

IDENTIFICATION OF DIFFERENTLY EXPRESSED PROTEIN SPOT USING 2D GEL-ELECTROPHORESIS PROTEOMICS OF THE LIVERS OF HEPATOCARCINOGENESIS RATS TREATED WITH TOCOTRIENOLS

Poster ID: PP06 Nur Syazana Syahira Mohd Norman¹, Muhammad Ridhuan Al-Rashid Ruslan¹, Nur Azlina Mohd Fahami¹, Juliana Abdul Hamid¹, Fadhlullah Zuhair Japar Sidik², Azman Abdullah^{1*}

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif 50300 Cheras, Kuala Lumpur, MALAYSIA.
² Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz 50300, Kuala Lumpur, MALAYSIA.
 *Corresponding author: azman.abdullah@ukm.edu.my

Introduction

Liver cancer is one of the top causes of death in the world and many natural products have been investigated as its potential treatment. Apart from being a potent antioxidant, tocotrienols (T3) is also thought to exhibit significant anticancer properties. The 2-D gel electrophoresis proteomics method (2-DE) has the potential to identify many undiscovered chemoprotective and hepatoprotective proteins.

Method

42 male Wistar rats have been divided into 7 groups. Hepatocarcinogenesis was induced by the administration of DEN + 2-AAF. T3 in different doses were administered thereafter as a potential treatment. At week 17, the rats were sacrificed and their livers were isolated and subsequently processed for 2-DE.

Results & Discussion

2-DE analysis showed significant numbers of upregulated and downregulated protein spots between treated and control rats.

Results & Discussion (Continued)

Our results showed that in the 2D gels of the livers of rats that was induced with hepatocarcinogenesis, treatment with various doses of tocotrienols increased the numbers of upregulated protein spots compared to control. The numbers of upregulated protein spots was dose dependent in which treatment with 500 mg/kg T3 showing the highest numbers of upregulated protein spots. Some proteins spots in the treatment groups were shown to be downregulated compared to control, however, their numbers are very low. The protein spots which were differentially expressed are thought to be associated with the chemopreventive and hepatoprotective proteins in the liver.

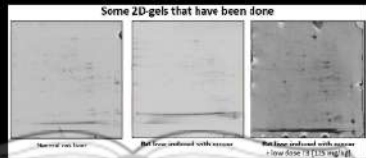
Conclusion

The differentially expressed protein spots could provide important details on liver cancer chemoprevention and hepatoprotection by tocotrienols. Further identification of the protein spots by mass-spectrometry is needed to conclusively determine the proteins involved.

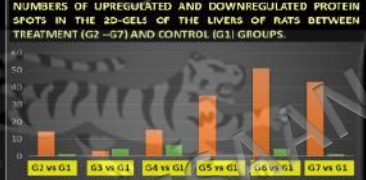
Acknowledgement

The authors would like to thank UKM and Ministry of Higher Education (MOHE) for the funding of this research through the FRGS grant (FRGS/1/2020/SCK0/UKM/02/14)

Some 2D-gels that have been done



NUMBERS OF UPREGULATED AND DOWNREGULATED PROTEIN SPOTS IN THE 2D-GELS OF THE LIVERS OF RATS BETWEEN TREATMENT (G2 -G7) AND CONTROL (G1) GROUPS



Adult male Wistar Rats (180-210g)

- Normal Control (Group 1)
- HCC Control (Group 3)
- HCC + T3 (500 mg/kg) (Group 6)
- T3 Control (Group 2)
- HCC+T3 (250 mg/kg) (Group 5)
- HCC +BHA (100mg/kg) (Group 7)
- HCC +T3 (125mg/kg) (Group 4)

PP06

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEIN SPOTS USING 2D GEL-ELECTROPHORESIS PROTEOMICS OF THE LIVERS OF HEPATOCARCINOGENESIS RATS TREATED WITH TOCOTRIENOLS

Nur Syazana Syahira Mohd Norman¹, Muhammad Ridhuan Al-Rashid Ruslan¹, Nur Azlina Mohd Fahami¹, Juliana Abdul Hamid¹, Fadhlullah Zuhair Japar Sidik² and Azman Abdullah^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, MALAYSIA.
²Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, MALAYSIA.
 *Corresponding author: azman.abdullah@ukm.edu.my

Abstract

Liver cancer is one of the top causes of death in the world and many natural products have been investigated as its potential treatment. Apart from being a potent antioxidant, tocotrienol (T3) is also thought to exhibit significant anticancer properties. The 2-D gel electrophoresis proteomics method (2-DE) has the potential to identify many undiscovered chemoprotective and hepatoprotective proteins. In this study, 42 male Wistar rats have been divided into 7 groups: Control, T3 Control, Hepatocarcinogenesis Control (HCC), HCC+T3 125mg/kg, HCC+T3 250mg/kg, HCC+T3 500mg/kg, and HCC+BHA 100mg/kg. Hepatocarcinogenesis was induced by the administration of DEN + 2-AAF. T3 in different doses were administered thereafter as a potential treatment. At week 17, the rats were sacrificed and their livers were isolated and subsequently processed for 2-DE. 2-DE analysis showed significant numbers of upregulated and downregulated protein spots between treated and control rats. These spots are thought to be associated with chemopreventive and hepatoprotective proteins. In conclusion, the differentially expressed protein spots could provide important details on liver cancer chemoprevention and hepatoprotection by tocotrienols. Further identification of the protein spots by mass-spectrometry is needed to conclusively determine the proteins involved.

Keywords: Liver cancer, hepatocarcinogenesis rats, tocotrienol, 2d gel proteomic

1st LASAM INTERNATIONAL CONFERENCE
 8th - 9th May 2024, Concordia Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia

36

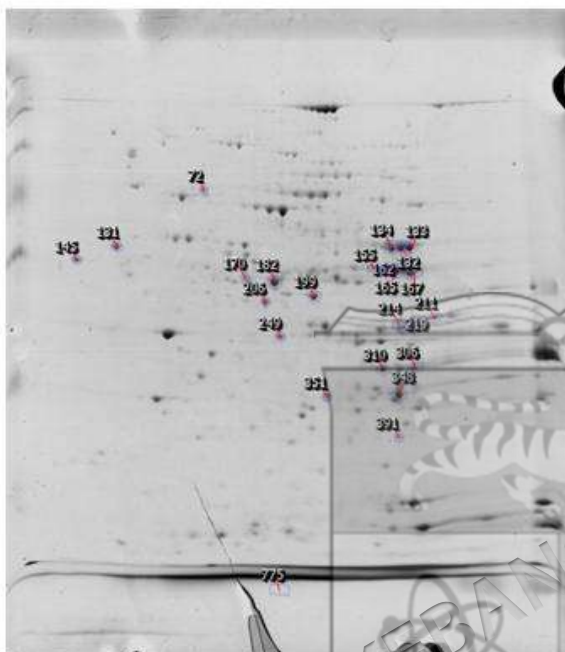
LAMPIRAN D

PERBEZAAN EKSPRESI SETIAP BINTIK PROTEIN YANG SIGNIFIKAN

Experiment: syazana(020124)

Report created: 1/11/2024 11:00:48 AM

Reference image



Experiment Design

Condition	control	trf control	den control	low dose	med dose	high dose	positive control(bha)
Replicates	5	6	6	6	4	5	5

Spots

#	Anova (p)	Fold	Tags	Notes	pI	MW	Protein Accession	Protein Description	Protein pI	Protein MW	Protein URL	Average Normalised Volumes					
												control	trf control	den control	low dose	med dose	high dose
131	3.297e-004	4.2			4.38	58						2.606e+005	1.307e+005	1.473e+005	1.150e+005	6.147e+004	7.013e+004
165	0.001	3.0			8.32	49						5.268e+005	3.494e+005	4.183e+005	4.092e+005	1.730e+005	1.794e+005
167	0.001	3.6			8.52	48						5.574e+005	3.235e+005	4.935e+005	6.978e+005	1.938e+005	3.040e+005
310	0.002	2.5			8.13	26						2.872e+005	2.420e+005	2.901e+005	2.127e+005	1.573e+005	1.540e+005
775	0.002	8.6			6.67							2.451e+005	2.402e+005	4.463e+005	1.798e+006	1.594e+006	4.689e+005
162	0.003	2.6			8.19	50						3.073e+005	2.722e+005	2.219e+005	2.003e+005	1.225e+005	1.177e+005
219	0.005	3.6			8.55	32						7.492e+005	4.260e+005	5.213e+005	6.076e+005	2.091e+005	5.084e+005
145	0.005	3.8			3.83	54						1.741e+005	9.198e+004	6.120e+004	7.432e+004	4.799e+004	4.566e+004
348	0.008	2.9			8.35	23						4.314e+005	2.761e+005	4.185e+005	5.169e+005	2.038e+005	1.790e+005
133	0.008	3.6			8.51	57						5.220e+005	2.819e+005	4.468e+005	4.792e+005	1.445e+005	2.534e+005
182	0.009	3.1			6.6	45						5.988e+005	3.390e+005	4.024e+005	4.940e+005	2.222e+005	1.932e+005
199	0.009	2.5			7.16	39						3.013e+005	2.094e+005	3.111e+005	2.598e+005	1.269e+005	1.336e+005
155	0.010	2.9			8.02	50						1.366e+005	2.231e+005	1.190e+005	1.192e+005	7.571e+004	8.662e+004
72	0.014	3.2			5.6	79						1.237e+005	7.054e+004	8.399e+004	6.519e+004	3.900e+004	4.289e+004
351	0.014	2.6			7.34	23						1.256e+005	5.490e+004	4.923e+004	5.371e+004	9.769e+004	5.317e+004
211	0.017	2.1			8.86	34						2.583e+005	1.746e+005	2.620e+005	2.824e+005	1.335e+005	2.049e+005
170	0.017	2.6			6.19	47						1.322e+005	6.038e+004	7.922e+004	9.335e+004	6.118e+004	5.038e+004

1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

#	Anova (p)	Fold	Tags	Notes	pI	MW	Protein Accession	Protein Description	Protein pI	Protein MW	Protein URL	Average Normalised Volumes					
												control	trf control	den control	low dose	med dose	high dose
249	0.019	2.4			6.68	31						1.623e+005	1.185e+005	1.102e+005	1.001e+005	6.630e+004	6.679e+004
132	0.020	3.4			8.39	57						3.722e+005	2.154e+005	2.782e+005	3.113e+005	1.096e+005	1.800e+005
214	0.024	2.2			8.35	33						1.996e+005	1.927e+005	1.429e+005	1.644e+005	9.092e+004	1.710e+005
306	0.024	2.1			8.56	27						2.640e+005	2.734e+005	2.729e+005	2.808e+005	2.078e+005	2.052e+005
391	0.026	2.2			8.35	19						8.596e+004	7.680e+004	1.076e+005	1.034e+005	5.028e+004	5.642e+004
134	0.037	2.8			8.26	57						6.706e+005	4.023e+005	4.895e+005	4.576e+005	2.387e+005	3.033e+005
206	0.045	2.1			6.48	37						1.286e+005	8.771e+004	1.018e+005	1.046e+005	5.998e+004	6.125e+004

Tags

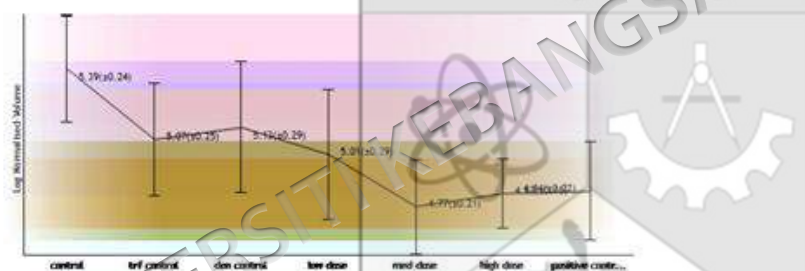
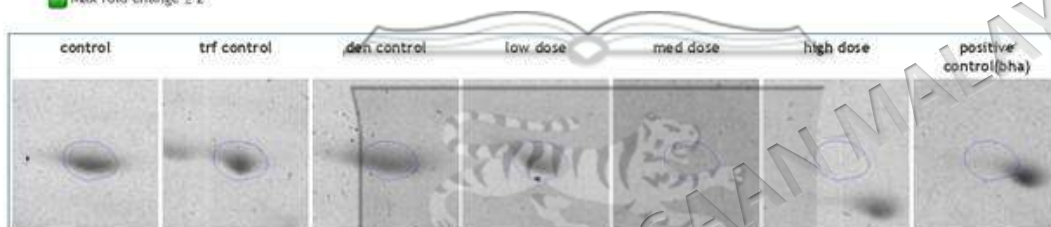
- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

Identifier 131

Position (429, 854)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

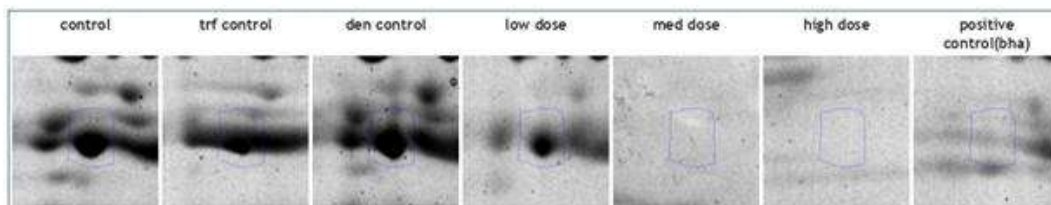


Identifier 165

Position (1516, 942)

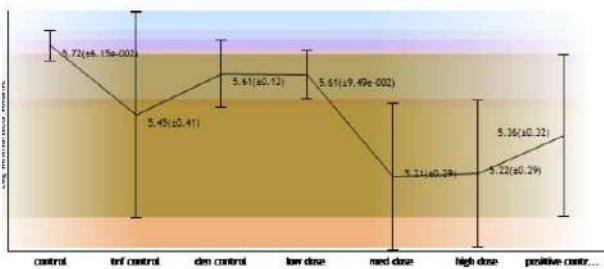
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



4, 11:01 AM

syazana(020124)

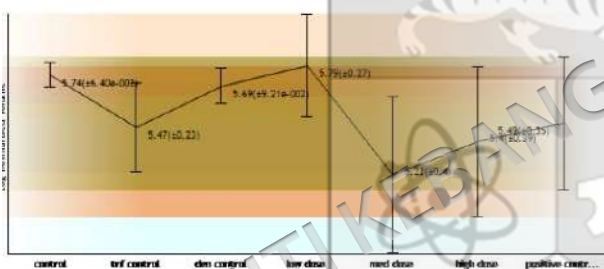
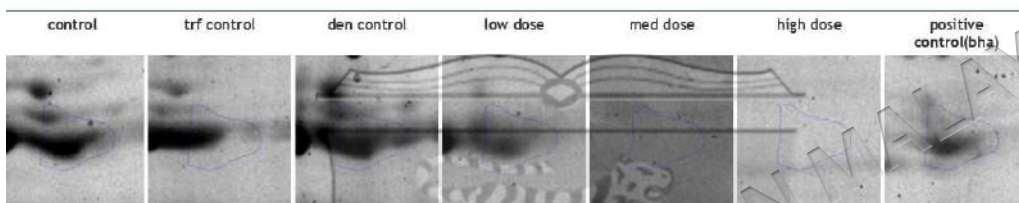


identifler 167

osition (1571, 947)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

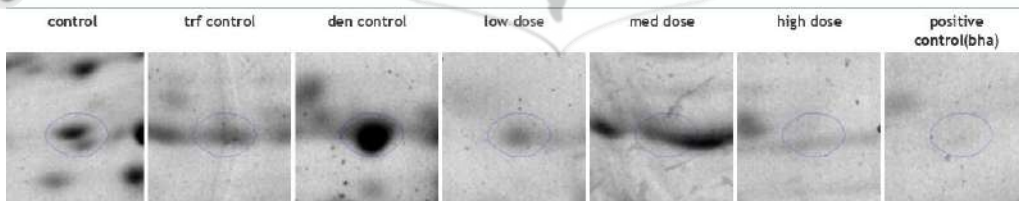


identifler 310

osition (1463, 1292)

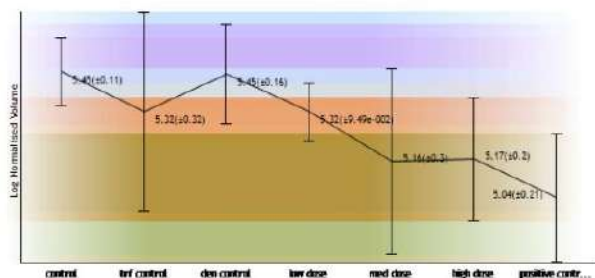
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

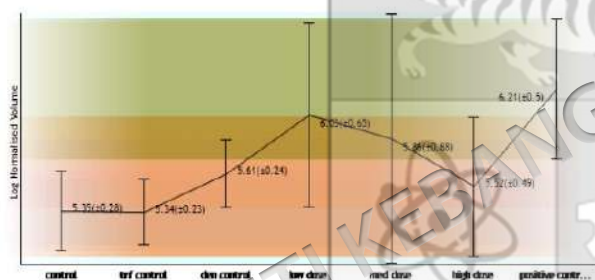
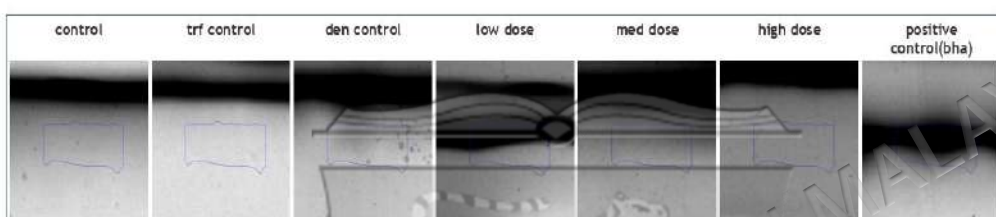


Identifier 775

Position (1062, 2075)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

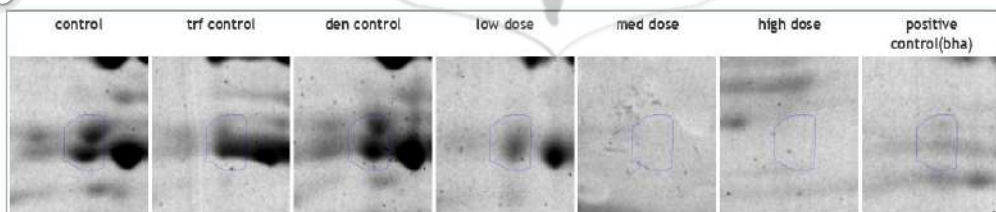


Identifier 162

Position (1480, 937)

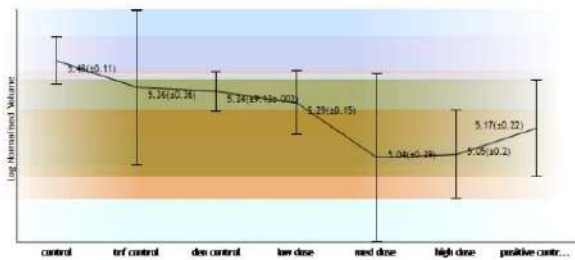
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

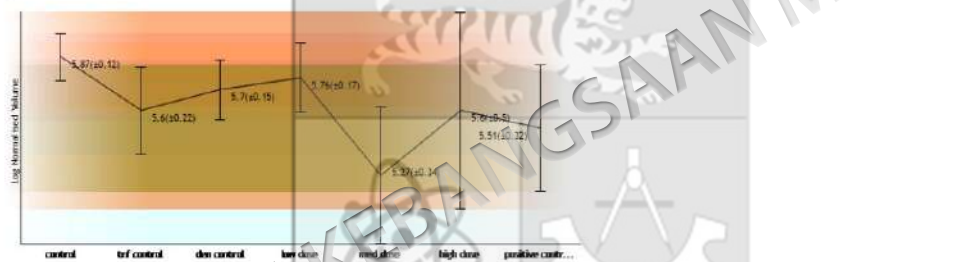
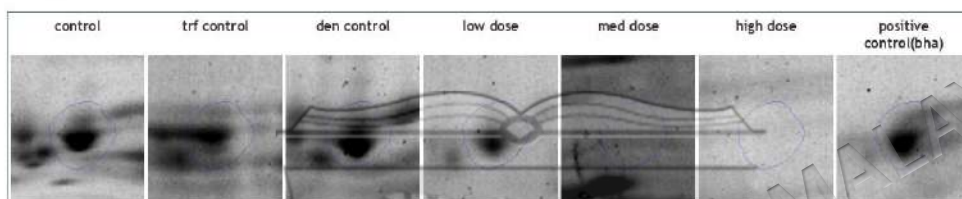


Identifier 219

Position (1580, 1137)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

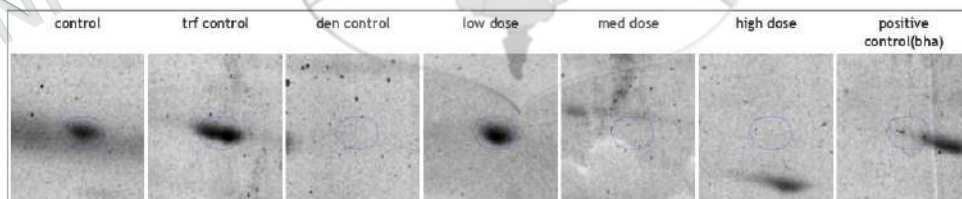


Identifier 145

Position (275, 900)

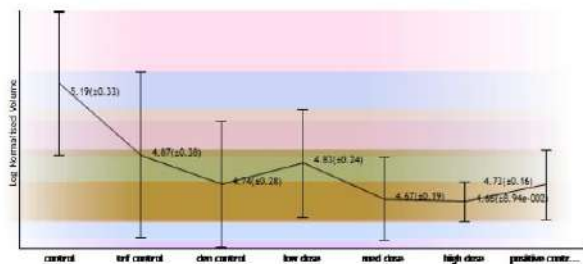
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)



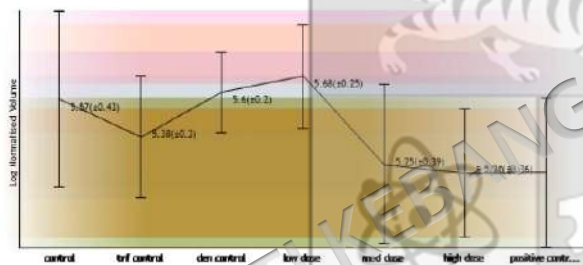
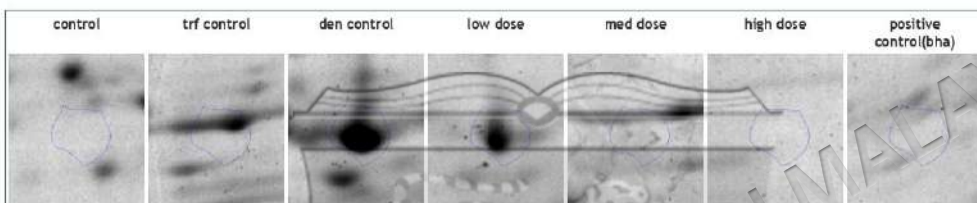
Identifier 348

Position (1525, 1385)

Notes

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 2



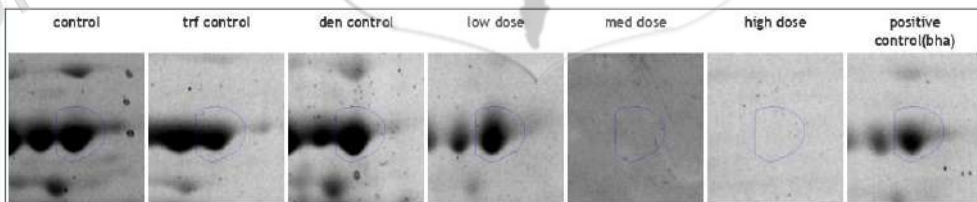
Identifier 133

Position (1568, 860)

Notes

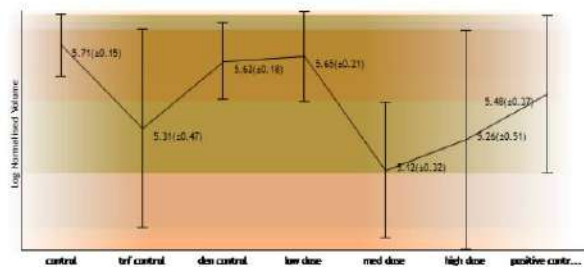
Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)



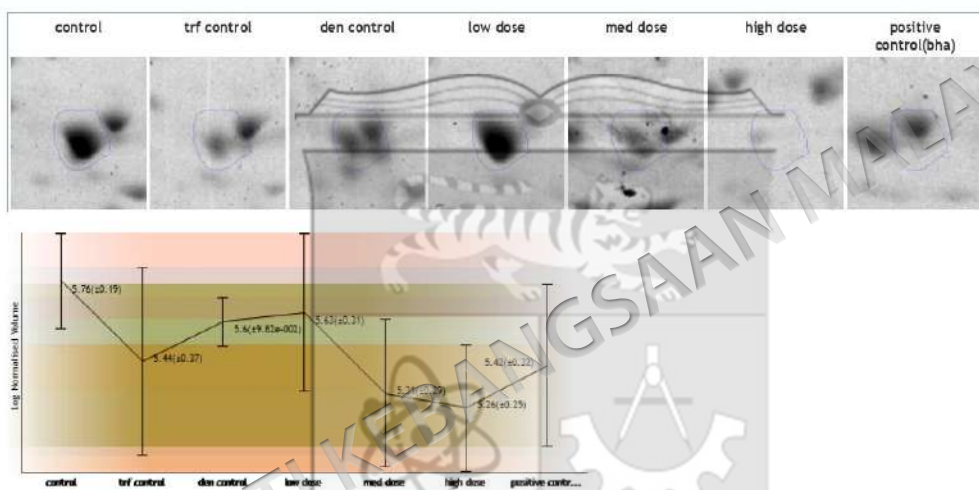
Identifier 182

Position (1041, 982)

Notes

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 2



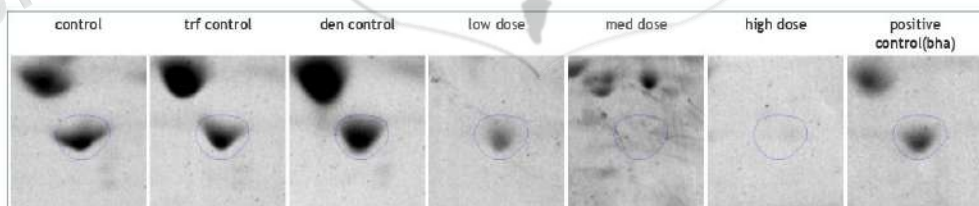
Identifier 199

Position (1196, 1034)

Notes

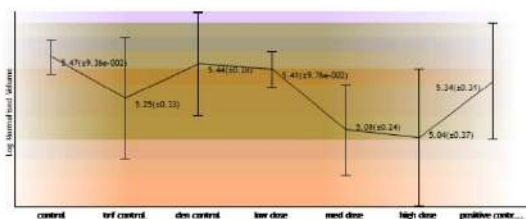
Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

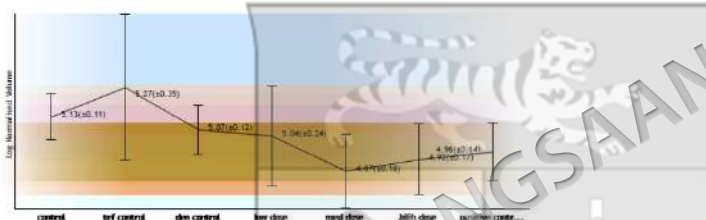
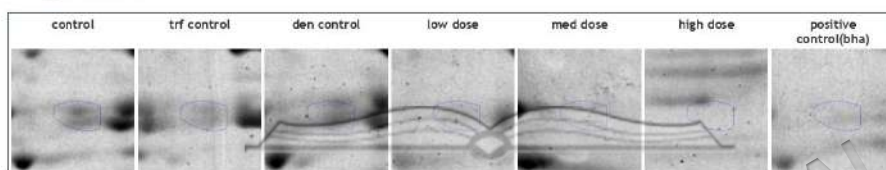


Identifier 155

Position (1435, 931)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

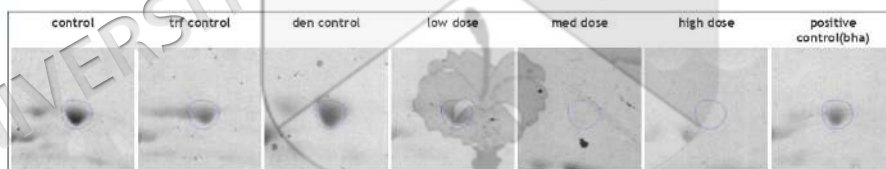


Identifier 72

Position (766, 651)

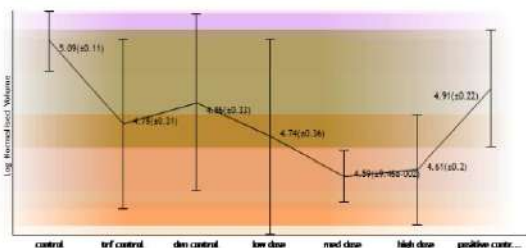
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

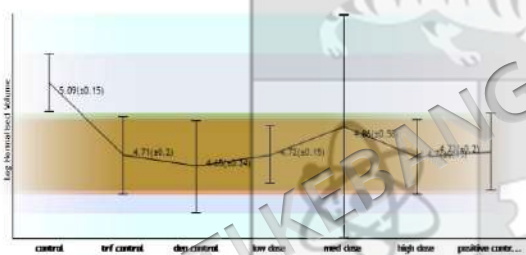
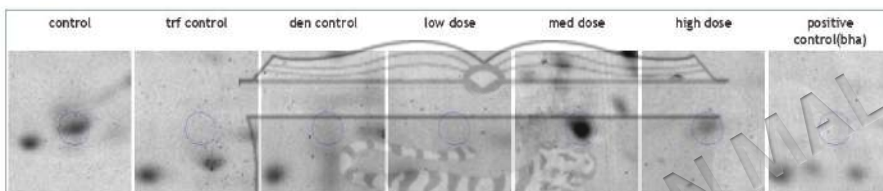


Identifier 351

Position (1246, 1389)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

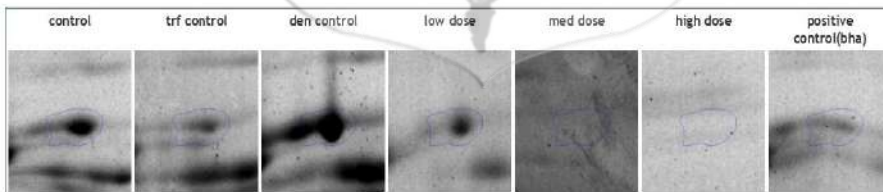


Identifier 211

Position (1667, 1107)

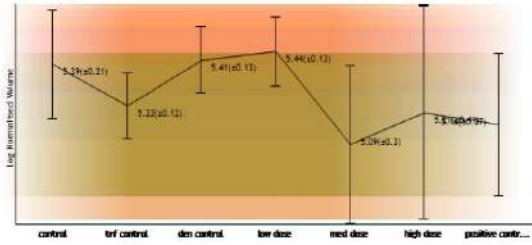
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

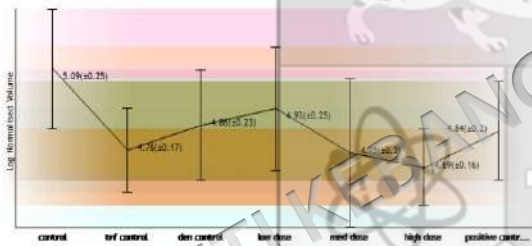
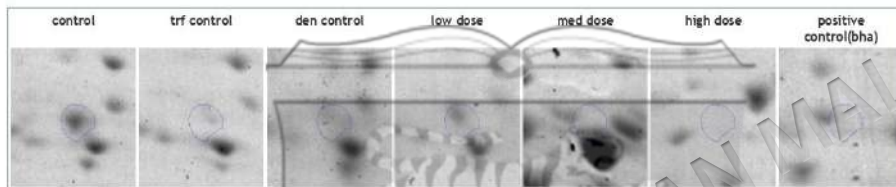


Identifler 170

Position (927, 961)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

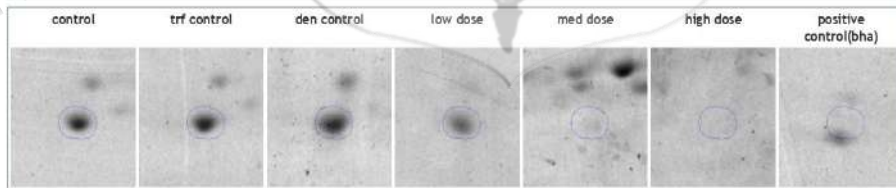


Identifler 249

Position (1065, 1175)

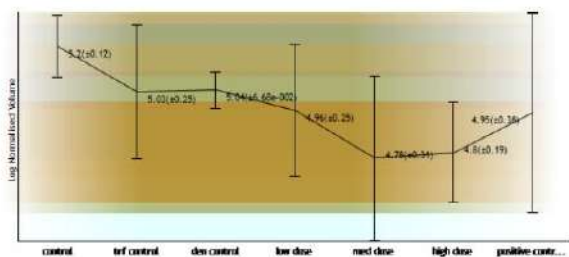
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

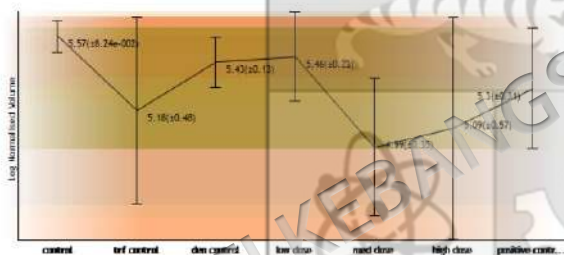
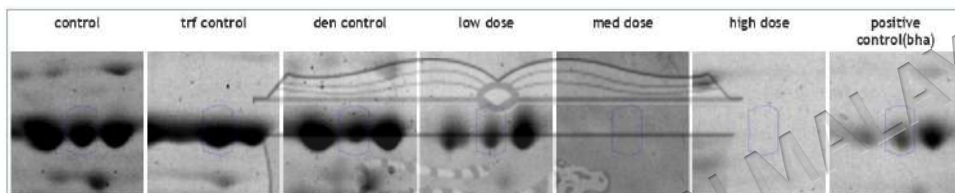


Identifier 132

Position (1535, 859)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

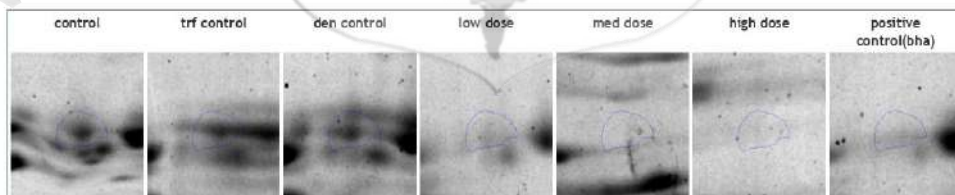


Identifier 214

Position (4526, 1130)

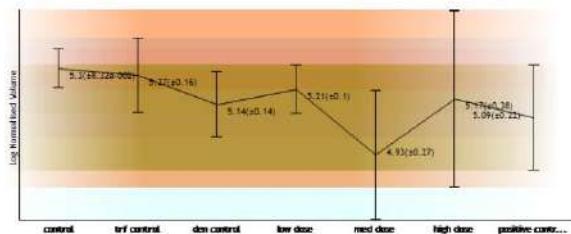
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

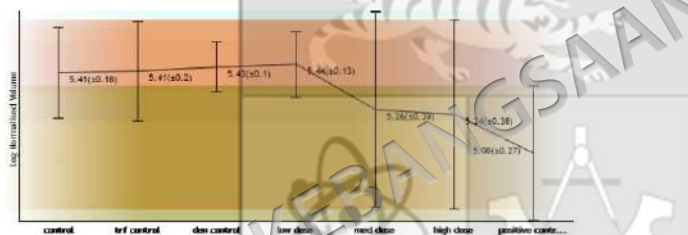
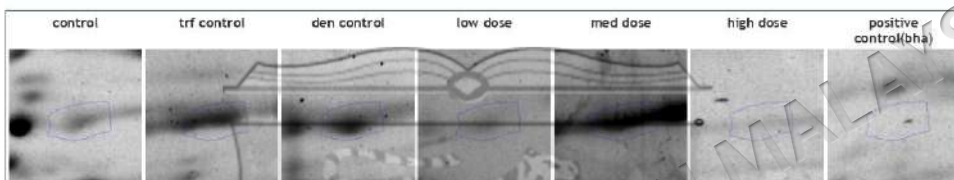


Identifier 306

Position (1583, 1288)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

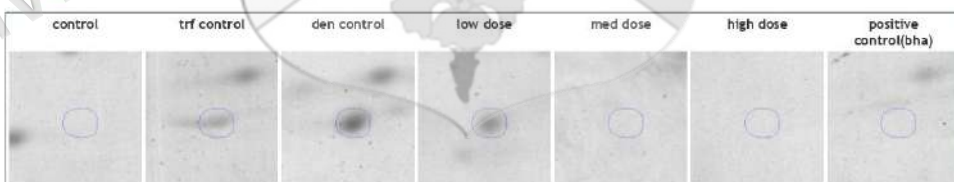


Identifier 391

Position (1526, 1534)

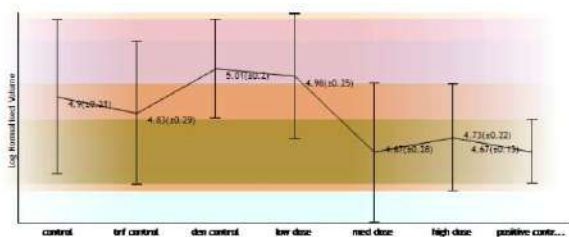
Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



1/11/24, 11:01 AM

syazana(020124)

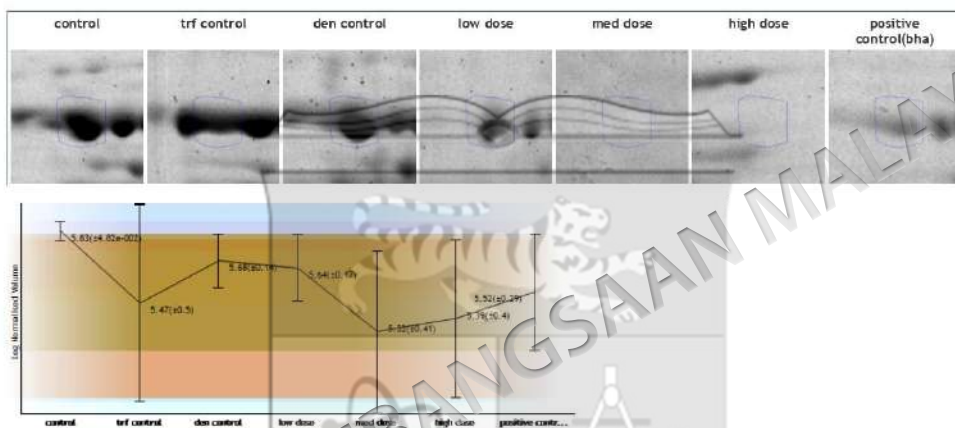


Identifier 134

Position (1499, 861)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2

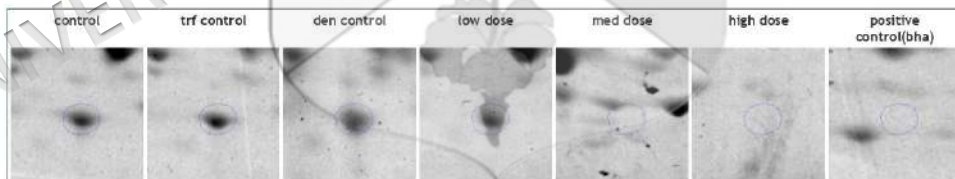


Identifier 206

Position (1008, 1052)

Notes

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 2



4, 11:01 AM

syazana(020124)

